

Aus dem Institut für Pflanzenernährung
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Prof. Dr. S. Schubert

**Entwicklung einer Natrium ausschließenden
Maislinie und die Bedeutung der Ionentoxizität für
das vegetative Wachstum von Mais (*Zea mays* L.)
während der ersten Phase eines Salzstresses**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften
beim Fachbereich 09
Agrarwissenschaften, Ökotropologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Ali Sümer
aus Aydın / Türkei
2002

Tag der Disputation: 16.12.2002

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. P. Felix-Henningsen

1.Gutachter: Prof. Dr. S. Schubert

2.Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Friedt

Prüfer: Prof. Dr. T. Harrach

Prüfer: Prof. Dr. B. Honermeier

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Strategien der Na⁺-Exklusion von Mais	3
1.2 Problemstellung	8
2. Material und Methoden	
2.1 Pflanzenmaterial	11
2.1.1 Erstellung der F ₂ -Generation	11
2.1.2 Selektion von Inzuchtlinien auf ihre Intensität der Natriumexklusion	12
2.2 Pflanzenanzucht	13
2.2.1 Nährlösungsversuche (Standard)	13
2.2.1.1 Langfristiger Einfluss von NaCl und Na ₂ SO ₄	15
2.2.1.2 Anzucht der F ₂ -Generation	16
2.2.1.3 Anzucht für die Auswahl der gegenüber osmotischem Stress toleranten Maisinzuchtlinien	17
2.2.1.4 Versuch zur Bedeutung der Ionentoxizität in der ersten Phase des Salzstress	17
2.2.1.4.a Einfluss von Dürre- und Salzstress auf das Wachstum von Mais	19
2.2.1.4.b Einfluss von verschiedenen Salzen auf das Wachstum von Mais	20
2.2.1.4.c Einfluss einer variierten K ⁺ -Konzentration auf das Wachstum von Mais	21
2.2.1.4.d Einfluss der Na ⁺ /K ⁺ -Interaktion auf die Plasma- lemma-H ⁺ -ATPase-Aktivität in Maisblättern	21
2.2.2 Bodenversuche	22

2.2.2.1 Bodenvorbereitung	22
2.2.2.2 Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit	23
2.2.2.3 Anzucht der Pflanzen in Boden	23
2.2.2.4 Durchführung der Ernten	24
2.3 Pflanzenanalysen	25
2.3.1 Bestimmung von Parametern für Dürre- und Salzstress	25
2.3.1.1 Blattlänge und -breite	25
2.3.1.2 Transpirationsmessung	25
2.3.1.3 Blattfläche	25
2.3.1.4 Frisch- und Trockengewicht	26
2.3.1.5 Histologische Untersuchungen	26
2.3.2 Mineralstoffanalysen	27
2.3.2.1 Gewinnung von Xylemexsudat	27
2.3.2.2 Bestimmung des osmotischen Potentials	27
2.3.2.3 Messung von verschiedenen Kationen und Anionen	28
2.3.2.3.a Kationenbestimmung	28
2.3.2.3.b Anionenbestimmung	29
2.3.2.4 Berechnung der Intensität der Natriumexklusionsmechanismen	29
2.3.2.5 Graphische Darstellung der Mineralstoffkonzentrationen	30
2.3.3 Isolierung von Plasmalemma-Vesikeln	30
2.3.3.1 Plasmalemma-Isolierung	30
2.3.3.2 Proteinbestimmung	33
2.3.4 Enzymatische Untersuchungen	33
2.3.4.1 Messung der ATPase-Aktivität	33
2.3.4.2 Messung der Pumpaktivität an <i>inside out</i> -Vesikeln	35
2.4 Statistische Methoden	37
2.5 Liste der verwendeten Chemikalien	37

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von Na⁺-Exklusionsstrategien auf die Ernährung der Pflanzen	39
3.1.1 Langfristiger Einfluss von NaCl bzw. Na ₂ SO ₄ auf das Wachstum und die Ionenkonzentration bei den Sorten Pioneer 3906 und Helix	39
3.1.2 Korrelation zwischen der Intensität der Natriumexklusion und der Ca ²⁺ -Ernährung der F ₂ -Generation	44
3.1.3 Vergleich des Natriumexklusionsvermögens der aus der Sorte Pioneer 3906 entwickelten Maisinzuchtgenerationen	47
3.1.4 Vergleich verschiedener Inzuchtlinien bezüglich des Einflusses von NaCl-induziertem osmotischem Stress auf das Wachstum und die Ionenkonzentrationen der Pflanzen	49
3.1.5 Vergleich der Intensität der Na ⁺ - Exklusionsmechanismen der beiden Sorten Across 8023 und Pioneer 3906 sowie deren siebenter Inzuchtgeneration (IP-7) im Bodenversuch	56
3.2 Bedeutung der Ionentoxizität in der ersten Phase des Salzstresses	63
3.2.1 Einfluss von Dürre- und Salzstress auf das Blattwachstum der Sorte Pioneer 3906	63
3.2.2 Einfluss von Dürre- und Salzstress auf das Blattwachstum der Sorten Pioneer 3906 und Across 8023	70
3.2.3 Einfluss verschiedener Salze auf das Blattwachstum der Sorte Pioneer 3906	74
3.2.4 Einfluss einer variierten K ⁺ -Konzentration auf das Blattwachstum der Sorte Pioneer 3906	78
3.2.5 Einfluss der Na ⁺ /K ⁺ -Interaktion auf die hydrolytische Aktivität und Pumpaktivität der Plasmalemma-H ⁺ -ATPase aus Maisblättern	81
3.2.5.1 Charakterisierung der isolierten Plasmalemma-Fraktion	81

3.2.5.2 Einfluss der Na ⁺ /K ⁺ -Interaktion auf die vanadat-empfindliche Plasmalemma-H ⁺ -ATPase-Aktivität	82
3.2.5.3 Einfluss der Na ⁺ /K ⁺ -Interaktion auf die Protonenpump-Aktivität der Plasmalemma-ATPase	85

4. Diskussion

4.1 Entwicklung einer Inzuchtlinie mit großem Na⁺-Exklusionsvermögen	88
4.2 Führt Na⁺-Exklusion zu Nährstoffmangel?	98
4.3 Wirkt Cl⁻ in der zweiten Phase eines Salzstressses toxisch auf die Maispflanze?	103
4.4 Gibt es in der ersten Phase eines Salzstressses Iontoxizität?	105
4.5 Wirkung von Salzstress auf das Streckungswachstum von Mais	113
5. Zusammenfassung	119
6. Summary	121
7. Literaturverzeichnis	123

1. Einleitung

Bodensalinität sowie unzureichende Wasserversorgung (Trockenheit) gehören im Hinblick auf die Nutzung von Kulturpflanzen zu den weltweit ältesten und bedeutendsten umweltbedingten Problemen der Landwirtschaft. Die Hälfte der 140 Millionen km² Landfläche der Erde kann agronomisch genutzt werden (Christiansen, 1982). Nur 15 Millionen km² bzw. 11% der Landfläche werden tatsächlich landwirtschaftlich genutzt (Toenniessen, 1984). Davon werden 2,1 Millionen km² bewässert und auf ca. 30 bis 50% dieses Bewässerungslandes gibt es bereits Probleme durch Versalzung (Moore, 1984; Flowers und Yeo, 1995). Infolge unangepasster Bewirtschaftungsweisen nimmt die Bodenversalzung ständig zu. Besonders betroffen sind Entwicklungsländer in ariden und semiariden Zonen, denen das Kapital für effiziente Bewässerungs- und Meliorationsmaßnahmen fehlt. Grundsätzlich ist eine Verminderung des Salzgehaltes in Böden z. B. durch Auswaschung von Salzen und durch Gipsdüngung bei guter Drainage möglich. Allerdings ist die Effektivität der Auswaschung durch die Verfügbarkeit von qualitativ hochwertigem Wasser begrenzt. Durch einen erhöhten Wasserbedarf, aufgrund von Bevölkerungswachstum und industrieller Entwicklung sowie der damit verbundenen Verwendung von Wasser geringer Qualität in der Landwirtschaft, wird sich die Problematik der sekundären Versalzung weiterhin verschärfen (Rengel, 1992). In schweren Böden ist nicht nur die Auswaschung der Salze behindert, sondern es kommt bei falscher Bewirtschaftung des Standorts und durch die im Vergleich zur Gesamtniederschlagsmenge jährlich größere Evapotranspiration zu einem kapillaren Aufstieg des Wassers im Boden. Dadurch werden die im Boden vorhandenen löslichen Salze mit dem Wasser in die oberen Bodenschichten verlagert und dort akkumuliert. Dieser Prozess führt zu einer sekundären Salinität (Schubert, 1999). Auf der einen Seite ist für solche Standorte eine Verbesserung des Wasser- und des Produktionsmanagements nötig, auf der anderen Seite muss die Pflanzenzüchtung Sorten bereitstellen, die unter den verschlechterten

Bedingungen von Wasserknappheit und Versalzung einen ökonomisch relevanten Ertrag bringen. Trotz erheblicher züchterischer Bemühungen konnte bisher keine wesentliche Verbesserung der Salzresistenz erzielt werden (Blum, 1988). Als Grund wird die polygene Vererbung von Merkmalen genannt, die zur Salzresistenz beiträgt (Cheeseman, 1988; Epstein und Rains, 1987). Für die Züchtung salzresistenter Sorten wäre es wünschenswert, möglichst einfache Parameter zu finden, mit deren Hilfe Rückschlüsse auf die Salzresistenz gezogen werden können. Für gezielte Untersuchungen an unterschiedlich salzresistenten Genotypen sind Kenntnisse über die Anpassungsmechanismen der Pflanzen an saline Substrate erforderlich. Die möglichen Anpassungsmechanismen der Pflanzen unter Salzstress werden in vielen Arbeiten diskutiert (Literaturübersicht siehe Flowers et al., 1977; Greenway und Munns, 1980; Wainwright, 1980). Das physiologische Verständnis der entscheidenden, begrenzenden Prozesse in der Pflanze könnte eine genetische Verbesserung der Salzresistenz von Kulturpflanzen ermöglichen (Schubert, 1999).

Pflanzenarten sind unterschiedlich salzresistent. Sie werden als salzresistente Halophyten und als salzsensitive Meso- bzw. Glycophyten klassifiziert. Zwar sind die meisten landwirtschaftlichen Nutzpflanzen mehr oder weniger salzempfindlich (Shannon, 1984), jedoch gibt es Beispiele dafür, dass einerseits zwischen den einzelnen Pflanzenarten und andererseits innerhalb der Arten erhebliche Unterschiede bezüglich ihrer Salzresistenz bestehen (Subbarao und Johansen, 1994). Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) werden als resistent, Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und Mais (*Zea mays*) als mäßig sensitiv eingestuft (Sitte et al., 1998). Die Maispflanze reagiert je nach Entwicklungsstadium und Gewebe unterschiedlich auf Salinität. Besonders in der vegetativen Phase reagiert das Wachstum empfindlich auf hohe Salzgehalte im Boden und begrenzt damit das Ertragspotential. Dagegen wird zu späteren Zeitpunkten eine größere Resistenz gegenüber Salzstress beobachtet (Cramer, 1994). Wurzeln reagieren weniger empfindlich als der Spross.

Deshalb ändert sich bei Salinität das Spross-Wurzel-Verhältnis (Schubert und Läuchli, 1986; Cramer und Bowman, 1991).

1.1 Strategien der Na⁺-Exklusion von Mais

Pflanzen haben die Möglichkeit, die hohen Ionenkonzentrationen zu vermeiden, indem sie diese kompartmentieren (Inkluder) oder ausschließen (Exkluder) (Schachtman und Munns, 1992). Während Halophyten die aufgenommene Na⁺-Menge in den Blattvakuolen speichern (Inklusion), um die cytosolisch hohen Na⁺-Konzentrationen zu vermeiden (Läuchli und Epstein, 1984), ist es in Glycophyten in erster Linie die Exklusion, die zu einer nichttoxischen Na⁺-Konzentration im Cytoplasma beiträgt (Läuchli, 1984). Mais kann als Na⁺-exkludierende Pflanze bezeichnet werden (Drew und Läuchli, 1985; Jacoby und Hanson, 1985). Als Strategien der Na⁺-Exklusion werden verschiedene organisatorische Stufen definiert, auf denen die Pflanze eine schrittweise Reduzierung der Na⁺-Konzentration bis hin zu ihrem empfindlichsten Teil, nämlich dem photosynthetisch aktiven Gewebe, realisieren kann (Schubert, 1990). Mais verfolgt in erster Linie zwei Strategien der Na⁺-Exklusion. Eine ist an der Wurzeloberfläche nachzuweisen. Sie ist durch die geringe Permeabilität des Epidermis- und Cortexplasmalemmas von Maiswurzelzellen für Na⁺ bedingt (Schubert und Läuchli, 1990). Durch diese effiziente Barriere findet eine Influxlimitierung statt, die in Abhängigkeit vom Genotyp unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Nach einigen Untersuchungen spielt die hohe Ca²⁺-Konzentration im Medium eine wichtige Rolle für die Membranstabilität und -permeabilität des Plasmalemmas (LaHaye und Epstein, 1969; Läuchli und Epstein, 1970; Cramer et al. 1986; Maas und Grieve, 1987). Unter hoher Na⁺- und geringer Ca²⁺-Außenkonzentration wird an der Plasmamembran von Wurzelzellen Ca²⁺ durch Na⁺ von den Bindungsstellen verdrängt, so dass die Membranintegrität beeinträchtigt und die Membranpermeabilität erhöht wird (Cramer et al., 1986; Cramer und Läuchli, 1986). Erhöhte, unkontrollierte Permeabilität der Zellmembranen dürfte zu einer überhöhten Na⁺-Konzentration im Cytoplasma führen (Mengel, 1991).

Eine vollständige Exklusion an der Wurzeloberfläche ist auch aus anatomischen Gründen prinzipiell unmöglich. Das Fehlen einer funktionstüchtigen Endodermis in jungen, unausgereiften Wurzelabschnitten dürfte das apoplasmatische Eindringen von Na^+ -Ionen erleichtern (Schubert, 1990). Der Eintritt in den Symplast gilt als grundlegendster Kontrollpunkt für den Salzeintritt in die Pflanze und es wird angenommen, dass der Casparische Streifen ein kritisches Kontrollelement für den Salzflux in den Spross darstellt (Glenn et al., 1997). Außerdem kann Na^+ aufgrund des negativen Membranpotentials besonders bei hohen Na^+ -Konzentrationen in der Bodenlösung passiv in die Wurzelzellen strömen (Amtmann und Sanders, 1999). Die Influxlimitierung, die bisher erwähnt wurde, wird als passive Exklusion bezeichnet und ermöglicht der Pflanze eine Exklusion ohne ständigen Energieaufwand (Schubert und Läuchli, 1990). Neben der passiven Exklusion wurde am Plasmalemma der Wurzelzellen eine, von metabolischer Energie abhängende, aktive Ausscheidung nachgewiesen. Es handelt sich um einen Pumpmechanismus am Plasmalemma von Wurzelzellen, mit dem das in das Cytoplasma aufgenommene Na^+ gegen den elektrochemischen Gradienten aktiv wieder aus den Maiswurzelzellen in den Apoplast bzw. das Wurzelmedium ausgeschieden wird (Marschner und Ossenberg-Neuhaus, 1976; Davis und Jaworsky, 1979; Schubert und Läuchli, 1988, 1990). Nach neueren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass für den Na^+ -Efflux ein Na^+/H^+ -Antiport am Plasmalemma von Maiswurzelzellen der salzresistenten Sorte Pioneer 3906 tatsächlich vorhanden ist (Fortmeier, 2000). Auch durch molekularbiologische Ansätze wurden im Spross und in der Wurzel der Sorte Pioneer 3906 mehrere Isoformen des Gens (*ZmNHX1*) für einen Na^+/H^+ -Antiport identifiziert und kloniert (Zörb et al., 2001).

Die zweite Strategie ist die Na^+ -Exklusion auf dem Niveau der Xylemparenchymzellen. Mittels Autoradiographie (Shone et al., 1969) und Röntgenmikroanalyse (Yeo et al., 1977; Kramer et al., 1977) konnte unabhängig voneinander bewiesen werden, dass in das Xylem transportiertes Natrium aus der Xylemleitbahn in die Xylem-

parenchymzellen absorbiert und somit der Natriumtransport in den Spross vermindert wird (Jacoby und Hanson, 1985). Auch morphologische Untersuchungen geben Hinweise auf die Na^+ -Exklusion an den Xylemparenchymzellen (Fortmeier, 1996). Im Querschnitt der oberen Hauptwurzel waren im Zentralzylinder der Maissorten Pioneer 3906 und Across 8023 jeweils weitleumige, mehr innen liegende Xylemelemente zu beobachten. Diese weitleumigen Xylemelemente grenzen an ein parenchymatisches Gewebe mit verdickten Zellwänden, welche bei der salzresistenten Sorte Pioneer 3906 aus zwei bis drei Zellschichten und bei der salzempfindlichen Sorte Across 8023 nur aus einer bis maximal zwei Zellschichten besteht. Die größere Anzahl dieser Zellen bei Pioneer 3906 im Vergleich zu Across könnte die höhere Absorptionskapazität von Na^+ in die Xylemparenchymzellen erklären. Die Ausbildung von Xylemparenchymzellen zu Transferzellen in den proximalen Wurzelabschnitten und der Stammbasis spricht für eine stoffwechselabhängige und metabolisch energieabhängige Absorption (Schubert, 1990). Hier wird K^+ gegen Na^+ eingetauscht und Na^+ wird dadurch im Zentralzylinder angereichert (Läuchli, 1984; Serrano und Gaxiola, 1994). Die selektive Na^+ -Absorption aus dem Xylem kann jedoch nicht als Na^+/H^+ -Antiport angesehen werden, da die Plasmamembran-ATPasen Protonen ins Xylem abscheiden und der Protonengradient somit in der falschen Richtung liegt (Jacoby, 1994). Aus dem Xylem absorbiertes Na^+ kann entweder, wie oben erwähnt, in die Xylemparenchymzellen transloziert werden oder über das Phloem abwärts transportiert werden, wo es, wieder im Wurzelsystem angekommen, an das Medium zurück abgegeben werden kann (Poljakoff-Mayber und Lerner, 1994; Lohaus et al., 2000).

Beide Exklusionsmechanismen können in unterschiedlicher Intensität vorliegen, d. h. es gibt genotypische Unterschiede. Die effiziente Na^+ -Exklusion der relativ salzresistenten Maishybrid Sorte "Pioneer 3906" basiert auf beiden Strategien. Die Maissorte Pioneer 3906 ist als Einfachhybride das Kreuzungsprodukt aus den Pioneer-Inzuchtlinien 165 und 605. In einem Experiment, bei dem die Intensitäten der Na^+ -Exklusionsmechanismen von Elternlinien und

Hybride verglichen wurden, stellte sich heraus, dass die Hybride in beiden Merkmalen mindestens genau so gut, wenn nicht sogar besser, als die betreffende Elterline war. Folglich wurde die effiziente Na^+ -Exklusion an der Wurzeloberfläche von der Inzuchtlinie Pioneer 165 an Pioneer 3906 vererbt, während die Eigenschaft der Na^+ -Exklusion aus dem Spross (Xylemparenchym) auf die Inzuchtlinie 605 zurückzuführen war. Die beiden bedeutsamen Strategien der Na^+ -Exklusion sind demnach nicht nur physiologisch sondern auch genetisch voneinander unabhängig (Schubert, 1990).

Die Beziehung zwischen der Na^+ -Exklusion und der Salzresistenz bei Mais wurde bisher in der Literatur kontrovers diskutiert. Es konnten zwischen der Na^+ -Exklusion und der Salzresistenz keine Zusammenhänge gefunden werden, weil die Untersuchungen nur über kurze Zeiträume im vegetativen Stadium durchgeführt wurden. Erst das Zweiphasenmodell von Munns (1993) konnte auf diesem Gebiet neue Erkenntnisse formulieren.

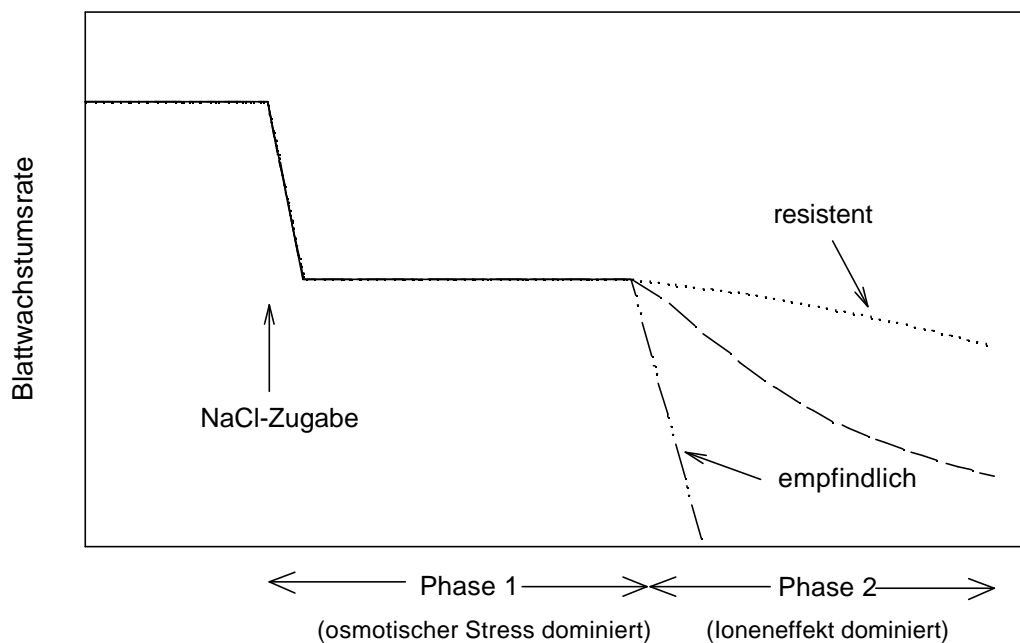


Abb. 1: Modell der zweiphasigen Wachstumsreaktion unter salinen Bedingungen von drei unterschiedlich salzresistenten Genotypen (nach Munns, 1993)

Die Wachstumshemmung der Pflanze unter Salzeinwirkung wurde nach diesem Modell mit einer zweiphasigen Reaktion beschrieben. In der ersten Phase ist die Wachstumsreduktion durch die von Salz verursachte Verringerung des osmotischen Potentials der Außenlösung und den dadurch verursachten osmotischen Stress geprägt. In dieser eine bis zu mehreren Wochen andauernden Phase, die auch als "physiologische Trockenheit" bezeichnet wird, reagieren die unterschiedlich salzresistenten Genotypen einer Art mit gleicher Wachstumsreduktion. Da die Salinität zuerst in der Wurzel wahrgenommen wird, gilt es als wahrscheinlich, dass ein von der Wurzel stammendes Signal (vermutlich Absicinsäure) gebildet wird, welches direkt oder indirekt die Blattexpansionsrate reguliert (Rausch et al., 1996; Munns, 1993). Pflanzen zeigen in diesem Stadium ein gehemmtes Streckungswachstum, das zu einem gedrungenen Habitus und dunkelgrüner Farbe der Blätter führt. Während in der ersten Phase alle Pflanzenvarietäten einer Spezies ähnlich reagieren, findet erst in einer späteren zweiten Phase, wenn toxische Ionen in der Zellwand und im Cytosol akkumuliert werden, eine Differenzierung in empfindliche, weniger empfindliche und resistente Varietäten statt. Es gibt also innerhalb der Arten unterschiedlich sensitive Reaktionen auf Ionentoxizität und, daraus folgend, eine genetische Variabilität in Bezug auf dieses Merkmal. Der Vergleich zwischen dem effizient Na^+ -ausschließenden Maishybriden Pioneer 3906 und der weniger stark ausschließenden Sorte Across 8023 zeigte daher erst nach siebenwöchiger NaCl -Behandlung (100 mM) signifikante genotypische Unterschiede: Während Pioneer 3906 bis zur Reife keine Toxizitätssymptome aufwies, entwickelten sich bei der Sorte Across 8023, beginnend an den alten Blättern, zunächst Chlorosen und später Nekrosen, die auf die jüngeren Blätter übergriffen und schließlich zum Absterben der Pflanzen führten (Fortmeier und Schubert, 1995). Nach Untersuchungen dieser Autoren war das Sprosswachstum bei Mais unter NaCl -Salinität langfristig in erster Linie durch Na^+ geschädigt.

Die Hypothese von Oertli (1968) beschreibt eine extrazelluläre NaCl -Akkumulation in der Zellwand als einen möglichen Grund für

salzinduzierte Schäden in Pflanzen. Als Beleg für diese Hypothese wurden Konzentrationen von 500 mM NaCl im Apoplasten von Reis nachgewiesen, obwohl das Wurzelmedium nur 50 mM NaCl betrug. Dehydrierung, Turgorverlust und Zelltod waren die Folge, was auf eine indirekte Na⁺-Toxizität hindeutete. Diese Hypothese konnte bei Maispflanzen in zwei unabhängigen Versuchen nicht bestätigt werden, da Lohaus et al. (2000) bei einer Außenkonzentration von 100 mM NaCl, 4 mM Na⁺ und Mühling & Läuchli (2002) bei einem Substratangebot von 150 mM NaCl nur 10-30 mM Na⁺ in den Blattapoplasten festgestellt haben. Dies bedeutet, dass die toxische Wirkung von Na⁺ nicht durch die Dehydrierung des Cytoplasmas entsteht. Die toxische Wirkung von Na⁺ entfaltet sich im Cytoplasma auf enzymatischer Ebene. Eine erhöhte Na⁺-Aufnahme kann auch zu einer relativ geringeren Aufnahme anderer Nährstoffe führen bzw. deren interne Verteilung in der Pflanze stören. Dieses Ionenungleichgewicht führt vornehmlich zu Na⁺-induziertem K⁺- oder Ca²⁺-Mangel in der Pflanze (Greenway und Munns, 1980; Marschner, 1995; Cramer, 1997).

1.2. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten im Einzelnen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

Erstellung einer Na⁺-ausschließenden Inzuchtlinie

Ausgehend von dem Modell nach Munns (1993) (Abb. 1) wurde ein physiologisches Konzept entwickelt, um die Salzresistenz von Mais über die osmotische Anpassung und die Na⁺-Exklusion der Pflanzen zu verbessern. Aufbauend auf den Kenntnissen der Na⁺-Exklusion und ihrer Bedeutung für die Salzresistenz von Mais sollte zuerst eine Inzuchtlinie entwickelt werden, die nicht nur beide Na⁺-Exklusionsstrategien in sich vereinigt, sondern möglichst noch bessere Exklusionseigenschaften aufweist als "Pioneer 3906". Weiterhin sollte die Maisinzuchtlinie der Hybride Pioneer 3906 nach ihrem Na⁺-Exklusionsvermögen selektiert werden, um effizient Na⁺-

ausschließende Maisgenotypen herzustellen. Weiterhin ist fraglich, ob die verbesserten Na^+ -Exklusionsstrategien zu einer verminderten Ernährung der Maispflanze führt. Osmotische Anpassung ist auch ein Teil des Gesamtmerkmals Salztoleranz. Würde nur im Hinblick auf das Teilmerkmal Ionenexklusion selektiert, würden andere Teilmerkmale der Salztoleranz, wie z.B. die osmotische Anpassung, eventuell vernachlässigt.

Überprüfung der Korrelation von Na^+ -Exklusion und Ca^{2+} -Mangel

Schubert (1990) und Fortmeier (1996) stellten fest, dass die Na^+ -ausschließende Sorte Pioneer 3906 unter Salinitätsbedingungen schon nach einigen Tagen deutliche Ca^{2+} -Mangelsymptome an den jüngsten Blättern zeigte. Nach einiger Zeit verschwanden diese Symptome jedoch wieder. Bei der schwach Na^+ -ausschließenden Sorte Across 8023 konnten dagegen keine Ca^{2+} -Mangelsymptome beobachtet werden. Die angeführten Beobachtungen indizieren, dass ein Zusammenhang zwischen der Intensität des Na^+ -Exklusionsvermögens und der mangelnden Ca^{2+} -Verlagerung in die jungen Sprosssteile besteht. Für die Ca^{2+} -Mangelsymptome bei der Na^+ -exkludierenden Hybride Pioneer 3906 wurden in dieser Arbeit zwei Hypothesen aufgestellt.

Nach der ersten Hypothese spielt die Na^+ -Exklusion an der Wurzeloberfläche für die Ca^{2+} -Mangelsymptome eine Rolle. Dafür spricht, dass die Zellen an der Wurzelspitze sehr dicht gepackt sind und sich dadurch die Bindungsstellen für Ca^{2+} erhöhen (Mengel, 1991). Außerdem können die dichtgepackten Zellen an der Wurzelspitze den Diffusionswiderstand erhöhen. Beides führt dazu, dass Ca^{2+} apoplastisch nicht ausreichend in die Xylemgefäße weitergeleitet wird.

Nach der zweiten Hypothese wird Ca^{2+} wie auch Na^+ aus der Xylemleitbahn in die Xylemparenchymzellen transloziert. Deswegen wird in der aufspaltenden F_2 -Generation des Hybriden Pioneer 3906 die Beziehung zwischen der Intensität der Na^+ -Exklusion und der Ca^{2+} -Verlagerung in die nicht entfaltenden jüngsten Blätter sowie im Xylemexsudat untersucht.

Überprüfung des Auftretens von Ionentoxizität in der ersten Phase des Salzstresses

Eine weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob das Modell von Munns (1993) in der ersten Phase der Salzeinwirkung für die Maispflanze zutrifft oder ob es schon in dieser frühen Phase auf das Wachstum von Mais neben dem osmotischen Stress zusätzlich auch eine ionenspezifische Toxizität gibt. Bei Nachweis einer ionenspezifischen Toxizität in einem frühen Stadium des Salzstresses war weiterhin zu klären, welches Ion die zusätzliche Wachstumsreduktion verursachte.

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Als Saatgut wurden verschiedene Genotypen von *Zea mays* L. mit folgenden Empfindlichkeiten gegenüber Salz bzw. osmotischem Stress verwendet:

Material		Eigenschaften
cv. Pioneer 3906 (Hybride)		salzresistent
Inzuchtlinie von Pioneer 3906		salzresistent
cv. Helix (Hybride)		salzresistent
cv. Across 8023 (Populationsorte)		salzempfindlich
Material	Abstammung	Eigenschaften
IP-1 (CML-339)	TL-97A 1990-5	postulierte unterschiedliche Toleranz gegenüber osmotischem Stress
IP-2 (CML 340)	TL-97A 1990-9	
IP-3 (CML 341)	TL-97A 1990-6	
IP-4 (CML 342)	TL-97A 1990-7	
IP-5 (CML 343)	TL-97A 1990-11	
IP-6 (CML 344)	TL-98A 1990A-11	
IP-7 (CML 345)	PR-96A 970A-16-17-18	
IP-8 (CML 346)	TL-97A 1990-4	
IP-9 (CML 347)	PR-96B 5972B-4	
IP-10 (CML 348)	TL-97A 1991-5	

Gegenüber osmotischem Stress unterschiedlich tolerante Maisinzuchtlinien wurden von der mexikanischen Organisation "International Maize And Wheat Improvement Center" (CIMMYT) zur Verfügung gestellt.

2.1.1 Erstellung der F₂-Generation

Die genetische Aufspaltung des Merkmals "Natriumexklusion an der Wurzeloberfläche" und "Natriumexklusion am Xylemparenchym" wurde von Schierholt (1995) in der F₂-Population der Hybridsorte Pioneer 3906 untersucht. Dabei ergab sich, wie zu erwarten war, bei

beiden Merkmalen eine starke Aufspaltung in der F₂-Generation, wobei besonders Typen mit wesentlich schlechteren Exklusionseigenschaften gefunden wurden. Während keine Nachkommen mit verbesserter Na⁺-Exklusion an der Wurzeloberfläche auftraten, wurden F₂-Individuen mit verbesserter Na⁺-Exklusion aus dem Spross identifiziert. Es konnte eine deutliche Korrelation zwischen der Salzresistenz und der Intensität der Na⁺-Exklusion festgestellt werden (Schierholt, 1995).

Da kein F₂-Material zur Verfügung stand, war es das Ziel, eine F₂-Population mit hoher genetischer Variabilität in bezug auf die Na⁺-Exklusion zu erstellen. Die Pflanzenanzucht erfolgte in der Vegetationshalle des Instituts für Pflanzenernährung in kleinen Mitscherlich-Gefäßen, in die jeweils 6 kg Kleinlindener Boden eingefüllt wurde. Mit dem Einfüllen des Bodens in die Gefäße erfolgte die Beimengung von 13 g Blaukorn (12/12/17/2/6). Mit dieser Düngergabe wurden pro Gefäß 1,56 g N, 0,68 g P, 1,84 g K, 0,26 g Mg und 0,78 g S zugegeben. Zum Pflanztermin 06.05.1997 wurden je Gefäß drei vorgequollene Samen von der Hybridsorte Pioneer 3906 eingepflanzt. Drei Wochen später wurden die Pflanzen vereinzelt. Sobald die Rispen und Kolben sichtbar waren, wurden die Kolben mit Pergamenttüten eingetütet. Nach der Pollenausschüttung wurden die Pflanzen jeden Tag früh morgens mit eigenem Pollen bestäubt, um das F₂-Material zu erstellen. Die Ernte der F₂-Generation erfolgte mit dem Erreichen des Reifestadiums am 31.10.1997.

2.1.2 Selektion von Inzuchtlinien auf ihre Intensität der Natriumexklusion

Die vierte Inzuchtgeneration (IP-4) wurde in der Vegetationshalle vom 06.06.1997 bis 23.06.1997 in zwei parallelen 125 L Nährlösungswannen angezogen. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben. Die Anordnung der 200 Pflanzen geschah im Quadrat, wobei Pioneer 3906-Pflanzen in den Diagonalen und Pflanzen der Inzuchtlinie dazwischen angeordnet wurden. Die Nährlösung wurde ab dem vierten Tag nach Umsetzen der Pflanzen täglich mit NaCl versetzt.

Die ersten sechs Tage wurde die Konzentration jeweils um 20 mM NaCl und am letzten Tag um 30 mM NaCl auf insgesamt 150 mM NaCl gesteigert.

Schierholt (1995) entwickelte ein Selektionsverfahren, das es erlaubt, innerhalb weniger Wochen aus mehreren hundert Individuen, effizient Na⁺-ausschließende Genotypen zu selektieren. Danach ist der beste Selektionsparameter für die Intensität der Natriumexklusion an der Wurzeloberfläche und am Xylemparenchym bei Mais nach sieben Tagen Salzbehandlung mit 150 mM NaCl die Natriumkonzentration im dritten Blatt. Deswegen wurde sieben Tage nach der vollen Salzbehandlung (150 mM NaCl) von je 200 Pflanzen das dritte Blatt an der Blattbasis abgeschnitten und die Na⁺-Konzentration bestimmt. Die Pflanzen waren zu diesem Zeitpunkt im Fünfblattstadium. Die Individuen mit der niedrigsten Na⁺-Konzentration wurden selektiert. Zusätzlich zu dem Parameter Ionenkonzentration wurde auch der Habitus mit einer minimalen Anzahl an Nekrosen beurteilt. Davon wurden zehn Pflanzen ausgewählt und in Mitscherlich-Gefäße eingepflanzt. Dazu wurden die Pflanzen mit ihrem Wurzelhals in Höhe des Gefäßrandes gehalten, und dann vorsichtig ein auf 2 mm abgeseibter trockener Boden zugegeben. Um bei der Umpflanzung den entstehenden Stress zu minimieren, wurden die Pflanzen sofort für einen Tag in die Klimakammer gestellt. Die Temperatur in der Klimakammer lag während der Belichtungszeit bei 20°C und in der Dunkelphase bei 15°C. Die Anzucht und Selbstung der Pflanzen erfolgte wie unter 2.1.1 beschrieben. Die nach dem gleichen Verfahren wiederholten Selbstungen und Selektionen in 1998 und 1999 lieferten mittlerweile die siebente Inzuchtgeneration (IP-7).

2.2 Pflanzenanzucht

2.2.1 Nährlösungsversuche (Standard)

Für die Nährlösungsversuche wurden Maispflanzen in der Vegetationshalle des Instituts für Pflanzenernährung in Nährlösungskultur angezogen. Für das langfristige NaCl- bzw. Na₂SO₄-Experiment und für

die Plasmalemma-Isolierung wurde dagegen die Anzucht unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer in Nährlösungswannen durchgeführt. Die Maiskörner wurden für 24 h in belüfteter 1 mM CaSO_4 -Lösung bei Zimmertemperatur vorgequollen. Die vorgequollenen Samen wurden auf mit 1 mM CaSO_4 -Lösung angefeuchtetem Filterpapier zwischen Schaumstoffplatten in einer Reihe 1,5 cm vom oberen Rand entfernt in 2 cm-Abständen mit dem Embryo nach unten ausgelegt und anschließend mit einem gleich großen Stück Filterpapier abgedeckt. Bis zu sechs Schichten der in Filterpapier eingebetteten Samen wurden jeweils mit einer zwischenliegenden Schaumstofflage aufeinander gelegt. Das beidseitig mit einer PVC-Platte stabilisierte "Sandwich" wurde mit Klebestreifen zusammengeklebt und senkrecht in eine Wanne mit 1 mM CaSO_4 -Lösung gestellt, so dass die Samen über Schaumstoff und Fließpapier ausreichend mit Lösung versorgt waren. Die Sandwichplatten wurden bei ca. 25°C zunächst für 48 h mit einer schwarzen Folie abgedeckt, um die Belichtung der Keimwurzeln zu vermeiden. Nachdem die Keimlinge sichtbar waren, wurden sie für weitere 48 h belichtet. Danach wurden möglichst gleich große Pflanzen herausgesucht, mit einem 2 cm breiten Schaumstoffstreifen an den Stengeln umwickelt, in den Lochdeckeln der Gefäße fixiert und anschließend in $\frac{1}{4}$ konzentrierte Nährlösung gesetzt. Am darauffolgenden Tag wurde die Nährlösung auf die halbe Konzentration und nach weiteren zwei Tagen auf die volle Nährlösungskonzentration gesteigert. Die Behandlungen wurden jeweils vier Tage nach dem Erreichen der vollen Nährlösungskonzentration begonnen. Die sukzessive Zugabe von Salzen und PEG hatte zum Ziel, einen plötzlichen, starken, osmotischen Schock der Pflanzen zu vermeiden. Die kontinuierlich belüftete Nährlösung wurde alle drei Tage gewechselt. Um eventuell auftretende Temperatur-, Luftfeuchte- und Belichtungsunterschiede auszugleichen, wurden die Gefäße bei jedem Nährlösungswechsel umgestellt. Der pH-Wert der Nährlösung wurde über den gesamten Versuchszeitraum durch Titration mit 0,2 N H_2SO_4 auf 6,0 ($\pm 0,1$) gehalten.

Tab. 1: Zusammensetzung der voll konzentrierten Nährlösung

	Nährstoff	Nährstoffform	Konzentration
Makro	N	Ca(NO ₃) ₂	2,5 mM
	P	KH ₂ PO ₄	0,2 mM
	K*	K ₂ SO ₄	0,5 mM
	Mg	MgSO ₄	0,6 mM
	Ca	CaCl ₂	5,0 mM
Mikro	B	H ₃ BO ₃	1,0 µM
	Mn	MnSO ₄	2,0 µM
	Zn	ZnSO ₄	0,5 µM
	Cu	CuSO ₄	0,3 µM
	Mo	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,005 µM
	Fe	Fe-EDTA	200,0 µM

*Die Konzentration von K betrug insgesamt 1,2 mM

2.2.1.1 Langfristiger Einfluss von NaCl und Na₂SO₄

Der im Folgenden beschriebene Versuch wurde in der Klimakammer unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt. In der Klimakammer betrug die Belichtungsdauer 16 h pro Tag mit einer Lichtintensität von 270 µE m⁻² s⁻¹ in Pflanzenhöhe. Die Temperatur betrug während der Belichtungszeit 25°C und in der Dunkelphase 20°C; die relative Luftfeuchte schwankte zwischen 60 und 70%. Die Maispflanzen der beiden Sorten Pioneer 3906 und Helix wurden wie unter 2.2.1 beschrieben angezogen. Von den beiden Sorten wurden je vier Pflanzen in ein 4,5 L Wasserkulturgefäß umgesetzt. Die Salzbehandlung erfolgte nach Erreichen der vollen Nährlösungskonzentration, indem pro Tag 25 mM NaCl oder 12,5 mM Na₂SO₄ zugegeben wurden, bis eine Endkonzentration von 100 mM Na⁺ erreicht war. Die Kontrolle erhielt weder NaCl noch Na₂SO₄ und jede Variante wurde in dreifacher Wiederholung aufgestellt. Die Nährlösungen wurden alle 2-3 Tage gewechselt und nach 21-tägiger Salzbehandlung erfolgte die Ernte, während die Pflanzen im 8- bis 9-Blattstadium waren. Vor der Ernte wurde bei jeder Variante die Anzahl der nekrotischen Blätter bestimmt.

Der Spross wurde für die Mineralstoffanalysen in 2., 3., 4. Blatt und Restspross separiert. Die Behandlung des Sprosses und der Wurzel entspricht dem Verfahren in 2.3.1.4.

2.2.1.2 Anzucht der F₂-Generation

Dieser Versuch fand in der Vegetationshalle zwischen dem 11.09.1998 und dem 28.09.1998 statt. Die Durchschnittstemperatur der Vegetationszeit betrug 18,1°C. Während dieses Zeitraumes lagen die minimalen/maximalen Temperaturen durchschnittlich bei 11,4°C bzw. 26,0°C. Die Anzucht der Pflanzen wurde wie unter 2.2.1 beschrieben durchgeführt. 100 Keimlinge der F₂-Generation wurden auf eine 125 L-Nährlösungswanne überführt. Die Untersuchungen der Xylemexsudation unter dem Einfluss von steigenden Salzkonzentrationen zeigte, dass schon bei vergleichsweise geringen Konzentrationen von ca. 35 mM NaCl kein Xylemsaft mehr gesammelt werden konnte (Fortmeier, 1996). Deshalb wurde mit einer Salzkonzentration von 20 mM gearbeitet. Diese Konzentration wurde schrittweise wie folgt eingestellt: Ein Tag nach Erreichen der vollen Nährlösungskonzentration wurden in den darauffolgenden zwei Tagen jeweils 7 mM NaCl und am dritten Tag 6 mM NaCl hinzugefügt. Sieben Tage nach der Salzzugabe wurde die Nährlösung gewechselt und die Pflanzen randomisiert, um eventuell auftretende Positionseffekte auszuschließen. K⁺ und NO₃⁻ sind die dominierenden anorganischen Ionen im Xylemsaft (Engels und Marschner, 1993) und tragen somit vornehmlich zum Aufbau des Wurzeldrucks bei. Aus diesem Grund wurde ein Tag vor der Xylemexsudat-Gewinnung zusätzlich 0,5 mM K⁺ als K₂SO₄ in die Nährlösung zugegeben. Am 13. Tag nach Behandlungsbeginn erfolgte die Ernte, während die Pflanzen im 5-Blattstadium waren. Die Gewinnung von Xylemexsudat wurde wie unter 2.3.2.1 beschrieben vorgenommen. Nachdem die Sprossfrischmasse bestimmt war, wurde das jüngste, nicht entfaltete Blatt herauspräpariert, um Na⁺ und Ca²⁺ zu bestimmen. Die Aufbereitung des jüngsten Blattes bzw. des restlichen Sprosses und der Wurzel erfolgte wie unter 2.3.1.4 beschrieben.

2.2.1.3 Anzucht für die Auswahl der gegenüber osmotischem Stress toleranten Maisinzuchtlinien

In diesem Versuch sollten zehn verschiedene Mais-Inzuchtlinien auf Toleranz gegenüber osmotischem Stress untersucht werden. Bei diesem Saatgut handelte sich um dürretolerante Mais-Inzuchtlinien vom CIMMYT. Aus diesen Linien sollten die tolerantesten ausgesucht werden. Als Kontrolle wurde die Hybride Pioneer 3906 und deren sechste Inzuchtgeneration verwendet. Die Pflanzen wurden in 120 L Nährlösungswannen zwischen dem 06.07.1999 und dem 17.07.1999 in der Vegetationshalle angezogen. Während dieses Zeitraumes betrug die Durchschnittstemperatur 23,8°C mit einer durchschnittlichen Maximumtemperatur von 32,1°C und einer durchschnittlichen Minimumtemperatur von 15,4°C. Das Saatgut der verschiedenen Linien wurde entsprechend 2.2.1 vorgequollen und gekeimt. Pro Linie wurden acht Pflanzen in die Wannen umgesetzt. Ab dem vierten Tag nach dem Erreichen der vollen Nährlösungskonzentration wurde NaCl täglich um 25 mM gesteigert, bis die Endkonzentration von 100 mM erreicht wurde. Neun Tage nach Behandlungsbeginn mit NaCl erfolgte die Ernte wie unter 2.3.1.4 beschrieben. Die Pflanzen waren zu diesem Zeitpunkt im 5- bis 6-Blattstadium. Das jüngste Blatt wurde für die Bestimmung des osmotischen Potentials (Kap. 2.3.2.2) herauspräpariert. Die Länge und Breite des vierten Blattes wurde wie unter 2.3.1.3 beschrieben gemessen.

2.2.1.4 Versuch zur Bedeutung der Ionentoxizität in der ersten Phase des Salzstresses

Die Pflanzenanzucht der Hybride Pioneer 3906 erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben. Jedes Gefäß enthielt vier Pflanzen in 4,5 L Nährlösung, die alle drei Tage erneuert wurde. Bei jedem Nährlösungswechsel wurden die 4,5 L-Gefäße umgestellt, um Positionseffekte auszuschließen. Bei allen Versuchen, in denen PEG (Polyethylenglycol) verwendet wurde, mussten die Gefäße mit Alu-Folie umwickelt werden,

um die Erwärmung der Nährlösung zu vermeiden. Neun Tage nach Behandlungsbeginn wurden die Pflanzen geerntet, wobei diese im 5-Blattstadium waren. Im Gegensatz zu den anderen Experimenten wurden die Wurzeln nicht in CaSO_4 -Lösung, sondern nur in dest. Wasser gewaschen. Die Bestimmung von anderen Parametern erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben.

Um einen osmotischen Stress in Nährlösungskultur zu induzieren, wurde Polyethylenglycol mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 6000 (PEG 6000) oder Mannitol (MG: 182,2) der Nährlösung zugegeben. Durch PEG wird das osmotische Potential der Nährlösung herabgesetzt und damit die Wasseraufnahme für die Pflanze erschwert. PEG ist nach Hohl und Schopfer (1991) besonders gut als externes Osmotikum für die Untersuchung von Trockenstressreaktionen geeignet, da es wegen des hohen Molekulargewichts nicht in den Apoplasten oder in die Zellen eindringt, und es keine Hinweise für nicht osmotische Effekte gibt. Weil Mannitol toxisch auf die Maispflanzen wirkte, ausgelöst durch eine apoplastische Aufnahme, und gleichzeitig zu einer Erhöhung der Mikroorganismen-Aktivitäten in der Nährlösung führte, wurde auf eine Behandlung mit Mannitol verzichtet. Um den osmotischen Wert einstellen zu können, wurden vor Versuchsbeginn Eichreihen mit unterschiedlichen Na^+ -, Mannitol- und PEG-Konzentrationen angefertigt und deren Osmolarität nach dem Prinzip der Gefrierpunktserniedrigung (Osmometer: Fa. Roebeling) bestimmt (Abb. 2). Während das osmotische Potential bei NaCl und Mannitol mit steigender Konzentration linear abfiel, fiel bei PEG das osmotische Potential bereits bei geringer Konzentration sehr steil ab (Abb. 2). Aus den Eichkurven konnte die PEG-Menge ermittelt werden, die bei gegebener Na^+ -Konzentration der Nährlösung zur Einstellung eines definierten osmotischen Wertes benötigt wurde.

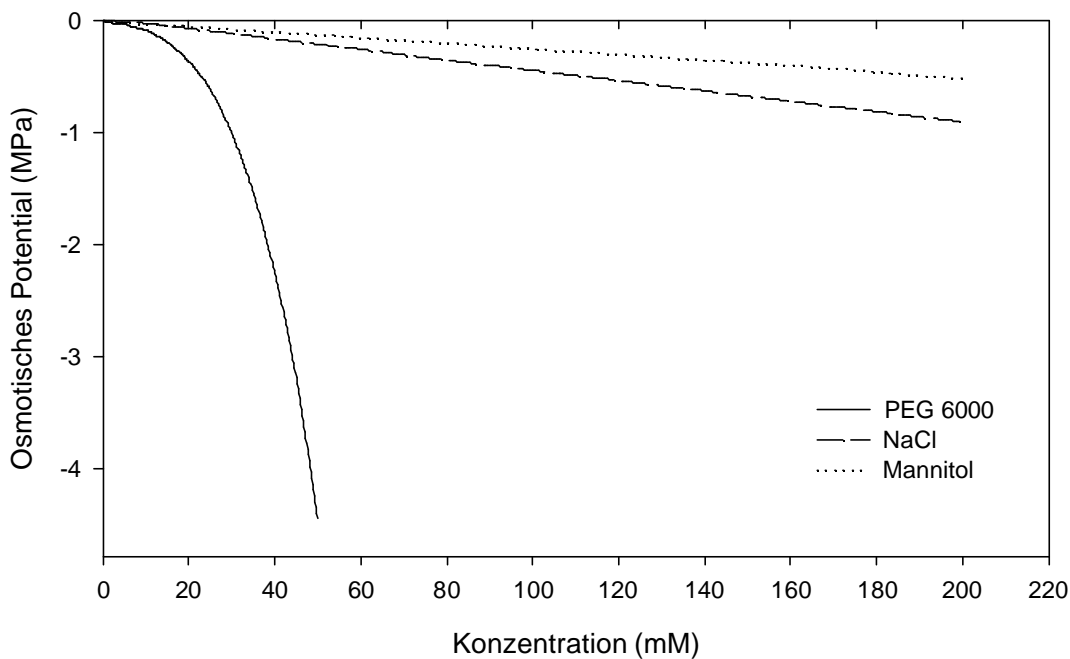


Abb.2: Das osmotische Potential in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen von PEG 6000, NaCl und Mannitol

2.2.1.4.a Einfluss von Dürre- und Salzstress auf das Wachstum von Mais

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte vom 21.07.1998 bis zum 01.08.1998 in der Vegetationshalle. In diesem Zeitraum betrug die Durchschnittstemperatur 23,5°C, wobei eine durchschnittliche Maximumtemperatur von 35,2°C und eine durchschnittliche Minimumtemperatur von 11,9°C erreicht wurde. Jede Variante wurde in siebenfacher Wiederholung aufgestellt. Nach Erreichen der vollen Nährlösungskonzentration wurde mit NaCl-, PEG- oder Mannitol-Behandlung angefangen. Wie in Abb. 2 zu erkennen ist, fällt das osmotische Potential bei PEG mit steigender Konzentration exponentiell ab, wobei das osmotische Potential bei NaCl und Mannitol linear abfällt. Deswegen wurden bei diesen verschiedenen Varianten die Behandlungen täglich wie in Tab. 2 beschrieben gesteigert. Das Wasserpotential betrug in jeder Variante bei voller Stressintensität -0,51 MPa.

Tab. 2: Einfluss der Behandlung mit NaCl, PEG 6000 und Mannitol auf das osmotische Potential (Ψ_s) der Nährlösung

	NaCl	g PEG L ⁻¹	Mannitol	Ψ_s (MPa)
1.Tag	25 mM	60	45 mM	-0,13 ± 0,01
2.Tag	50 mM	93	90 mM	-0,28 ± 0,01
3.Tag	75 mM	114	135 mM	-0,40 ± 0,01
4.Tag	100 mM	129	180 mM	-0,51 ± 0,01

2.2.1.4.b Einfluss von verschiedenen Salzen auf das Wachstum von Mais

Das Experiment wurde vom 13. bis zum 24. August 1998 in der Vegetationshalle mit dreifacher Wiederholung durchgeführt. Die durchschnittliche Temperatur während dieser Versuchszeit betrug 24,3°C, mit einer durchschnittlichen Maximumtemperatur von 35,9°C und einer durchschnittlichen Minimumtemperatur von 12,6°C. Am vierten Tag nach dem Erreichen der vollen Nährlösungskonzentration wurde mit NaCl-, Na₂SO₄- und MgCl₂-Behandlungen angefangen. Bei den verschiedenen Salzlösungen wurde das Wurzelmedium zusätzlich mit PEG auf das gleiche Wasserpotential (-0,51 MPa) eingestellt. Bei den einzelnen Varianten sah die sukzessive Salzzugabe wie folgt aus (Tab. 3):

Tab. 3: Einfluss der Behandlung mit NaCl, Na₂SO₄ und MgCl₂ auf das osmotische Potential (Ψ_s) der Nährlösung

	NaCl	Na ₂ SO ₄ + g PEG L ⁻¹	MgCl ₂ + g PEG L ⁻¹	Ψ_s (MPa)
1. Tag	25 mM	12,5 mM + 21	12,5 mM + 24	-0,13 ± 0,01
2. Tag	50 mM	25 mM + 37,5	25 mM + 42	-0,28 ± 0,01
3. Tag	75 mM	37,5 mM + 45,3	37,5 mM + 52,2	-0,40 ± 0,01
4. Tag	100 mM	50 mM + 51,3	50 mM + 59,7	-0,51 ± 0,01

2.2.1.4.c Einfluss einer variierten K^+ -Konzentration auf das Wachstum von Mais

Dieser Versuch fand in der Vegetationshalle zwischen dem 02.08.1999 und dem 13.08.1999 statt. Die Durchschnittstemperatur der Vegetationszeit betrug $24,2^{\circ}\text{C}$. Während dieses Zeitraumes lagen die min./max. Temperaturen durchschnittlich bei $15,2^{\circ}\text{C}$ bzw. $33,3^{\circ}\text{C}$. Jede Variante wurde in dreifacher Wiederholung aufgestellt. Nach dem Erreichen der vollen Nährlösungskonzentration erfolgte die Zugabe von PEG und NaCl wie in Tab. 2 angegeben. Die K^+ -Konzentrationen in den Nährlösungen wurden bei den PEG-Varianten wie folgt variiert (Tab. 4).

Tab. 4: K^+ -Konzentration in den einzelnen Behandlungen:

(Die Kalium-Reduzierung in der Nährlösung erfolgte in Form von K_2SO_4 . Alle Behandlungen hatten im Wurzelmedium das gleiche Wasserpotential von $-0,51\text{ MPa}$).

Variante	Konzentration in der Nährlösung	
NaCl (1,2 mM K)	100 mM NaCl	1,2 mM K
PEG (1,2 mM K)	129 g PEG L ⁻¹	1,2 mM K
PEG (1,0 mM K)	129 g PEG L ⁻¹	1,0 mM K
PEG (0,8 mM K)	129 g PEG L ⁻¹	0,8 mM K
PEG (0,6 mM K)	129 g PEG L ⁻¹	0,6 mM K
PEG (0,4 mM K)	129 g PEG L ⁻¹	0,4 mM K

2.2.1.4.d Einfluss der Na^+/K^+ -Interaktion auf die Plasmalemma- H^+ -ATPase-Aktivität in Maisblättern

Für die Plasmalemma-Isolierung erfolgte die Anzucht der Hybride Pioneer 3906 ausschließlich in der Klimakammer unter kontrollierten Bedingungen. Die Lichtdauer betrug 16 h am Tag mit einer Intensität von $400\text{-}500\ \mu\text{E m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ in Pflanzhöhe. Die Temperatur lag bei 25°C am Tag und 20°C in der Nacht. Die Luftfeuchtigkeit schwankte zwischen 60 und 70%. Die Pflanzenanzucht erfolgte ebenfalls wie unter 2.2.1 beschrieben. Es wurden etwa 360 Keimlinge auf ein Gitter in $\frac{1}{4}$

konzentrierter Nährlösung (50 L) umgesetzt. Da unter natürlichen Bedingungen immer etwas NaCl im Boden vorhanden ist, wurde am nächsten Tag 1 mM NaCl in die Nährlösung hinzugefügt. Nachdem sich die Pflanzen zwei Tage in $\frac{1}{4}$ konzentrierter Nährlösung befanden, erfolgte die Ernte der Sprosse zur Plasmalemma-Isolierung (Kap. 2.3.3). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Pflanzen im 2-Blattstadium.

2.2.2 Bodenversuche

2.2.2.1 Bodenvorbereitung

Um einen salinen Boden herzustellen, wurde eine leicht modifizierte Methode von Barzegar et al. (1997) verwendet. Als Versuchsboden wurde ein sandiger Lössboden vom Standort "Kleinlinden" ausgewählt. Der luftgetrocknete Boden wurde durch ein 2,5 mm Sieb gesiebt und ganz dünn auf eine Plastikfolie ausgebreitet. Der Grad der Versalzung eines Boden wird eingeteilt nach seiner elektrischen Leitfähigkeit, ausgedrückt in dS m^{-1} , und steigt mit zunehmender Elektrolytkonzentration in der Bodenlösung an. Zum Erzielen einer bestimmten elektrischen Leitfähigkeit im Boden wurde die zugegebene Menge an NaCl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Na}^+ (\text{mg kg}^{-1}) = [\text{Na}^+\text{-Konzentration (mmol L}^{-1}) * \text{AG}_{\text{ion}} * \text{WK}_{\text{max}} * 10] / 1000$$

AG_{ion} : Atomgewicht vom Ion (Na^+ : 23)

WK_{max} : Maximale Wasserkapazität (für Klein-Lindener Boden 35%)

Auf diese Weise konnte die Menge an NaCl pro kg Boden errechnet werden:

2 dS m^{-1} : 40,95 mg NaCl kg^{-1} Boden

4 dS m^{-1} : 81,90 mg NaCl kg^{-1} Boden

6 dS m^{-1} : 122,85 mg NaCl kg^{-1} Boden

8 dS m^{-1} : 163,80 mg NaCl kg^{-1} Boden

Die für jeweils 50 kg Boden berechnete NaCl-Menge wurde in 5 L dest. Wasser gelöst und auf den ganz dünn ausgebreiteten Boden mit einer Druckluftspritze versprüht. Nachdem die Bodenoberfläche getrocknet war, wurde der Boden gemischt und wieder ausgebreitet. Das Verfahren wurde 3-4 mal fortgesetzt, bis die ganze Salzlösung auf den Boden gesprüht war. Am Ende wurde der Boden noch einmal mit dest. Wasser genässt, um eine homogene Verteilung des Salzes im Boden zu gewährleisten. Anschließend wurde der Boden luftgetrocknet. Zur Kontrolle wurde bei diesem vorbereiteten salinen Böden die elektrische Leitfähigkeit gemessen.

2.2.2.2 Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit

Durch Bestimmung der Leitfähigkeit erhält man eine Information über die Menge freier Ionen in der Bodenlösung. Dazu wurden 300 g Boden in Plastikgefäßen eingewogen, 105 mL dest. Wasser zugegeben und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde der Boden mehrmals kräftig durchgemischt. Die Bodenpaste wurde mit Weißbandfilter über einen Büchnertrichter mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Membranpumpe) filtriert. Aus den gewonnenen Bodenextrakten erfolgte die Messung der Leitfähigkeit mit einem "Digital Conductivity Meter" der Firma Neukum-Elektronik NE-6213.

2.2.2.3 Anzucht der Pflanzen in Boden

Die Pflanzenanzucht erfolgte in der Vegetationshalle in Ahr-Gefäßen, in die jeweils 12 kg Boden mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen [Kontrolle (ohne Salz), 2, 4, 6, und 8 dS m⁻¹] eingefüllt wurde. Als Grunddüngung wurde in die Gefäße 30 g Blaukorn appliziert (12/12/17/2/6). Als Versuchspflanzen wurden die salzresistente Maishybride Pioneer 3906, deren siebente Inzuchtgeneration und die salzempfindliche Populationssorte Across 8023 verwendet. Jede Variante wurde in achtfacher Wiederholung angelegt. Vier Samen wurden am 07.05.2000 direkt in die vorbereiteten Gefäße ausgesät. Bei diesen Böden wurde für die Bewässerung auch die maximale

Wasserkapazität bestimmt. Die Gefäße wurden täglich gewogen und anschließend auf 70% der max. Wasserkapazität mit dest. Wasser aufgeossen. Um Standorteffekte auszuschließen, wurden die Gefäße wöchentlich umgestellt. Weil das Wachstum bei der Sorte Across fast doppelt so hoch war wie bei der Hybride Pioneer 3906, wurden nach dem Vereinzeln der Pflanzen die Pioneer 3906-Varianten mit 15 g Blaukorn, die Across 8023-Varianten mit 30 g Blaukorn nachgedüngt. Die Inzuchtgeneration wurde nicht nachgedüngt, weil die Wüchsigkeit sehr gering war.

2.2.2.4 Durchführung der Ernten

Die Ernte der Pflanzen erfolgte am 28-29.06.2000 in der vegetativen Phase. Kurz vor der Ernte wurde die Wuchshöhe der Pflanzen bestimmt. Nachdem die Sprossfrischmasse ermittelt war, wurde der Spross bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Für die Auswaschung der Wurzeln aus dem Boden wurden die Gefäße zuerst befeuchtet, so dass der Boden mit den Wurzeln aus den Gefäßen ohne Schädigung herausgenommen werden konnte. Über einem Sieb wurde dann der Boden mit einem sanften Wasserstrahl entfernt. Die Wurzeln wurden danach in Gefäße mit Wasser überführt und durch mildes Schütteln und mittels einer Pinzette kleine anhaftende Bodenteilchen entfernt. Die Wurzeln wurden 10 min in dest. Wasser ausgewaschen und mit der CaSO₄-Lösung wie unter 2.3.1.4 beschrieben behandelt. Im Spross und in der Wurzel wurden die Mineralstoffanalysen von Na⁺, K⁺, Ca²⁺ und Cl⁻ durchgeführt und anhand der Na⁺-Werte die Intensität des Natriumexklusionsvermögens von Maispflanzen berechnet (s. 2.3.2.4).

2.3 Pflanzenanalysen

2.3.1 Bestimmung von Parametern für Dürre- und Salzstress

2.3.1.1 Blattlänge und -breite

Bei kurzfristigem Salzstress bzw. von Salz ausgelöstem physiologisch-osmotischem Stress wird das Streckungswachstum als empfindlichster Parameter angesehen (Cramer et al., 1991). Aus diesem Grund wurde das Blattwachstum als wichtiger Parameter mitbeurteilt. Da sich das vierte Blatt zu Beginn der verschiedenen Behandlungen noch im Entwicklungsstadium befand, wurde bei jeder Variante fünf, sieben, und neun Tage nach Behandlungsbeginn von der Blattbasis an die Länge und zusätzlich die Breite des vierten Blattes mit dem Lineal gemessen. Anschließend wurde aus dem Produkt der Länge und Breite ein Blattflächenparameter gebildet.

2.3.1.2 Transpirationsmessung

Zur Bestimmung der Transpiration wurden Gefäße mit je vier Versuchspflanzen und ein Gefäß ohne Pflanzen 24 h vor der Ernte, während der Mittagszeit stündlich zwischen 12⁰⁰–15⁰⁰ gewogen. Dadurch konnte der Wasserverlust der Pflanzen pro Gefäß ermittelt werden.

2.3.1.3 Blattfläche

Kurz vor der Ernte wurde das vierte Blatt 2 cm oberhalb der Blattbasis herauspräpariert und die Fläche mit dem Blattflächenmessgerät gemessen. Dazu wurde die Gesamtblattfläche als schwarze Fläche gegenüber dem Hintergrund mittels einer Standard-CCD-Kamera (Sony XC57CE) aufgenommen und dieses Areal mit Hilfe eines Bildverarbeitungssystem in mm² gemessen (Delta-Image Analysis System, Cambridge, UK).

2.3.1.4 Frisch- und Trockengewicht

Jede Pflanze wurde in Spross und Wurzel getrennt. Die Wurzeln wurden nach kurzem Abspülen mit destilliertem Wasser dreimal in 0,5 mM CaSO_4 -Lösung jeweils für fünf min gewaschen, um apoplasmatisches Na^+ und K^+ auszutauschen. Nach vorsichtigem Abtrocknen zwischen Fließpapier erfolgte die Frischgewichtsbestimmung. Daraufhin wurden die Wurzeln bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann die Trockenmasse bestimmt. Nachdem die Sprossfrischmasse bestimmt war, wurde der Spross ebenfalls bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschließend das Trockengewicht bestimmt. Anschließend wurde das getrocknete Pflanzenmaterial mit einer Scheibenschwingmühle der Firma Retsch fein vermahlen. In diesem Pflanzenmaterial wurden Kationen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+}) und Anionen (Cl^- und SO_4^{2-}) analysiert.

2.3.1.5 Histologische Untersuchungen

Für die histologischen Untersuchungen dienten ca. 3 mm^2 große Blattstücke, die vom jüngsten Blatt stammten. Von jeder Pflanze wurden jeweils drei mal fünf Blattquerschnitte untersucht und Mittelwerte gebildet, so dass insgesamt von jeder Variante drei Mittelwerte (von insgesamt 15 Blattquerschnitten) in die Auswertung einbezogen werden konnten. Von der Blattbasis ab wurden die unteren 0,5 cm des Blattes verwendet, hierbei handelte es sich um die Streckungszone. Die Blattpräparate wurden in einer 1,5%igen (v/v) Glutardialdehydlösung in 0,05 M Phosphat-Puffer (pH 7,2) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Blattmaterial für 2 h in 1%iger (v/v) Osmiumtetroxid-Puffer-Lösung nachfixiert. Die Blattproben wurden nach der Fixierung mit einer aufsteigenden Acetonreihe (70%, 80%, 90%, 95% und 100% über Molekularsieb) entwässert. Die Einbettung erfolgte in frisch angesetztem Spurr' schem Harz in Flacheinbettungskunststoffschalen. Das Einbettungsmittel polymerisierte 8 h bei 60°C im Trockenschrank.

Das Schneiden der auf diese Weise eingebetteten Objekte erfolgte an einem Reichert Ultramikrotom "Om U2" unter Verwendung von Glasmessern. Für lichtmikroskopische Aufnahmen wurden die 0,5 µm dicken Semi-Dünnschnitte für ca. 1 min mit Methylenblau (in 2% Ethanol) auf der Heizplatte bei 60°C angefärbt.

Mit einer Digital-Kamera "3CCD-Color Vision Camera Module" an einem Olympus Forschungsmikroskop "AX70" mit einer 100-fachen Vergrößerung wurden Bilder von den Schnitten erstellt und mit Unterstützung der Computersoftware "Soft Imaging System" die Blatt- und Epidermisdicke gemessen. An jedem Präparat sind zehn Messungen durchgeführt worden.

2.3.2 Mineralstoffanalysen

2.3.2.1 Gewinnung von Xylemexsudat

Zur Gewinnung der Xylemflüssigkeit wurde der Spross auf ca. 2 cm Höhe abgeschnitten. Die in den ersten 15 min gesammelten Tröpfchen wurden verworfen. Danach wurde auf den nach der Ernte verbliebenen Sprossteil ein 5 cm langer elastischer Silikonschlauch aufgesetzt und am unteren Ende mit einem plastischen Abdichtband (Terostat) umwickelt. Am Tag vor der Ernte war das jeweils älteste Blatt entfernt worden, damit der Silikonschlauch vollständig abdichtete. Das Exsudat wurde nach 2 h mit einer Pasteurpipette in einem Eppendorfgefäß gesammelt und dann gewogen, um die exakte Menge zu bestimmen.

2.3.2.2 Bestimmung des osmotischen Potentials

Zur Bestimmung des osmotischen Potentials (Ψ_s) wurden die jüngsten Blätter in 2-mL-Plastikspritzen eingebracht, durch den Stempel verschlossen und die Plastikspitze mit Terostat verschlossen. Im Anschluss wurden die Blätter in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C für die spätere Messung gelagert. Bis zum Zeitpunkt des Auspressens wurde der Ausgang der Spritze mit Terostat verschlossen gehalten, um eine Kondensation der Luftfeuchtigkeit innerhalb der

Spritze zu vermeiden. Vor der Bestimmung des osmotischen Potentials wurden die Blattproben aufgetaut und durch Zusammendrücken auf den Stempel der Spritze Presssaft gewonnen. Von der Presssaftprobe wurden 25 µL entnommen und in 100 µL Eppendorf-Gefäße gegeben. Die Bestimmung des osmotischen Potentials im Presssaft erfolgte nach dem Prinzip der Gefrierpunktniedrigung. Aus dem vom Osmometer (Digitales-Mikro-Osmometer, Firma Roebeling) angezeigten Wert lässt sich mit Hilfe folgender Formel das osmotische Potential berechnen:

$$\Psi_s = \text{osmol} * R * T \quad (-\text{bar})$$

osmol: Osmolarität

R: 0,083141

T: absolute Temperatur

$$-\text{bar} / 10 = -\text{MPa}$$

2.3.2.3 Messung von verschiedenen Kationen und Anionen

2.3.2.3.a Kationenbestimmung

Es wurden 50 – 500 mg feingemahlene Trockensubstanz in Porzellantiegel eingewogen und über Nacht bei 520°C im Muffelofen verascht. Nach dem Abkühlen wurde die Asche mit einigen Tropfen destillierten Wassers angefeuchtet, in 5 mL HNO₃ (1:3) aufgenommen und auf der Heizplatte kurz erhitzt. Die Lösung wurde durch ein Weißbandfilter mit heißem, destilliertem Wasser quantitativ in einen 50 mL-Messkolben filtriert. Nach der Zugabe von 5 mL 1%ige Cäsium-Lanthan-Pufferlösung, durch die die Bildung von unlöslichen Mg- und Ca-Phosphaten verhindert wird, wurden die Kolben mit destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt und bei +8°C im Kühlschrank gelagert. Die Bestimmung der Natrium-, Kalium-, Calcium-, und Magnesiumkonzentration erfolgte nach Kalibrierung mit entsprechenden Standards mittels Atom-Absorptions-Spektrometer (Perkin-Elmer 5000 und Varian, SpectrAA 220 FS). Die Kationen im Xylemsudat und im Presssaft (bei 14000 g zentrifugiert) konnten direkt nach Zugabe von verdünnter HNO₃ (1:3) und 1%iger LaCl₃-Lösung bestimmt werden.

2.3.2.3.b Anionenbestimmung

Für die Anionenbestimmung wurden 200 mg fein gemahlene Pflanzentrockenmasse in 50 mL-Messkolben eingewogen, mit ca. 30 mL dest. Wasser versetzt und im Schüttelwasserbad bei 90°C für 3 h extrahiert. Nach dem Abkühlen wurde mit destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt und durch Weißbandfilter filtriert. Die Extrakte wurden entweder sofort für die Messung der Anionen eingesetzt, oder bis zur Messung im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt. In dem Filtrat konnte dann direkt das Chlorid potentiometrisch mit Hilfe eines Chloridtitrators (American Instrument Company) gemessen werden. Prinzip dieser Methode ist, die Konzentration von Chlorid-Ionen in Lösungen durch Titration mit Silber quantitativ zu bestimmen.

Chlorid und Sulfat wurden als Anionen mittels Leitfähigkeitsdetektor (Ionenchromatograph 4000i, Dionex) mit angeschlossenen Integrator (Typ SP 4270, Spectra Physics) aus dem gleichen Extrakt bestimmt. Nach Verdünnung auf 1:10 oder 1:20 wurde die Extraktlösung mittels Reversed-Phase-Octadecylsilan C₁₈-Kartuschen gereinigt, damit keine Verunreinigung auf die Trennsäule gelangte. Die Anionen wurden anschließend ionenchromatographisch aufgetrennt (Säule: AS4, Dionex). Der Eluent bestand aus einem Gemisch von 1,7 mM NaHCO₃ und 1,8 mM Na₂CO₃.

2.3.2.4 Berechnung der Intensität der Natriumexklusionsmechanismen

Bezieht man die gesamte von der Pflanze aufgenommene Na⁺-Menge auf die Wurzeloberfläche, so enthält man ein Maß für die Na⁺-Exklusion an der Wurzeloberfläche. Da die Wurzeloberfläche aber nur aufwendig zu bestimmen ist, wird die aufgenommene Na⁺-Menge auf die Wurzeltrockenmasse bezogen. Die Intensität der Na⁺-Exklusion an der Wurzeloberfläche wurde also folgendermaßen berechnet:

Na⁺-Menge in der Gesamtpflanze (Spross + Wurzel) / Wurzeltrockenmasse

Die Einheit der Intensität der Exklusion an der Wurzeloberfläche ist: mg Na⁺ Gesamtpflanze / g Wurzel-TM (Schubert, 1990).

Um die empfindlichen Blätter vor Na⁺ zu schützen, können in die Pflanze aufgenommene Natriumionen, wie in der Einleitung erwähnt, aus den Xylemgefäßen in die Xylemparenchymzellen absorbiert werden. Die Intensität der Exklusion am Xylemparenchym lässt sich nach Schubert (1990) folgendermaßen berechnen:

Na⁺-Menge Spross / Na⁺-Menge Wurzel

2.3.2.5 Graphische Darstellung der Mineralstoffkonzentrationen

Als Grenzwert wird im Folgenden der untere Wert einer ausreichenden Nährstoffversorgung der voll entwickelten Blätter von Mais bei einer Höhe von 40-60 cm bezeichnet (nach Bergmann, 1992). Der in einigen Abbildungen dargestellte Vergleich zwischen diesem Grenzwert und den eigenen Messergebnissen (bezogen auf Gesamtspross oder jüngstes Blatt und Restspross) dient lediglich der Einordnung des Ernährungszustandes der Maispflanzen. Es kann aber keine eindeutige Aussage über den Ernährungszustand der in dieser Arbeit angezogenen Maispflanzen getroffen werden, da die von Bergmann (1992) angegebenen ausreichenden Mineralstoffgehalte für voll entwickelte Maisblätter bei einer Pflanzenhöhe von 40-60 cm gelten. Der in dieser Arbeit angezogene Mais erzielte lediglich in zwei Versuchen (Kap. 2.2.1.1, 3.1.1 und 2.2.2, 3.1.5) dieses Entwicklungsstadium, ansonsten wurden die Maispflanzen im 5- bis 6-Blattstadium bei einer Höhe von 20-30 cm geerntet.

2.3.3 Isolierung von Plasmalemma-Vesikeln

2.3.3.1 Plasmalemma-Isolierung

Für die Isolationsmethode aus den Maisblättern diente das Verfahren der Plasmalemma-Isolation aus Lupinenwurzeln (Yan et al., 2002). Die Pflanzen wurden wie unter 2.2.1.4.d beschrieben angezogen. Die Isolation erfolgte an zweitägigen Sprossen, da diese einen größeren

Anteil an Streckungswachstumszonen enthalten. Am Erntetag wurde der Maisspross etwa 1-2 cm oberhalb des Korns abgeschnitten und zweimal in eiskaltem, destilliertem Wasser gewaschen. 50 g Sprossfrischmasse wurden unter Zugabe von 200 mL kalter Homogenisationslösung in einem Blender so lange homogenisiert, bis eine homogene Suspension entstand.

Die Homogenisationslösung hatte folgende Zusammensetzung:

250 mM	Saccharose
250 mM	Kaliumjodid (KI)
2 mM	Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)
10% (v/v)	Glycerin
0,5% (w/v)	Bovines Serumalbumin (BSA)
50 mM	1,3-Bis[tris(hydroxymethyl)methylamin]propan (BTP) mit MES (4-Morpholinethansulfonsäure) auf pH 7,8 eingestellt
2 mM	Dithiothreitol (DTT)
1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
5 mM	2-Mercaptoethanol

Die Reagenzien DTT, PMSF und 2-Mercaptoethanol wurden am Tag der Isolation frisch in die am Vortag bereitete Homogenisationslösung zugegeben. Anschließend erfolgte eine Filtration der entstandenen Suspensionslösungen durch zwei Lagen Zellstoff (Miracloth), um Zellwandfragmente, unvollständig zerstörte Gewebereste und große Zelltrümmer zu entfernen (Sandelius und Morré, 1990). Alle weiteren Arbeitsschritte außerhalb der Zentrifuge wurden auf Eis durchgeführt. Um Stärkekörner, Zellkerne und unbeschädigte Plastiden bzw. Mitochondrien aus dem Filtrat zu entfernen, wurde zunächst 10 min bei 11500 g und 0°C in der Ultrazentrifuge (Sorvall Ultra 80 & Combi plus von DuPont) mit dem Swing out-Rotor (AH-629 36 mL) zentrifugiert. Dieser Überstand wurde dekantiert und anschließend bei 87000 g und 0°C für 35 min nochmals zentrifugiert, um die Zellmembran von löslichen Proteinen zu trennen. Die hieraus gewonnene mikrosomale Membranfraktion wurde anschließend in 5 mL Phosphat-

Puffer (250 mM Saccharose, 3 mM KCl und 5 mM KH_2PO_4) resuspendiert.

Um die Plasmamembran aus der mikrosomalen Membranfraktion abtrennen zu können, führte man eine modifizierte Zwei-Phasen-Trennung mittels Dextran T 500 und PEG 3350 durch.

Das Zwei-Phasen-System hatte folgende Zusammensetzung:

6,1% (w/w)	Dextran T 500 und PEG 3350
250 mM	Saccharose
3 mM	KCl
5 mM	Kaliumphosphat-Puffer (K_2HPO_4 und KH_2PO_4 pH 7,8)

Die Phasentrennung erfolgte dreimal in der Zentrifuge bei 720 g und 4°C. Dabei betrug die Zentrifugationsdauer 23, 15 und 10 min. Nach jeder Zentrifugation wurden 90 bis 95% der oberen PEG-Phase, die die Plasmamembran enthält, abgenommen und mit den vorherigen Zentrifugationsschritten vereinigt. Bei der Methode von Yan et al. (2002) wurden anschließend die unteren Dextran-Phasen noch einmal mit PEG extrahiert, um so die Ausbeute an Plasmalemma zu erhöhen. Auf diesen Schritt wurde bei dieser Arbeit verzichtet, da es bei den Untersuchungen an Maisblättern auf eine möglichst reine Plasmalemma-Fraktion ankam. Der Grund dafür ist, dass in der unteren Dextran-Phase von Blätterproben sich Endoplasmatisches Reticulum, Mitochondrien- und Golgi-Membranen befinden, die die Reinheit der Plasmamembran-Fraktion negativ beeinflussen (Yoshida et al., 1985). Anschließend wurde die obere Phase mit der Phosphat-Pufferlösung mindestens fünffach verdünnt und bei 131 100 g und 4°C 40 min zentrifugiert. Das so erhaltene Plasmalemma-Pellet wurde in BTP/MES-Pufferlösung (250 mM Saccharose, 3 mM KCl und 5 mM BTP mit MES auf pH 7,8 eingestellt) resuspendiert, ebenso verdünnt und nochmals wie oben für 40 min zentrifugiert. Eventuell noch im Pellet vorhandenes Phosphat sollte durch diesen Vorgang ausgewaschen werden, um Verfälschungen der folgenden Phosphatmessungen zu verhindern. Das gereinigte Plasmalemma-Pellet wurde anschließend in BTP/MES-Puffer resuspendiert und in Aliquoten in

flüssigem Stickstoff gelagert. Die Membran-Isolationen aus den Maisblättern erfolgten aus vier unabhängigen Anzuchten.

2.3.3.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinmenge in den isolierten Plasmalemma-Suspensionen erfolgte nach kolorimetrischem Prinzip mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bradford, 1976).

Das Proteinreagenz hatte folgende Zusammensetzung:

0,01% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G-250
4,7% (w/v)	Ethanol
8,5% (w/v)	Phosphorsäure

Zur Messung wurden 100 μL der zu untersuchenden Membransuspension mit 5 mL Proteinreagenz gut durchgemischt. Nach ca. 40 min fand die Messung der Absorption von Proben und Standards in Einwegküvetten am Spektralphotometer (Cary 4, der Firma Varian) bei 595 nm statt. Die Proteinmenge diente als Berechnungsgrundlage, um die eingesetzte Membranmenge zu quantifizieren.

2.3.4 Enzymatische Untersuchungen

2.3.4.1 Messung der ATPase-Aktivität

Die Messung der Aktivität der Plasmalemma- H^+ -ATPase beruht auf der kolorimetrischen Bestimmung des von diesem Enzym freigesetzten Phosphats aus angebotenen ATP während eines bestimmten Zeitraumes.

Die Reaktionslösung (500 μL) enthielt folgende Konzentrationen:

30 mM	BTP mit MES auf pH 6,5 eingestellt
5 mM	MgSO_4
50 mM	KCl
0,02% (w/v)	Brij 58
5 mM	Na_2ATP

Um den Reinheitsgrad der Membranfraktionen zu bestimmen, wurde die ATPase-Aktivität unter Zusatz verschiedener Enzym-Inhibitoren gemessen.

Bei Zugabe von Inhibitoren hatten diese die folgenden Konzentrationen:

<u>Konz.</u>	<u>Hemmstoff</u>	<u>zu hemmendes Enzym</u>
50 mM	KNO ₃	Tonoplasten-ATPase
1 mM	NaN ₃	Mitochondrien- (Thylakoid-) ATPase
1 mM	Na ₂ MoO ₄	saure Phosphatase
0,1 mM	Na ₃ VO ₄	Plasmalemma-ATPase

Für die Blindproben (Verwendung von gekochter Membransuspension) und die Kontrollproben wurde die Inhibitorenlösung durch bidestilliertes Wasser ersetzt. In 470 µL Reaktionslösung wurden 30 µL Membransuspension gegeben, in der 1 bis 3 µg Protein enthalten waren. Durch sofortiges Mischen und Einsetzen der Küvette in ein 30°C warmes Wasserbad wurde die Reaktion gestartet. Jeweils 30 min nach Start der Enzymreaktion konnte diese durch Zugabe von 1 mL der Stop-Lösung (5% (w/v) Natrium-Dodecyl-Sulfat; 0,7% (w/v) Ammonium-molybdat; 2% konzentrierte H₂SO₄) und 50 µL 10% (w/v) Ascorbinsäure beendet werden. Anschließend wurde 1,45 mL Arsenit-Reagenz (2% (w/v) Natrium-Citrat-Dihydrat; 2% (w/v) Natrium-Metaarsenit; 2% (w/v) Eisessig) in die Küvetten gegeben, um überschüssiges Molybdat in der Lösung zu komplexieren (Baginski et al., 1967). Nach weiteren 30 min wurde die Absorption bei 820 nm im Spektralphotometer (Cary 4, der Firma Varian) gemessen. Für jede Bestimmung erfolgte die Messung in drei Parallelen, aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Da die Plasmalemma-H⁺-ATPase-Aktivität spezifisch durch Vanadat gehemmt werden kann, lässt sich die Aktivität aus der Differenz der Aktivität zwischen Messung der Inhibitorkomplexlösung mit Vanadat und Messung der Inhibitor-komplexlösung ohne Zugabe von Vanadat errechnen.

Die Inhibitor-Komplexlösung ohne Vanadat enthielt:

Nitrat (50 mM)

Azid (1 mM)

Molybdat (1 mM)

Die Inhibitor-Komplexlösung mit Vanadat enthielt noch zusätzlich 0,1 mM Vanadat.

Um den Einfluss von Na⁺-K⁺-Interaktionen auf die H⁺-ATPase-Aktivität zu studieren, erfolgte die Salzzugabe bei alle Varianten *in vitro*. Das Reaktionsmedium enthielt die für die jeweils verschiedenen Versuchsansätze folgenden Salzangebote:

<u>Na⁺/K⁺ (mM)</u>	<u>Salzmenge und -form</u>
0/100	50 mM KCl + 50 mM KNO ₃
25/75	25 mM NaCl + 25 mM KCl + 50 mM KNO ₃
50/50	50 mM NaCl + 50 mM KNO ₃
75/25	50 mM NaCl + 25 mM NaNO ₃ + 25 mM KNO ₃
100/0	50 mM NaCl + 50 mM NaNO ₃

2.3.4.2 Messung der Pumpaktivität an *inside out*-Vesikeln

Die Pumpaktivität der H⁺-ATPase des Plasmalemmas aus Maisspross wurde mit Hilfe des hydrophoben Farbstoffs Acridin Orange (AO) gemessen. AO kann im ungeladenen Zustand die Membran frei passieren. Wird jedoch die Aminogruppe dieser schwachen Base im Membranvesikel protoniert, so wird AOH am Membrandurchtritt gehindert (Briskin, 1990). Dadurch akkumuliert der Farbstoff im Vesikel und es kommt zu einer raschen Absorptionsabnahme ("Quench"). Die Anfangsrate der Absorptionsabnahme ("Initial Rate", IR) ist proportional zur Geschwindigkeit, mit der Protonen durch die Membran transportiert werden (Bennett und Spanswick, 1983). Das Ausmaß dieses Absorptions-Quenchs ist proportional zur Größe des aufgebauten ΔpH (innen sauer) zwischen Vesikel und Medium (Fortmeier, 2000). Die Messung wurde mit *inside-out*-Vesikel

durchgeführt. Das Detergenz Brij 58 wurde benutzt, um *inside-out*-Vesikel zu bilden (Johansson et al., 1995).

Die Reagenzlösung (1,5 mL) hatte folgende Zusammensetzung:

5 mM	BTP mit MES auf pH 6,5 eingestellt
100 mM	KCl
0,05% (w/v)	Brij 58
0,001% (w/v)	Valinomycin
7,5 μ M	Acridin Orange (AO)
50 μ g	Membranprotein in 1,5 mL Endvolumen

Das Membranprotein (in BTP/MES-Puffer) wurde erst zugegeben, nachdem die Reaktionslösung in einer Küvette im Spektralphotometer (Cary 4, der Firma Varian) durch ein angeschlossenes Wasserbad auf 25°C erwärmt worden war. Nach etwa 20 min hatte sich ein Gleichgewicht und damit eine Basislinie der Absorption bei 492 nm eingestellt. Die Pumpaktivität der H⁺-ATPase wurde als Quenching der Acridin Orange-Absorption in der ersten min nach Starten ("Initial Rate") der H⁺-ATPase durch Zugabe von Mg-ATP (Mischung aus MgSO₄ und Tris-ATP; mit BTP auf pH 6,5 eingestellt; Endkonzentration im Ansatz 5 mM) erfasst. Nachdem sich ein Gleichgewicht (50 min nach der Zugabe des Mg-ATP) in H⁺-In- und -Efflux eingestellt hatte, wurden 10 μ L Gramicidin zu der Reaktionslösung zugegeben und somit der aufgebaute Δ pH abgebaut, indem die Membran für die H⁺ durchlässig wurde. Der maximale pH-Gradient wurde als Quenching der Acridin Orange-Absorption nach Erreichen des Gleichgewichts erfasst. Das maximale Δ pH setzt sich aus der Differenz zwischen der niedrigsten und der größten AO-Absorption zusammen. Um den Einfluss von Salz auf die Pumpaktivität zu studieren, erfolgte die Salzzugabe, wie unter 2.3.4.1 beschrieben, bei allen Varianten *in vitro*.

2.4 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des t-Testes des Software-Programms "Sigma Stat, Version 4.01" von Jandel Scientific. Die Streuung wurde durch den Standardfehler angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten wurden bei der graphischen Darstellung im Ergebnisteil mit Sternen gekennzeichnet.

- * Irrtumswahrscheinlichkeit bei $P \leq 5,0\%$
- ** Irrtumswahrscheinlichkeit bei $P \leq 1,0\%$
- *** Irrtumswahrscheinlichkeit bei $P \leq 0,1\%$

2.5 Liste der verwendeten Chemikalien

Mit Ausnahme der Nährlösungen für die Pflanzenanzucht, die mit chemisch reinen Salzen angesetzt wurden, fanden nur analysenreine Chemikalien Verwendung. Die folgende Liste gibt einen Überblick über Reinheit und Bezugsquelle der eingesetzten Chemikalien.

AO = Acridin Orange (3,6-Bis[Dimethylamin]Acridin-Base): ca. 95% Farbstoffgehalt; Sigma

Ammonium-Molybdat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$): 82,3% MoO_3 ; Sigma

L-Ascorbic Acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$): mind. 99,7% Reinheit; Sigma

Brij 58 (Polyoxyethylen-20-Cetylother); Sigma

BSA (Bovines Serumalbumin): fettsäurefrei, $\approx 96\%$ Albumin; Sigma

BTP (1,3-Bis[tris(hydroxymethyl)methylamin]propan): mind. 99% Reinheit (Titration); Sigma

Cäsiumchlorid-Lanthanchlorid ($\text{CsCl} + \text{LaCl}$); Merck

Coomassie Brilliant Blue G-250: Calbiochem Corp., La Jolla

Dextran T 500: durchschnittliches Molekulargewicht = 485 000 g/mol; Sigma

DTT (DL-Dithiothreitol): mind. 99% Reinheit (Titration); Sigma

EGTA (Ethylenglycol-bis(β -Aminethylether)N,N,N',N'-Tetraessigsäure): 97% Reinheit (Titration); Sigma

Glutaraldehyd: f. EM.; Plano

Glycerin: 99,9% Reinheit; Sigma

Gramicidin D: von *Bacillus brevis*, 1080 μg Gramicidin mg^{-1} ; Sigma

Kaliumchlorid (KCl): p.a.; Fluka

Kaliumnitrat (KNO_3): p.a.; Merck

Magnesiumsulfat (MgSO_4): p.a.; Fluka

2-Mercaptoethanol: mind. 99% Reinheit (GC); Merck

MES (2-[N-Morpholin]ethansulfonsäure): freie Säure, mind. 99,5% Reinheit (Titration); Sigma

Na₂-ATP (Adenosin 5'-Triphosphat, Na₂-Salz): >98% Reinheit (enzymatisch); Merck

Natriumazid (NaN_3): p.a.; Merck

Natriumchlorid (NaCl): p.a.; Merck

Natriumcitrat-Dihydrat: p.a.; Merck

Natrium-Metaarsenit (NaAsO_2): mind. 99% Reinheit; Sigma

Natriummolybdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$): p.a.; Merck

Natriumnitrat (NaNO_3): p.a.; Merck

Natrium-Orthovanadat (Na_3VO_4): mind. 95% Reinheit; Sigma

Osmiumtetroxyd (OsO_4): f. EM.; Plano

PEG 3350 (Polyethylenglycol): durchschnittliches Molekulargewicht = 3350 g mol^{-1} ; Sigma

PEG 6000 (Polyethylenglycol): durchschnittliches Molekulargewicht = 6000 g mol^{-1} ; Merck

PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid): >99% Reinheit (GC); Sigma

D(+)-Saccharose: für biochemische & mikrobiologische Zwecke; Merck

SDS (Natriumdodecylsulfat): >99% Reinheit (GC); Sigma

Valinomycin: ³98% Reinheit (TLC); Fluka

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von Na⁺-Exklusionsstrategien auf die Ernährung der Pflanzen

3.1.1 Langfristiger Einfluss von NaCl bzw. Na₂SO₄ auf das Wachstum und die Ionenkonzentration bei den Sorten Pioneer 3906 und Helix

In diesem Versuch war zu prüfen, ob Cl⁻ unter salinen Bedingungen auf Mais toxisch wirkt, da neben Na⁺ bei Salinität auch noch Cl⁻ in größeren Mengen aufgenommen wird. Einige Wissenschaftler stellten bei der Sorte Helix angebliche Cl⁻-Toxizitätssymptome fest. Um dieses zu überprüfen, wurden bei den Mais-Genotypen Helix und Pioneer 3906 das Wachstum und die Ionenkonzentrationen unter langfristigem Einfluss von 100 mM NaCl bzw. 50 mM Na₂SO₄ miteinander verglichen. Bei der NaCl- bzw. Na₂SO₄-Variante zeigten die Pflanzen der beiden Sorten die gleichen Nekroseerscheinungen. Die älteren Blätter starben an den Blattspitzen ab. Die Sorte Pioneer 3906 hatte in den ersten Wochen nach der Salzbehandlung Probleme bei der Entfaltung der jüngsten Blätter. Sie verblieben im eingerollten Zustand und waren an der Spitze oft abgestorben. Das Sprosswachstum beider Maissorten Pioneer 3906 und Helix wurde unter beschriebener Salzzugabe stärker beeinträchtigt als die Wurzeltrockenmasse. Bei beiden Genotypen waren Wurzel- und Sprosstrockenmasse unter NaCl- Zugabe signifikant kleiner als bei der Na₂SO₄-Variante (Abb. 3). Die Nährlösungen wiesen je nach Salzbehandlung ein unterschiedliches Wasserpotential auf. Das osmotische Potential der Nährlösung mit NaCl-Behandlung war wesentlich niedriger (-0,51 MPa) als das derjenigen mit Na₂SO₄-Behandlung (-0,34 MPa). Unter Kontrollbedingungen zeigte die Sorte Helix eine signifikant größere Spross- und Wurzeltrockenmasse.

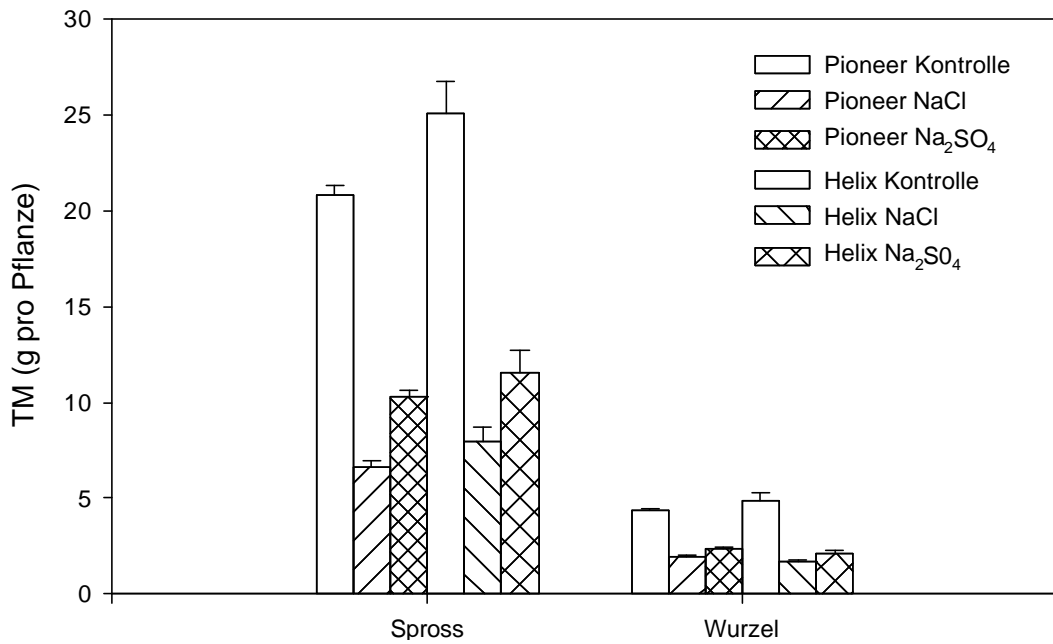


Abb. 3: Einfluss einer 21-tägigen Behandlung mit 100 mM NaCl bzw. 50 mM Na₂SO₄ auf die Spross- und Wurzeltrockenmasse der Maissorten Pioneer 3906 und Helix

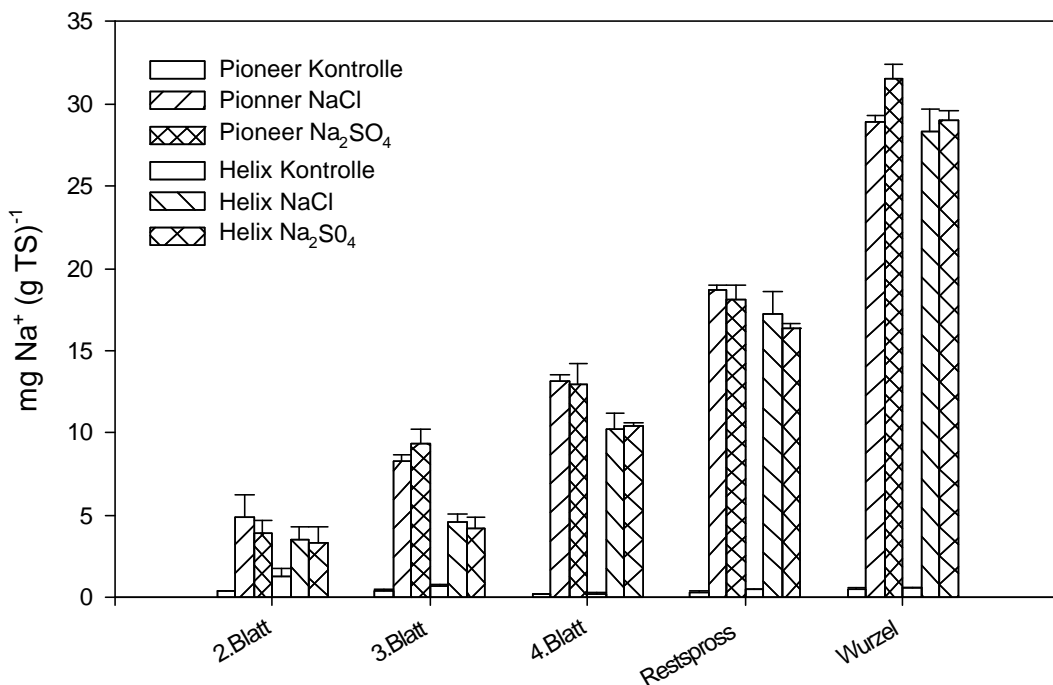


Abb. 4: Na⁺-Konzentrationen nach 21-tägiger Behandlung mit 100 mM NaCl bzw. 50 mM Na₂SO₄ in den getrennten Blättern sowie dem Restspross und der Wurzel der beiden Maissorten Pioneer 3906 und Helix

Die Na^+ -Konzentrationen in den einzelnen Sprossfraktionen und in den Wurzeln sind in Abb. 4 dargestellt. Durch die Salzbehandlung nahm die Na^+ -Konzentration mit dem Alter der Blätter beider Genotypen ab. Obwohl die Spross- und Wurzeltrockenmasse unter NaCl -Zugabe in beiden Genotypen stärker beeinflusst wurde (Abb. 3), konnte zwischen der NaCl - und der Na_2SO_4 -Variante kein signifikanter Unterschied in der Na^+ -Aufnahme festgestellt werden. Bezüglich der Na^+ -Konzentration im Gesamtspross unterschieden sich die beiden Sorten nicht signifikant, wobei jedoch die Sorte Pioneer 3906 unter Na_2SO_4 -Zugabe eine höhere Na^+ -Konzentration in der Wurzel aufwies.

Vereinzelt wurden Blätter sowie auch Wurzeln auf Cl^- -Konzentrationen untersucht (Abb. 5). Diese waren im Spross allgemein höher als in der Wurzel. Unter dem Einfluss von 100 mM NaCl wies die Sorte Pioneer 3906 im Vergleich zu Helix eine signifikant höhere Cl^- -Konzentration auf. Bei der SO_4^{2-} -Variante konnte im Vergleich zur Kontrolle eine Halbierung und bei der Cl^- -Variante eine Erhöhung der Cl^- -Konzentration festgestellt werden.

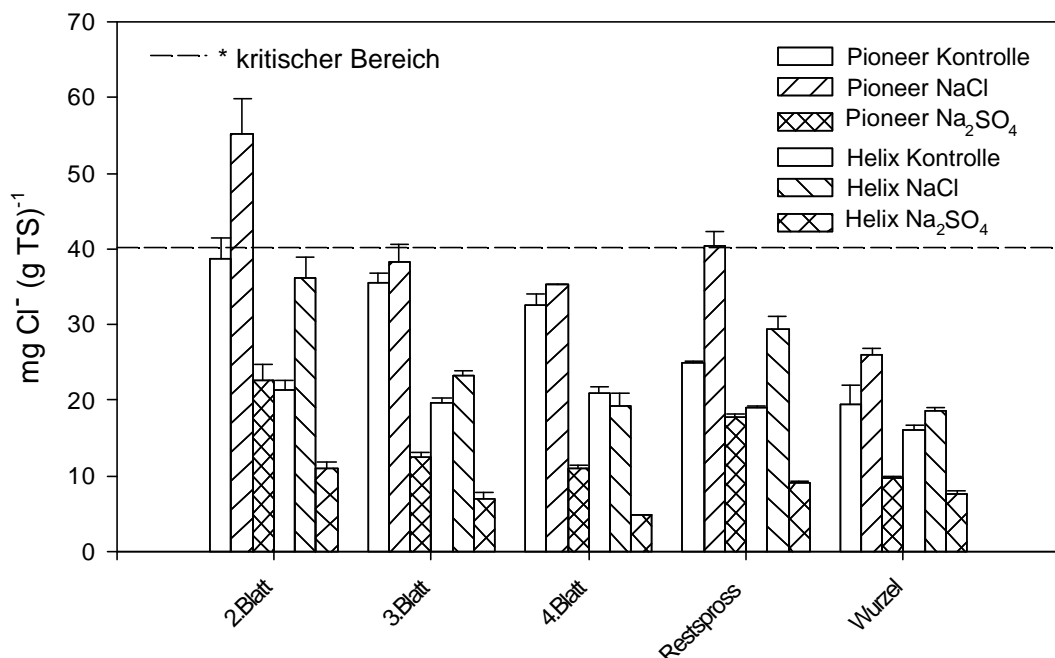


Abb. 5: Cl^- -Konzentrationen nach 21-tägiger Behandlung mit 100 mM NaCl bzw. 50 mM Na_2SO_4 in den getrennten Blättern sowie dem Restspross und der Wurzel der beiden Maissorten Pioneer 3906 und Helix. * Kritische Cl^- -Konzentration nach Bergmann (1992)

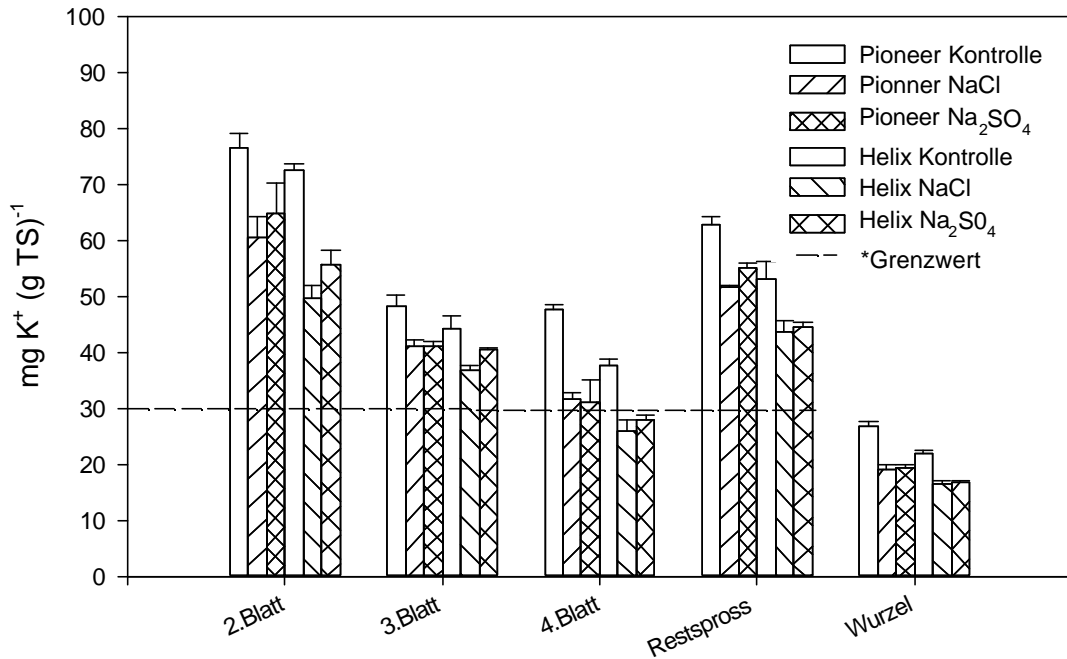


Abb. 6: K⁺-Konzentrationen nach 21-tägiger Behandlung mit 100 mM NaCl bzw. 50 mM Na₂SO₄ in den getrennten Blättern sowie dem Restspross und der Wurzel der beiden Maissorten Pioneer 3906 und Helix. *Grenzwert für ausreichende Versorgung der voll entwickelten Maisblätter mit K⁺ (30 mg / g TS) nach Bergmann (1992)

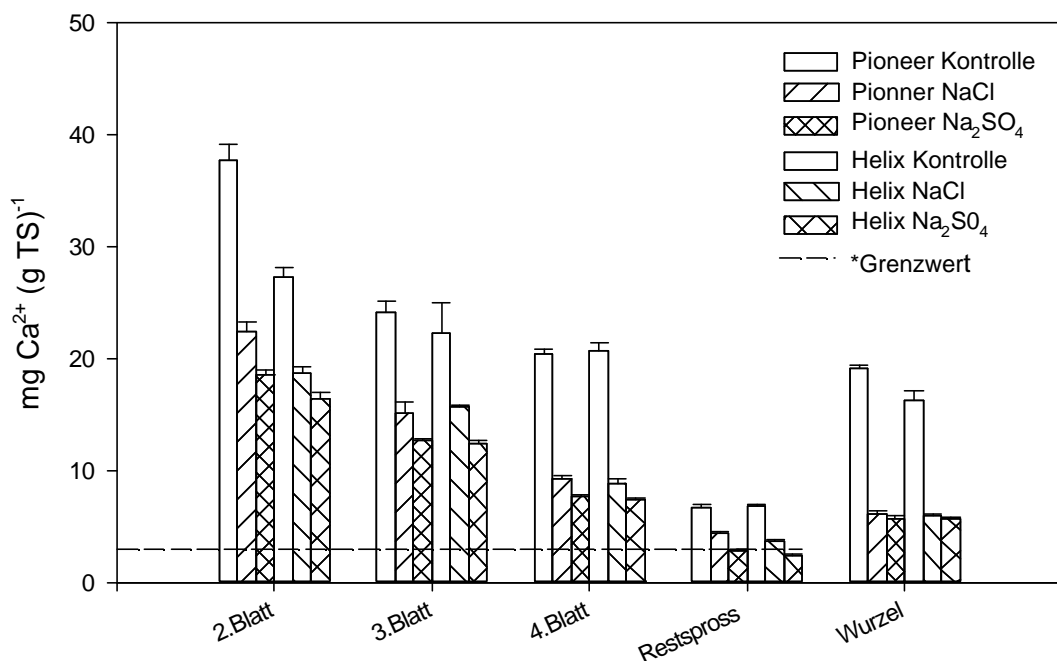


Abb. 7: Ca²⁺-Konzentrationen nach 21-tägiger Behandlung mit 100 mM NaCl bzw. 50 mM Na₂SO₄ in den getrennten Blättern sowie dem Restspross und der Wurzel. *Grenzwert für ausreichende Versorgung der voll entwickelten Maisblätter mit Ca²⁺ (3 mg / g TS) nach Bergmann (1992)

Dennoch konnten in den Cl^- - und SO_4^{2-} -Behandlungen bei beiden Genotypen die gleichen Toxizitätssymptome an den älteren Blättern beobachtet werden.

Mit NaCl bzw. Na_2SO_4 im Medium nahmen die Konzentrationen von K^+ in den einzelnen Blattfraktionen und in der Wurzel der beiden Sorten ab. Die Sorte Helix zeigte bei diesen Pflanzenorganen sowohl bei der Kontrolle, als auch bei Salinität, geringere Konzentrationen an K^+ gegenüber der Sorte Pioneer 3906. Zwischen den verschiedenen Salzbehandlungen (NaCl und Na_2SO_4) konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der K^+ -Konzentration festgestellt werden (Abb. 6).

Die Ca^{2+} -Konzentrationen in den einzelnen Blättern und in der Wurzel sind in Abb. 7 dargestellt. Unter Salzzugabe waren in den einzelnen Sprossfraktionen und in der Wurzel die Ca^{2+} -Konzentrationen bei beiden Sorten gegenüber der Kontrolle signifikant vermindert. Bei 100 mM NaCl sowie 50 mM Na_2SO_4 hatte die Sorte Pioneer 3906 in den ersten Wochen nach Behandlungsbeginn Probleme mit der Entfaltung der jüngsten Blätter, welche an der Spitze oft abgestorben waren. Nach einiger Zeit verschwanden diese Symptome jedoch wieder. Nach 21-tägiger Behandlung mit Salz konnte in den Sprossfraktionen kein signifikanter Unterschied zwischen den Ca^{2+} -Konzentrationen der beiden Sorten festgestellt werden. Die Ca^{2+} -Konzentration in den einzelnen Sprossfraktionen reduzierte sich bei beiden Genotypen durch die Zugabe von Na_2SO_4 hochsignifikant stärker als bei der Zugabe von NaCl , obwohl das Sprosswachstum unter Na_2SO_4 -Salinität größer war (Abb. 3). Sowohl die K^+ - als auch die Ca^{2+} -Konzentrationen lagen bei allen Varianten in den einzelnen Sprossfraktionen innerhalb der von Bergmann (1992) als ausreichend definierten Konzentrationsbereiche (Abb. 6 und 7).

3.1.2 Korrelation zwischen der Intensität der Natriumexklusion und der Ca^{2+} -Ernährung der F_2 -Generation

Wie in Kapitel 3.1.1 erwähnt, zeigte die Na^+ -exkludierende Hybride Pioneer 3906 schon etwa eine Woche nach der Salzbehandlung Ca^{2+} -Mangelsymptome in den jüngsten Blättern. Die Versuche wurden mit einer spaltenden F_2 -Generation durchgeführt, weil die Pflanzen in Bezug auf das Merkmal Intensität der Natriumexklusion variieren (Schierholt, 1995). In dieser aufspaltenden Population war zu prüfen, ob es einerseits eine Beziehung zwischen der Intensität der Natriumexklusion und der Ca^{2+} -Verlagerung in die nicht entfalteten jüngsten Blätter und andererseits zwischen der Natriumexklusion und der Ca^{2+} -Transportrate in dem Xylemexsudat gab.

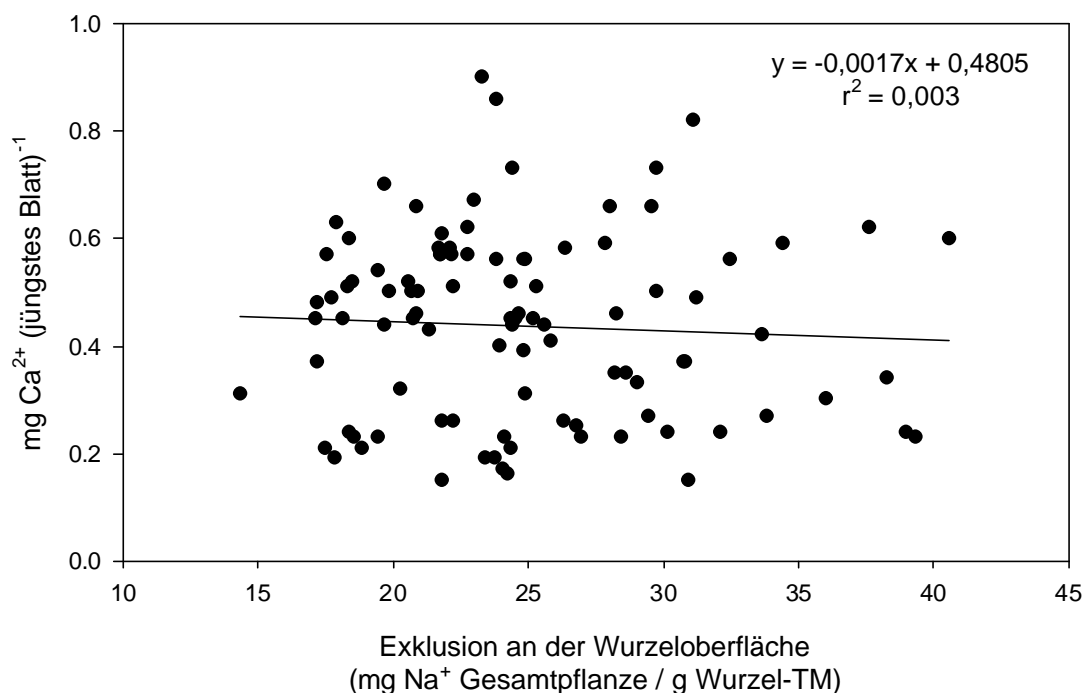


Abb. 8: Korrelation zwischen der Intensität der Natriumexklusion an der Wurzeloberfläche und der Ca^{2+} -Verlagerung in die jungen Blätter der F_2 -Generation (100 Individuen - Behandlungsdauer: 9 Tage mit 25 mM NaCl)

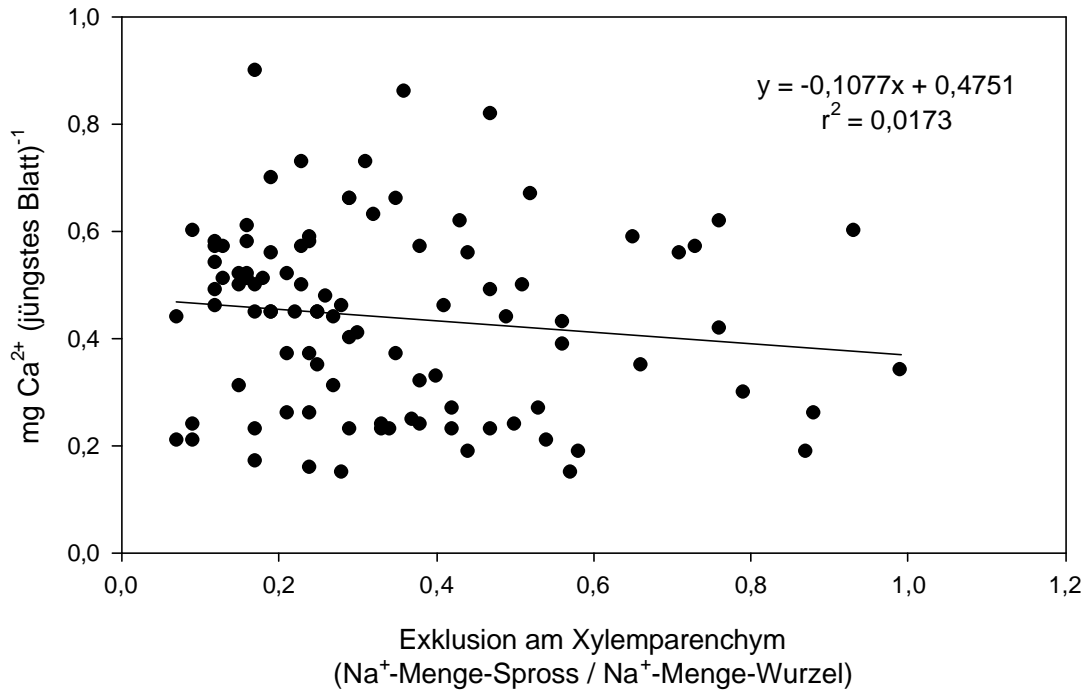


Abb. 9: Korrelation zwischen der Intensität der Natriumexklusion am Xylemparenchym und der Ca²⁺-Verlagerung in die jungen Blätter der F₂-Generation (100 Individuen - Behandlungsdauer: 9 Tage mit 25 mM NaCl)

In der untersuchten F₂-Generation konnte zwischen der Intensität der Natriumexklusion und der Ca²⁺-Versorgung der jungen Blätter keine Korrelation festgestellt werden (Abb. 8, 9). Auch die Ca²⁺-Menge des Xylemexsudates wurde von der Intensität der Natriumexklusion nicht beeinträchtigt (Abb. 10). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei der F₂-Generation die unterschiedlich effizienten Na⁺-Exklusionen nicht zu einer verminderten Ca²⁺-Verlagerung bei den oben genannten Blättern führen. Die Na⁺-Exklusion führte also nicht zu einer verminderten Ernährung der Pflanze und unter NaCl-Salinität war das Cl⁻-Ion für die Maispflanze nicht toxisch (siehe 3.1.1). Daher wurde bei den nächsten Versuchen eine Züchtung auf Basis der Na⁺-Exklusion vorgenommen.

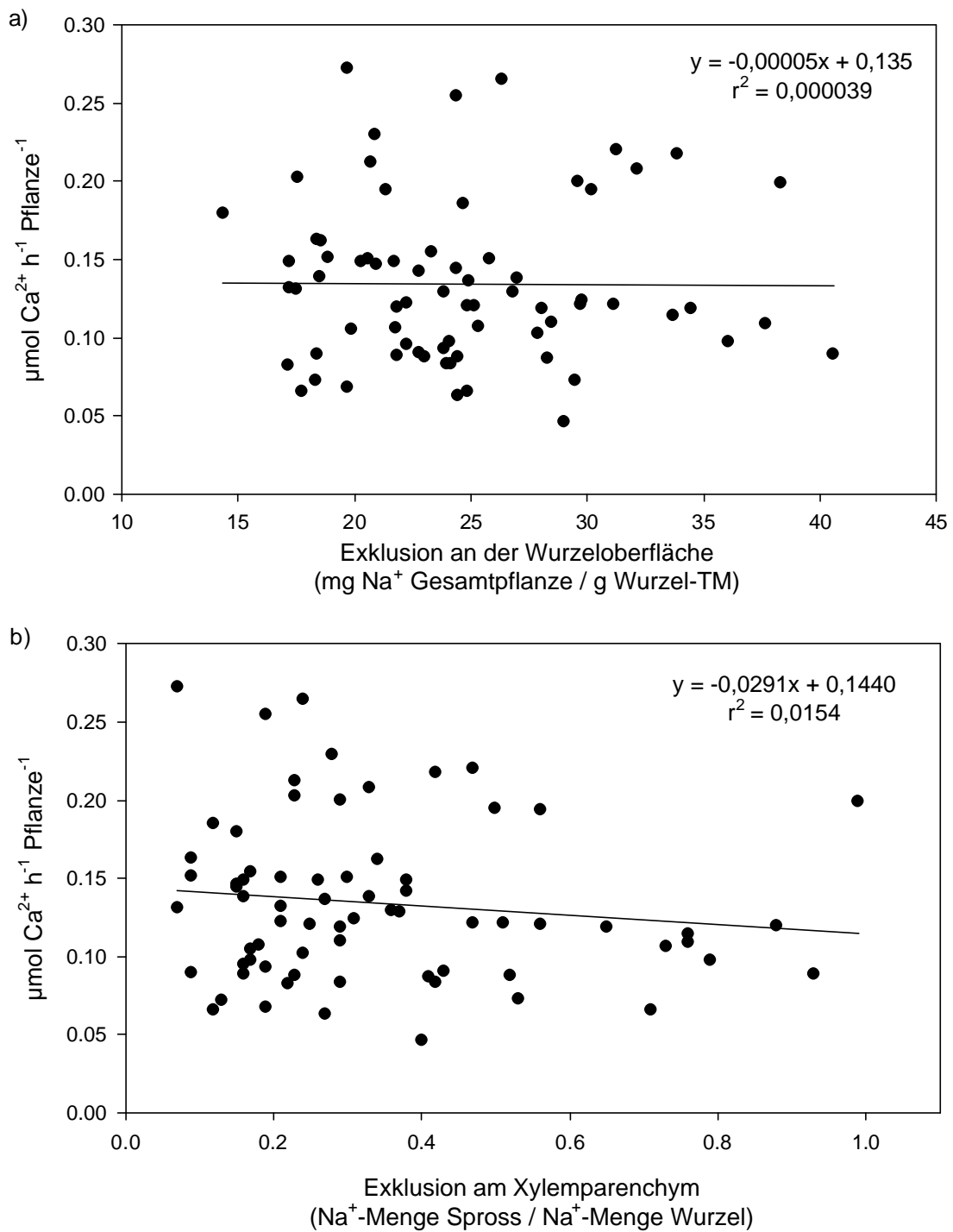


Abb. 10: Korrelation zwischen der Intensität der Natriumexklusion an der Wurzeloberfläche (a) bzw. am Xylemparenchym (b) und der Ca^{2+} -Transportrate im Xylemexsudat der F_2 -Generation (100 Individuen – Behandlungsdauer: 9 Tage mit 25 mM NaCl)

3.1.3 Vergleich des Natriumexklusionsvermögens der aus der Sorte Pioneer 3906 entwickelten Maisinzuchtgenerationen

Es wurden nach wiederholten Selbstungen und Selektionen (siehe 2.1.2) Inzuchtgenerationen entwickelt, die in diesem Versuch bezüglich des Merkmals Natriumexklusionsvermögen mit ihrer Elternlinie Pioneer 3906 verglichen wurden. Abb. 11 zeigt die Ergebnisse der vierten bis sechsten Inzuchtgeneration im Verhältnis zu der Kontrolle (Pioneer 3906), welche mit 100% festgesetzt wurde. Die Na^+ -Konzentration im dritten Blatt spiegelt die Intensität der Natriumexklusion wider (siehe 2.5). Bei der vierten bis sechsten Inzuchtgenerationen war die Na^+ -Konzentration des dritten Blattes hochsignifikant geringer als bei der Kontrolle. Die 6. Inzuchtgeneration (IP-6) zeigte eine geringere Streuung der Na^+ -Konzentration als die vorherigen. Im Laufe der Inzucht nahmen diese um das vierfache ab, was auf einen bedeutenden Zuchtfortschritt hindeutet.

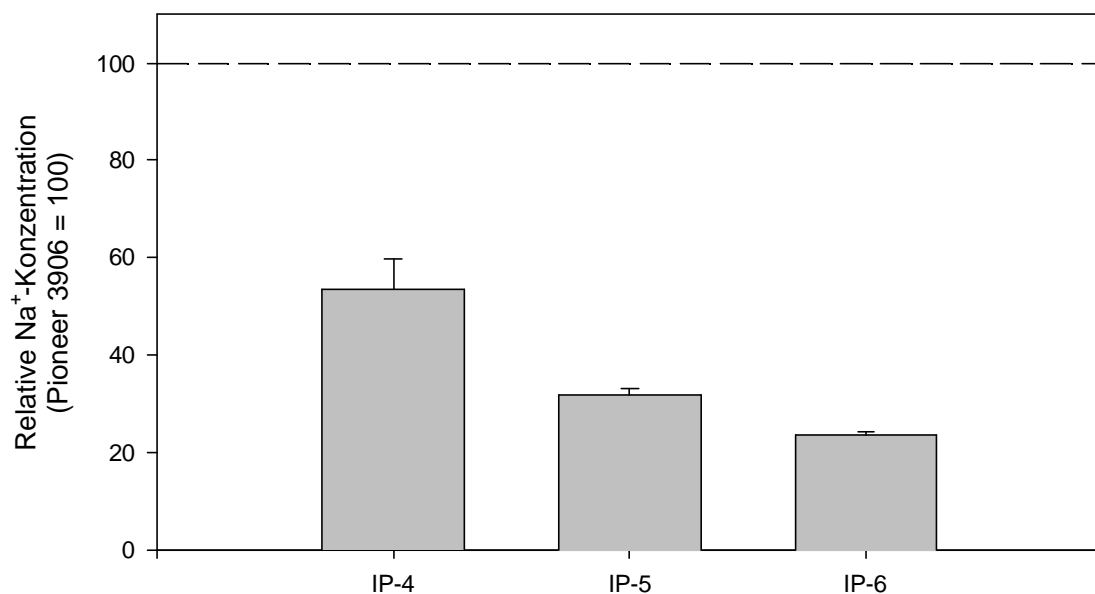


Abb. 11: Relative Na^+ -Konzentration des dritten Blattes der vierten bis sechsten Inzuchtgeneration ($n=190$) nach 14-tägiger Na^+ -Behandlung (150 mM NaCl). 100% entsprechen der Na^+ -Konzentration des dritten Blattes der Elternlinie Pioneer 3906 ($n=10$).

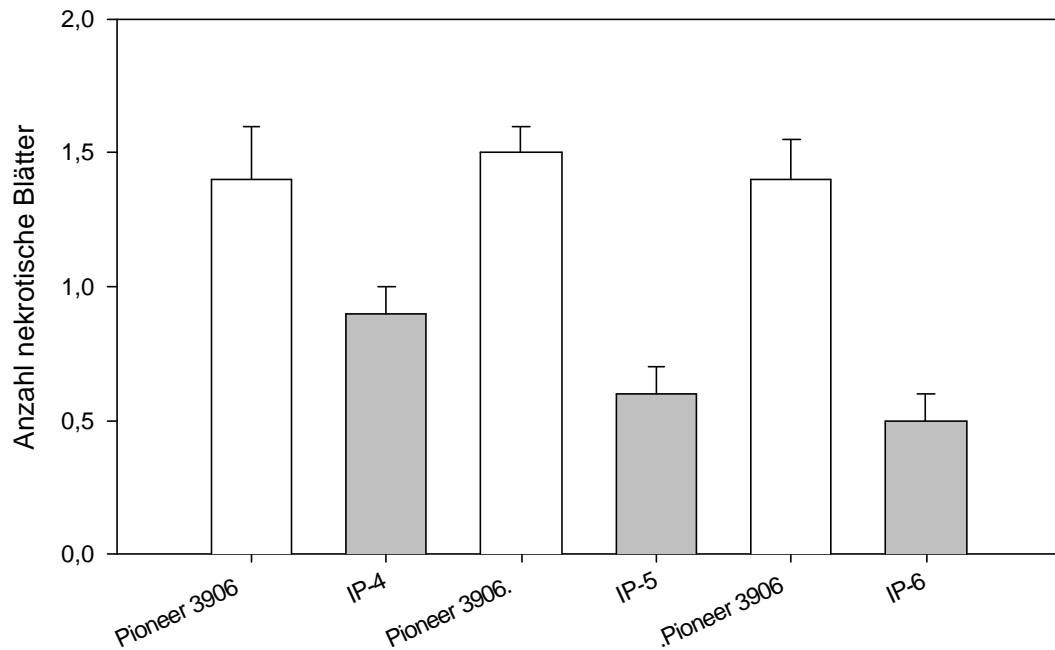


Abb. 12: Anzahl der nekrotischen Blätter der Maissorte Pioneer 3906 und deren vierter bis sechster Inzuchtgeneration nach einer 14-tägigen Behandlung mit 150 mM NaCl

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inzuchtgenerationen gegenüber dem Ausgangsmaterial (Pioneer 3906) ein wesentlich verbessertes Na^+ -Exklusionsvermögen aufweisen. Diese verbesserte Na^+ -Exklusion hatte ebenfalls einen positiven Effekt auf den Habitus der Pflanzen. Die Anzahl der nekrotischen Blätter war bei den fünften und sechsten Inzuchtgenerationen gegenüber der Kontrolle (Pioneer 3906) signifikant geringer, während bei der vierten Inzuchtgeneration keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren (Abb. 12). Die Anzahl der nekrotischen Blätter verringerte sich in Anlehnung an die Na^+ -Konzentration mit Fortsetzung der Inzucht. Dabei wurden allerdings zwischen den fünften und sechsten Inzuchtgenerationen in Bezug auf die Zahl der nekrotischen Blätter keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Nach Selbstungen und Selektionen liegt mittlerweile die siebente Inzuchtgeneration vor. Die Na^+ -Resistenz dieser Generation wird im Kapitel 3.1.5 anhand eines Bodenversuches beschrieben.

3.1.4 Vergleich verschiedener Inzuchtlinien bezüglich des Einflusses von NaCl-induziertem osmotischem Stress auf das Wachstum und die Ionenkonzentrationen der Pflanzen

Ziel ist es, einen salzresistenten Genotyp zu erstellen, indem die Na⁺-ausschließende Inzuchtgeneration mit einer Inzuchtlinie gekreuzt wird, die gegenüber osmotischem Stress tolerant ist. Zur Erreichung dieses Zieles müssen in diesem Versuch aus den gegenüber osmotischem Stress toleranten Mais-Inzuchtlinien, diejenigen Genotypen ausgewählt werden, die gegenüber osmotischem Stress am tolerantesten sind. Die Auswahl der verschiedenen Linien im Hinblick auf das oben genannte Merkmal wurde mit NaCl als Osmotikum durchgeführt, um die Nachteile einer PEG- bzw. Mannitol-Behandlung auszuschließen. Der Blattflächenparameter bemisst sich mit dem Produkt aus Länge und Breite des vierten Blattes. Nach neuntägiger Behandlung wurde der Flächenparameter der verschiedenen Inzuchtlinien und der Sorte Pioneer 3906 durch 100 mM NaCl stärker beeinträchtigt als bei der 4., 5., 6. I-Linie und der effizient Na⁺-ausschließenden sechsten Inzuchtgeneration (IP-6) (Abb. 13). Nach diesem Parameter wurde die vierte und sechste I-Linie ausgewählt, welche gegenüber osmotischem Stress toleranter sind. Für weitere Analysen konzentrierte man sich nun auf die ausgesuchten Inzuchtlinien (I-Linie 4 und I-Linie 6), sowie die Na⁺-ausschließende Sorte Pioneer 3906 und deren sechste Inzuchtgeneration (IP-6). Um Informationen über die Intensität der Na⁺-Exklusionsmechanismen zu erhalten, wurde die Na⁺-Aufnahme der Sorte Pioneer 3906 mit deren sechster Inzuchtgeneration (IP-6) und anderen I-Linien verglichen (Abb. 14). Bezieht man die gesamte Na⁺-Aufnahme der Pflanze auf eine Einheit Wurzelmasse, so erhält man das Maß für die Na⁺-Exklusion an der Wurzeloberfläche. Abbildung 14a verdeutlicht, dass die sechste Inzuchtgeneration (IP-6) eine hoch signifikant ($P = 0,1\%$) geringere Na⁺-Nettoaufnahme bezogen auf die Wurzeltrockenmasse aufweist als das Ausgangsmaterial Pioneer 3906. Die Na⁺-Nettoaufnahme war dagegen bei der vierten und sechsten

I-Linie jeweils gegenüber der Sorte Pioneer 3906 und deren sechster Inzuchtgeneration (IP-6) im gleichen Maße signifikant ($P=0,1\%$) erhöht.

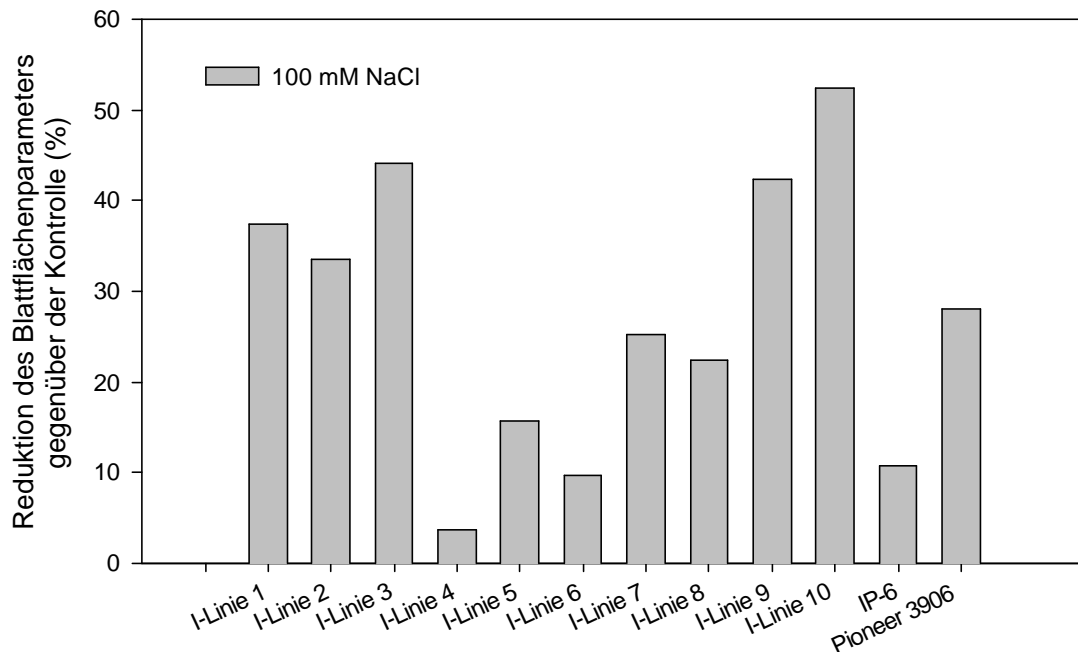


Abb. 13: Einfluss einer neuntägigen Behandlung mit 100 mM NaCl auf den Flächenparameter (Länge x Breite) des vierten Blattes von verschiedenen Inzuchtlinien bzw. der Kontrolle Pioneer 3906 und deren sechster Inzuchtgeneration (IP-6). 100% entsprechen dem Blattflächenparameter der jeweiligen Kontrolle (ohne NaCl).

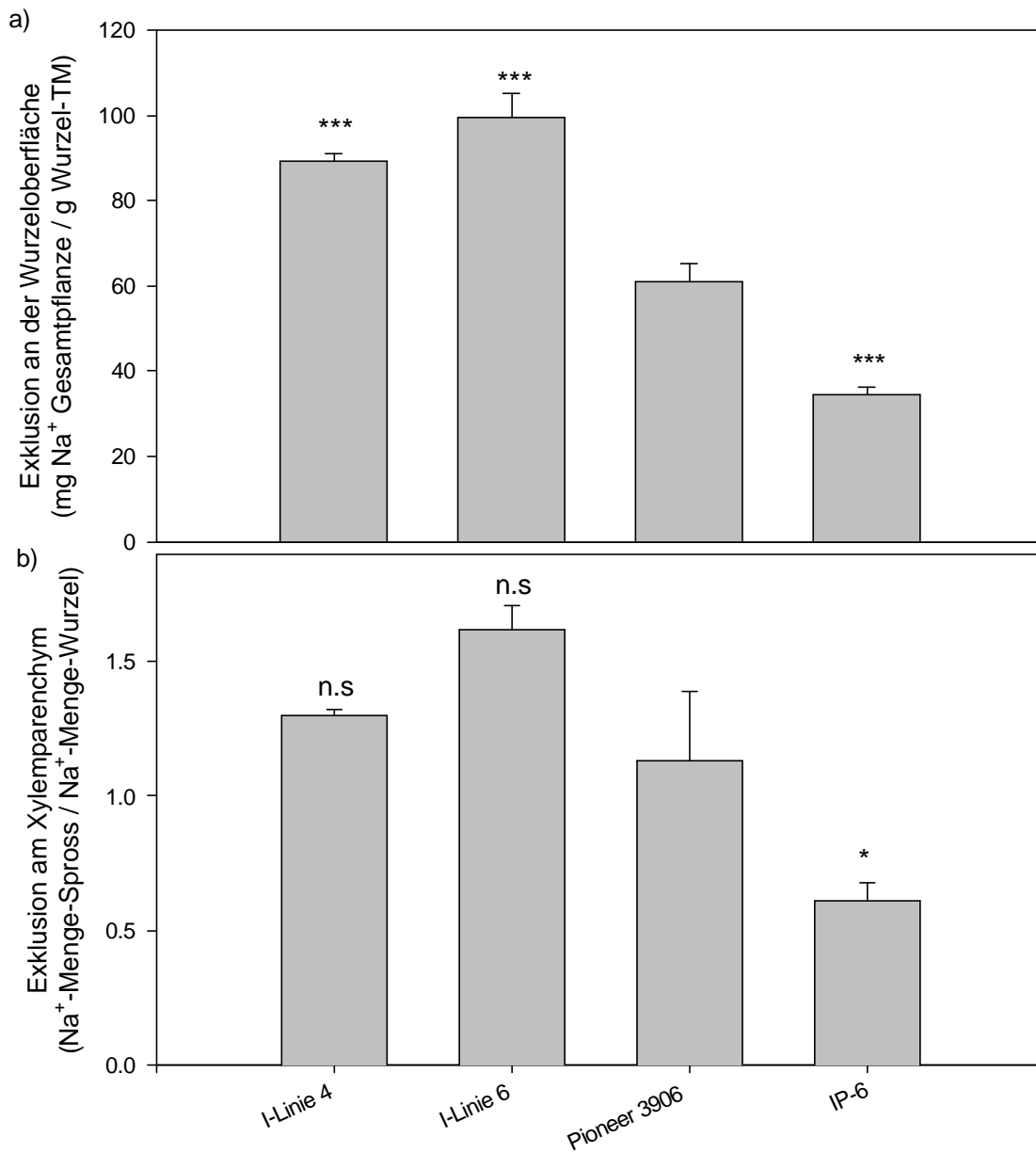


Abb. 14: Vergleich der Intensität des Exklusionsvermögens an der Wurzeloberfläche (a) und am Xylemparenchym (b) anhand der Inzuchtlinien und der Kontrolle Pioneer 3906 bei Behandlung mit 100 mM NaCl im Wurzelmedium. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu Pioneer 3906 sind mit * P = 5% und *** P = 0,1% gekennzeichnet.

Die Na^+ -Menge in der Sprossmasse bezogen auf die Na^+ -Menge in der Wurzelmasse gibt einen Hinweis auf die Na^+ -Exklusion aus dem Spross. Bei der Berechnung der Intensität der Na^+ -Exklusion am Xylemparenchym (Abb. 14b) lag der Wert der Sorte Pioneer 3906 signifikant ($P=5\%$) über dem der sechsten Inzuchtgeneration (IP-6). Die vierte und sechste I-Linie zeigten gegenüber der sechsten Inzuchtgeneration (IP-6) eine schlechtere ($P=0,1\%$), und gegenüber der Sorte Pioneer 3906 eine unveränderte Na^+ -Exklusion am Xylemparenchym. Die vierte I-Linie war nach diesem Parameter signifikant ($P=1,0\%$) besser als die 6. I-Linie, während bei der Na^+ -Exklusion an der Wurzeloberfläche keine signifikanten Unterschiede (Abb. 14a) festzustellen waren.

In Bezug auf die Pflanzen ist der Wasserhaushalt, hinsichtlich der osmotischen Anpassung, ein wichtiger Parameter. Die Messung des osmotischen Potentials ergab bei allen Pflanzen signifikant niedrigere Werte ($P=0,1\%$) nach neuntägiger NaCl -Behandlung im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Abb. 15). Unter Kontrollbedingungen wurden keine signifikanten Sortenunterschiede festgestellt.

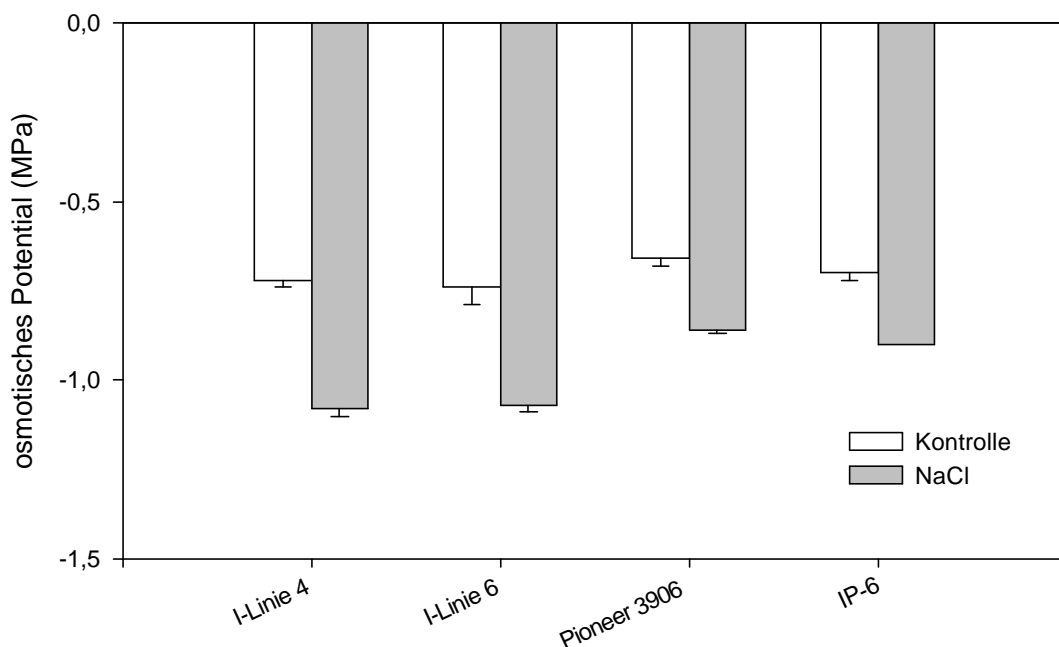


Abb. 15: Einfluss einer neuntägigen Behandlung mit 100 mM NaCl auf das osmotische Potential der jüngsten Blätter von verschiedenen Inzuchtlinien und der Sorte Pioneer 3906

Bei Zugabe von 100 mM NaCl wies die sechste Inzuchtgeneration (IP-6) gegenüber Pioneer 3906 keinen signifikanten Unterschied unter Beachtung des Merkmals osmotisches Potential auf. Unter NaCl-Bedingungen verringerte sich dieses im gleichen Maße hochsignifikant ($P=0,1\%$) bei den jüngsten Blättern der vierten und sechsten I-Linie gegenüber dem der Na^+ -ausschließenden Maispflanzen, der Sorte Pioneer 3906 und deren sechster Inzuchtgeneration (IP-6).

Die Wasserpotentialwerte wurden zwar in den jüngsten Blättern mit dem Psychrometer gemessen, jedoch wies die Auswertung der Daten Fehler auf, sodass die Wasserpotentialwertberechnung und damit die Turgorberechnung nicht möglich war.

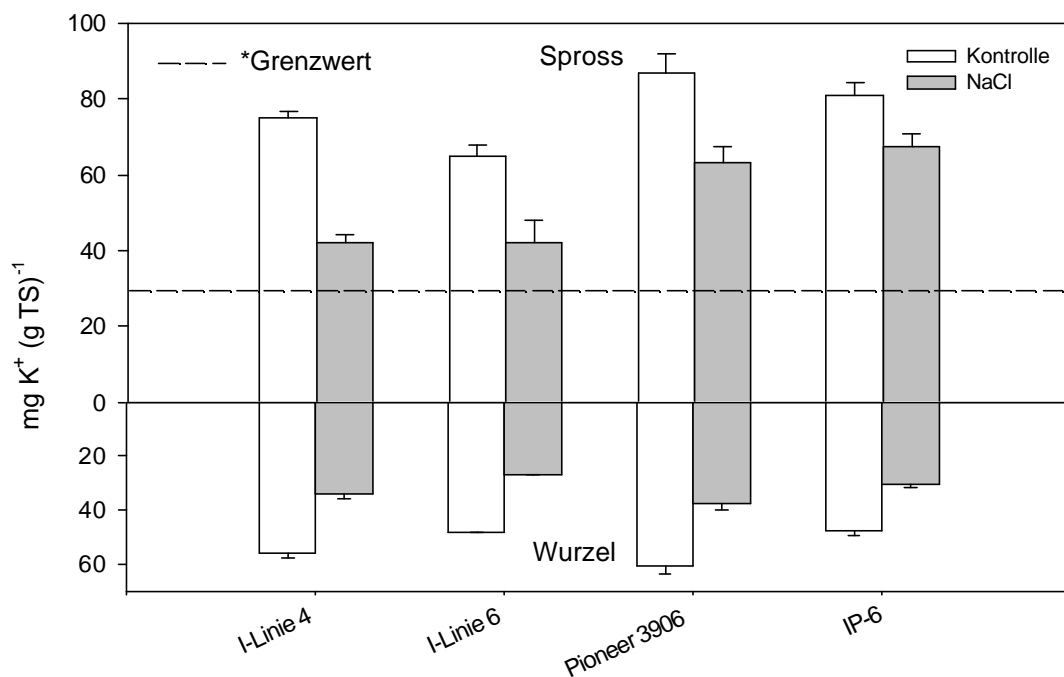


Abb. 16: Einfluss einer neuntägigen Behandlung mit 100 mM NaCl auf die K^+ -Konzentration im Spross und in den Wurzeln der verschiedenen Inzuchtlinien und der Sorte Pioneer 3906. *Grenzwert für ausreichende Versorgung der voll entwickelten Maisblätter mit K^+ (30 mg / g TS) nach Bergmann (1992)

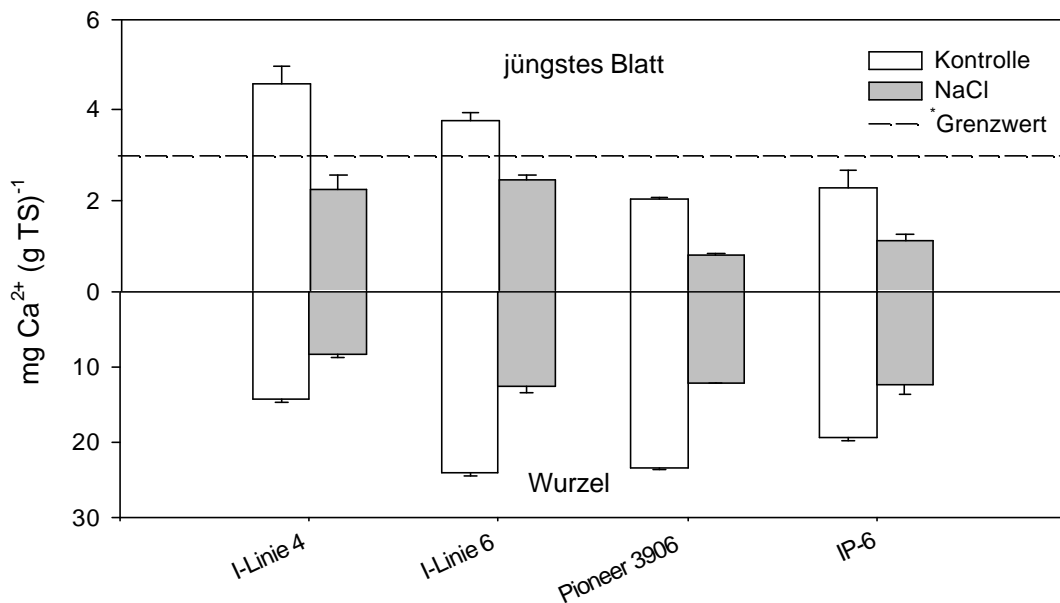


Abb. 17: Einfluss einer neuntägigen Behandlung mit 100 mM NaCl auf die Ca²⁺-Konzentration in den jüngsten Blättern sowie in den Wurzeln der verschiedenen Inzuchtlinien und der Sorte Pioneer 3906. *Grenzwert für ausreichende Versorgung der voll entwickelten Maisblätter mit Ca²⁺ (3 mg/g TS) nach Bergmann (1992)

Die K⁺-Konzentrationen waren bei der Na⁺-ausschließenden Sorte Pioneer 3906 und deren sechster Inzuchtgeneration (IP-6) in den einzelnen Pflanzenorganen höher als bei denen der beiden I-Linien (Abb. 16). Die Reduktion der K⁺-Konzentration in Spross und Wurzel durch die NaCl-Behandlung war bei der Sorte Pioneer 3906 und den beiden I-Linien (I-Linie 4 und I-Linie 6) jedoch stärker, als bei der sechsten Inzuchtgeneration (IP-6). Unter NaCl-Bedingungen lagen die K⁺-Konzentrationen bei allen Genotypen nach Bergmann (1992) oberhalb der als ausreichend definierten Grenze.

Auch die Ca²⁺-Konzentrationen der verschiedenen Genotypen waren durch die Behandlung mit 100 mM NaCl in den jüngsten Blättern und in den Wurzeln generell gegenüber der Kontrolle signifikant verringert (Abb. 17). Obwohl die Na⁺-exkludierende Sorte Pioneer 3906 und deren sechste Inzuchtgeneration (IP-6) gegenüber den beiden I-Linien (I-Linie 4 und I-Linie 6), sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter

NaCl-Bedingungen, gleich oder mehr Ca^{2+} in die Wurzeln aufnehmen, wiesen jedoch beide Genotypen in den jüngsten Blättern eine geringere Ca^{2+} -Konzentration auf. Dieses kann eine Ursache nicht in der Na^{+} -Exklusion haben, da bei der noch effizienteren Na^{+} -ausschließenden sechsten Inzuchtgeneration die Ca^{2+} -Konzentration in Spross und Wurzel durch die NaCl-Behandlung nicht so stark beeinträchtigt wurde wie bei der Sorte Pioneer 3906. Unter Salzbehandlung lagen die Ca^{2+} -Konzentrationen in den jüngsten Blättern der verschiedenen Genotypen unter der von Bergmann (1992) als ausreichend angegebenen Grenze. Allerdings gelten die Grenzwerte von Bergmann (1992) für voll entwickelte Maisblätter.

Um einen salzresistenten Genotyp zu erstellen wurde die Na^{+} -ausschließende sechste Inzuchtgeneration (IP-6) als Pollenelter mit den gegen osmotischen Stress toleranten Linien (I-Linie 4 und I-Linie 6), die als Mütter verwendet wurden, gekreuzt. Allerdings war wegen kalter Witterungsverhältnisse und dementsprechend erfolgloser Bestäubung eine Produktion von Kreuzungssaatgut nicht möglich.

3.1.5 Vergleich der Intensität der Na⁺-Exklusionsmechanismen der beiden Sorten Across 8023 und Pioneer 3906 sowie deren siebenter Inzuchtgeneration (IP-7) im Bodenversuch

Bisher wurden die Inzuchtgenerationen in Wasserkulturbedingungen selektiert, und unter dieser Voraussetzung die Intensität des Na⁺-Exklusionsvermögens bestimmt. Deswegen war es das Ziel dieses Versuches zu testen, wie sich die Na⁺-ausschließende siebente Inzuchtgeneration (IP-7) auf salinen Böden verhält.

Die Hybride Pioneer 3906 und insbesondere die stark Na⁺-ausschließende Linie IP-7 hatten unter Salzbehandlung in der vegetativen Phase osmotische Probleme. Bei heißem Wetter zeigten die genannten Pflanzen unter hoher Salzkonzentration besonders bei 8 dS m⁻¹ starke Welkeerscheinungen. Bei der schwach Na⁺-ausschließenden Sorte Across 8023 traten diese Symptome jedoch nicht auf.

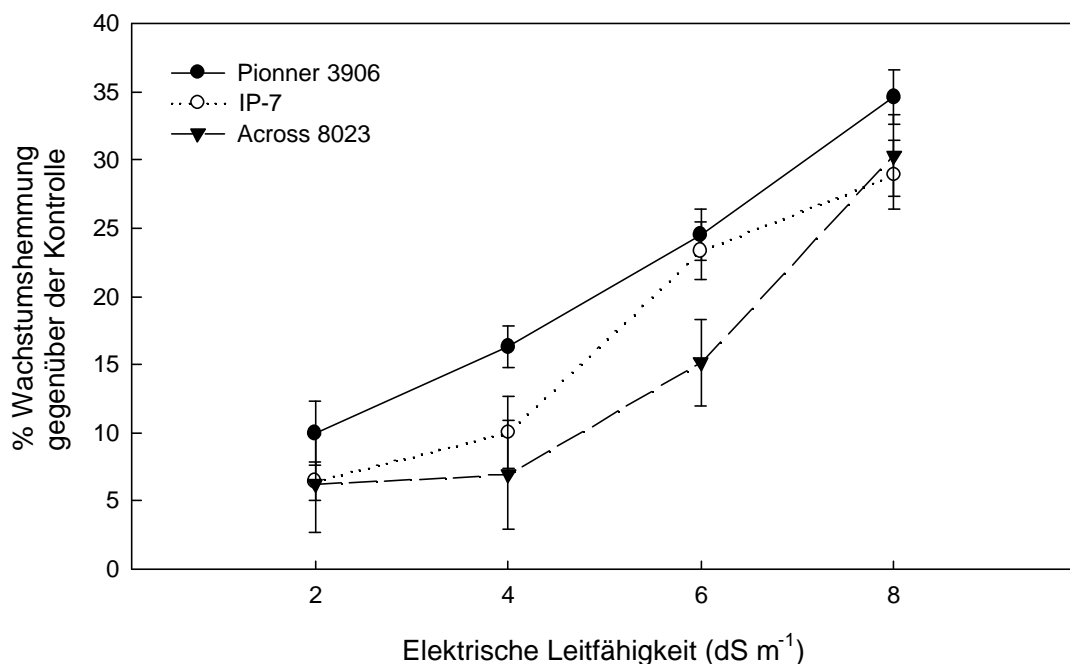


Abb.18: Einfluss unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen im Bodenversuch während der vegetativen Phase auf die relative Wuchshöhe der Sorten Across 8023 und Pioneer 3906 sowie deren siebenter Inzuchtgeneration (IP-7) (Versuchsdauer: 7 Wochen). Bei den Kontrollvarianten wurde dem Boden kein NaCl zugegeben.

Mit steigender NaCl-Konzentration im Boden war die Wuchshöhe der Na⁺-ausschließenden Pflanzen deshalb zum Teil stärker beeinträchtigt als diejenige der Pflanzen der Sorte Across 8023 (Abb. 18). Bei der höchsten Salzstufe (8 dS m⁻¹) zeigten die Pflanzen der siebenten Inzuchtgeneration (IP-7) und der Sorte Across 8023 allerdings keine Unterschiede bezüglich der relativen Wuchshöhe.

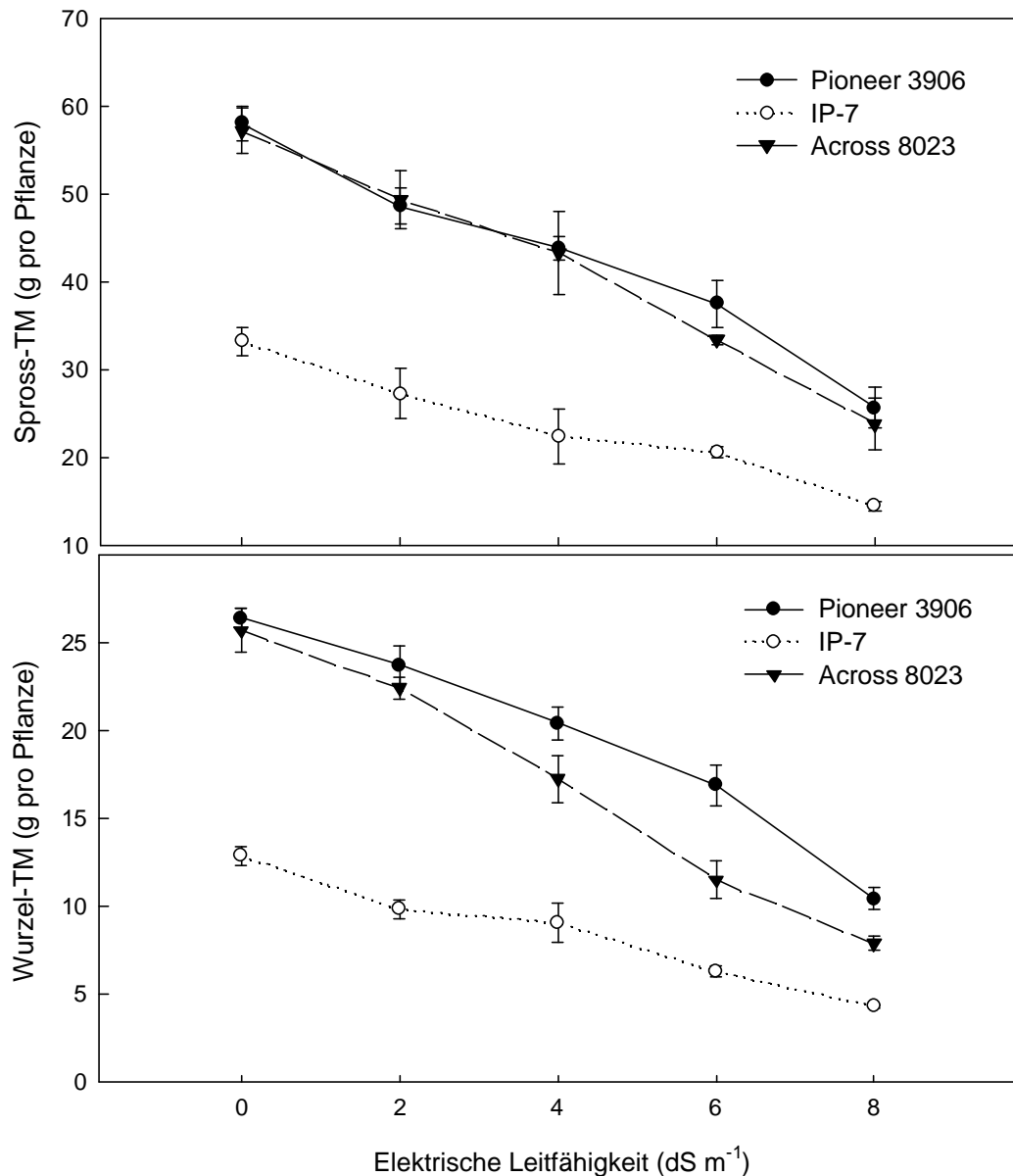


Abb. 19: Einfluss unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen im Bodenversuch während der vegetativen Phase auf die Spross- und Wurzeltrockenmasse der Sorten Across 8023 und Pioneer 3906 sowie deren siebenter Inzuchtgeneration (IP-7) (Versuchsdauer: 7 Wochen)

Obwohl bei der Sorte Pioneer 3906 mit steigender NaCl-Salinität der empfindliche Parameter "Wuchshöhe" stärker gegenüber der Sorte Across 8023 beeinflusst war, konnten zwischen den Sorten in der Sprosstrockenmasse keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 19). Das Wurzelwachstum der Sorte Across war dagegen durch die höhere Salzstufe (ab 4 dS m^{-1}) signifikant stärker beeinträchtigt als das der Sorte Pioneer 3906. Bei Steigerung der Salzkonzentration im Boden wurde deutlich, dass die Wachstumshemmung im Spross und in der Wurzel der siebenten Inzuchtgeneration (IP-7) etwa genau so groß wie bei den Sorten war. In der Abbildung 19 ist ebenfalls zu erkennen, dass die Inzuchtpflanzen wegen der Inzuchtdepression generell weniger stark wachsen.

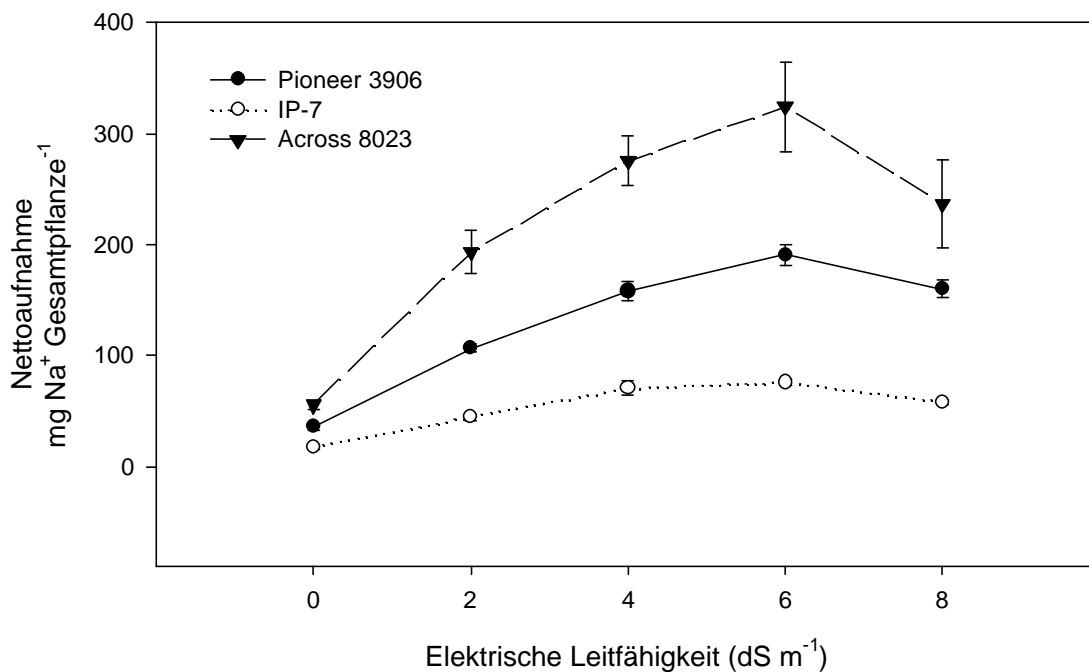


Abb. 20: Einfluss unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen im Bodenversuch während der vegetativen Phase auf die Na^+ -Nettoaufnahme in der Gesamtpflanze (Spross + Wurzel) der Sorten Across 8023 und Pioneer 3906 sowie deren siebenter Inzuchtgeneration (IP-7)

Trotz ähnlicher Spross- bzw. Wurzeltrockenmasse der Sorten Pioneer 3906 und Across 8023 bei allen Salzkonzentrationen im Boden (s. Abb. 19) war die Na^+ -Nettoaufnahme in der Gesamtpflanze "Across 8023" höher im Vergleich zu "Pioneer 3906", die wiederum höhere Na^+ -Aufnahmewerte im Vergleich zu "IP-7" aufwies (Abb. 20). Die Na^+ -Nettoaufnahme aller Genotypen stieg bis zu der Salzstufe von 6 dS m^{-1} kontinuierlich an, wobei die salzempfindliche Sorte Across den höchsten und die salzresistente siebente Inzuchtgeneration (IP-7) den geringsten Anstieg zeigte. Bei Erreichen von 8 dS m^{-1} Salzkonzentration im Boden fiel die Na^+ -Nettoaufnahme aller drei Genotypen ab. Dabei zeigte die Sorte Across 8023 im Vergleich zu der Hybride Pioneer 3906 und deren siebenter Inzuchtgeneration (IP-7) eine stärkere Reduktion.

Aus Abbildung 21 ist ersichtlich, dass die salzempfindliche Sorte Across 8023 gegenüber der Na^+ -ausschließenden Sorte Pioneer 3906 und deren siebenter Inzuchtgeneration (IP-7) eine hoch signifikant ($P=0,1\%$) schlechtere Na^+ -Exklusion an der Wurzeloberfläche und am Xylemparenchym zeigte. Bei der oben genannten Sorte stieg die Na^+ -Nettoaufnahme an der Wurzeloberfläche und die Na^+ -Menge im Spross (bezogen auf die Na^+ -Menge in der Wurzelmasse) mit der Zunahme der Na^+ -Konzentration im Boden steil an. Die Variabilität der Na^+ -Aufnahme bei dieser Sorte war höher, da Across 8023 eine Populationssorte ist. Obwohl die Inzuchtlinie (IP-7) eine kleinere Wurzelmasse hatte, verhielt sie sich bei geringen Salzstufen im Hinblick auf ihre Na^+ -Nettoaufnahme (bezogen auf die Wurzelmasse) so wie ihre Elternlinie Pioneer 3906. In höheren Salzstufen (8 dS m^{-1}) war die Na^+ -Nettoaufnahme an der Wurzeloberfläche geringfügig, aber signifikant ($P=5\%$) geringer als bei der Hybride Pioneer 3906. Bezüglich der Intensität der Na^+ -Exklusion am Xylemparenchym war IP-7 bei allen Salzstufen genauso gut wie die Sorte Pioneer 3906. In Wasserkulturversuchen hingegen (Kapitel 3.1.3) zeigten die Inzuchtpflanzen (IP-6) gegenüber dem Ausgangsmaterial eine signifikant ($P = 5\%$) effizientere Na^+ -Exklusion am Xylemparenchym.

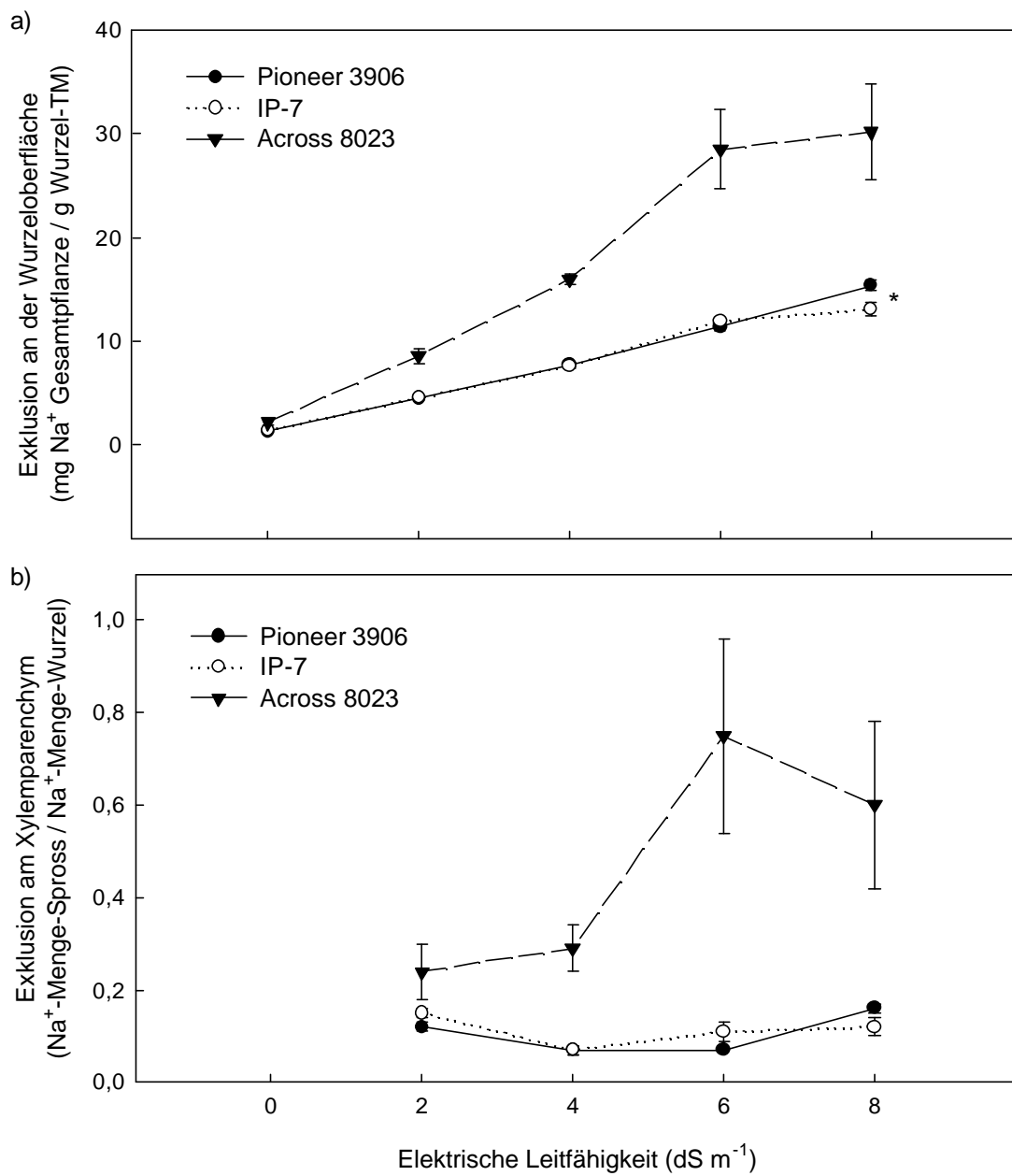


Abb. 21: Einfluss unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen im Bodenversuch während der vegetativen Phase auf die Intensität der Na⁺-Exklusion an der Wurzeloberfläche (a) und am Xylemparenchym (b) der Sorten Across 8023 und Pioneer 3906 sowie deren siebenter Inzuchtgeneration (IP-7)

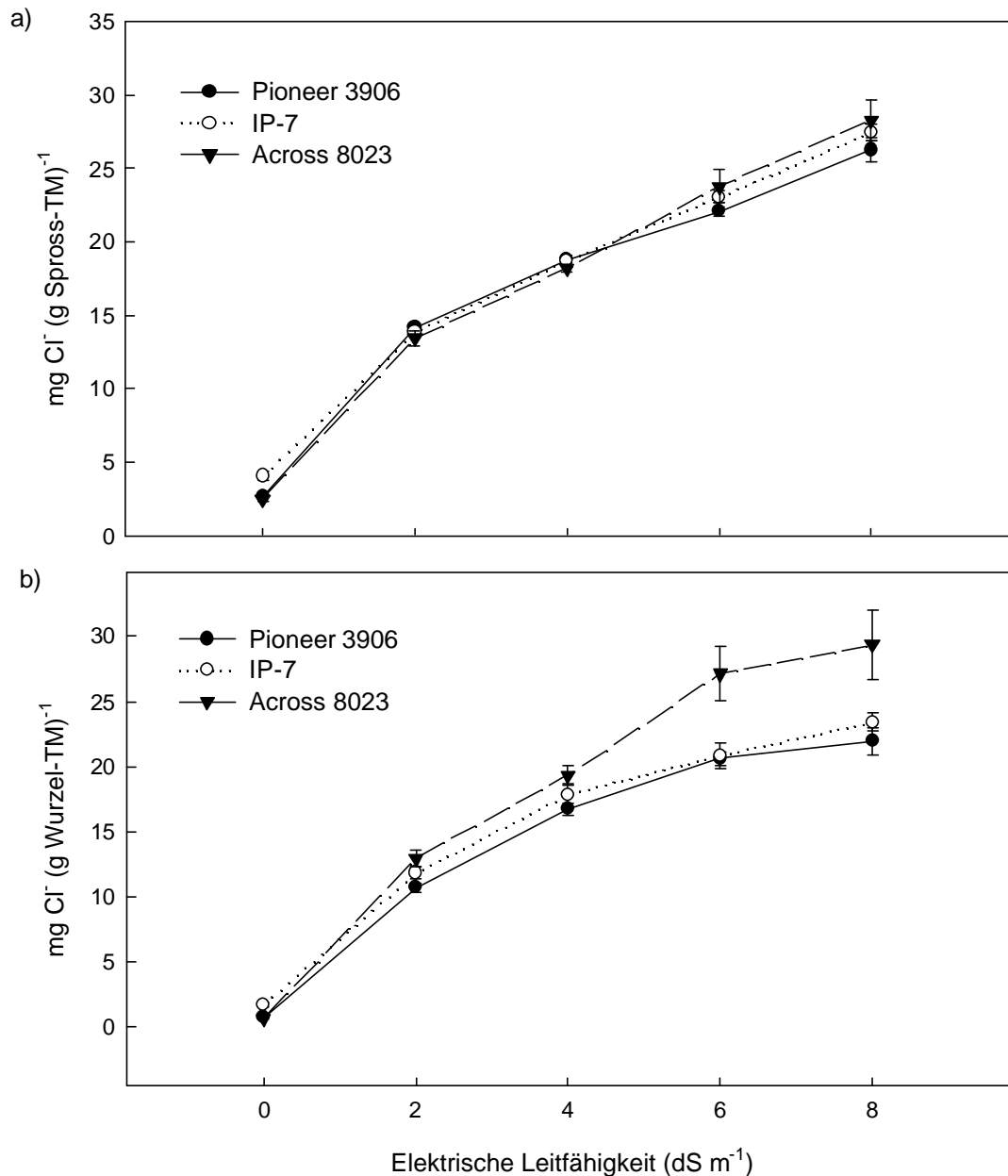


Abb. 22: Einfluss unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen im Bodenversuch während der vegetativen Phase auf die Cl⁻-Konzentrationen im Spross (a) und in der Wurzel (b) der Sorten Across 8023 und Pioneer 3906 sowie deren siebenter Inzuchtgeneration (IP-7)

Die Cl⁻-Konzentrationen in Spross und Wurzel stiegen bei allen Genotypen mit der Zunahme der NaCl-Salinität im Boden in etwa gleichem Maße an. Hierbei fiel der Anstieg in der Wurzel der Sorte Across 8023 ab 6 dS m⁻¹ NaCl-Salinität signifikant stärker aus (Abb. 22). Trotz des verbesserten Na⁺-Exklusionsvermögens der

Inzuchtgeneration (IP-7) gegenüber ihrem Ausgangsmaterial gab es bezüglich der Cl^- -Aufnahme keine signifikanten Unterschiede. Durch die Zunahme der NaCl-Konzentration im Boden fiel bei der Na^+ -exkludierenden Sorte Pioneer 3906 bzw. deren siebenter Inzuchtgeneration (IP-7) und der schwach Na^+ -ausschließenden Sorte Across 8023 die K^+ -Konzentrationen im Spross etwa gleichermaßen ab (Abb.23). Wie in den Wasserkulturversuchen (Kapitel 3.1.3) war auch in diesem Bodenversuch die K^+ -Ernährung der Pflanzen durch das effizientere Na^+ -Exklusionsvermögen nicht stärker beeinträchtigt. Die K^+ -Konzentrationen lagen bei allen Varianten innerhalb der von Bergmann (1992) als ausreichend definierten Konzentrationsbereiche.

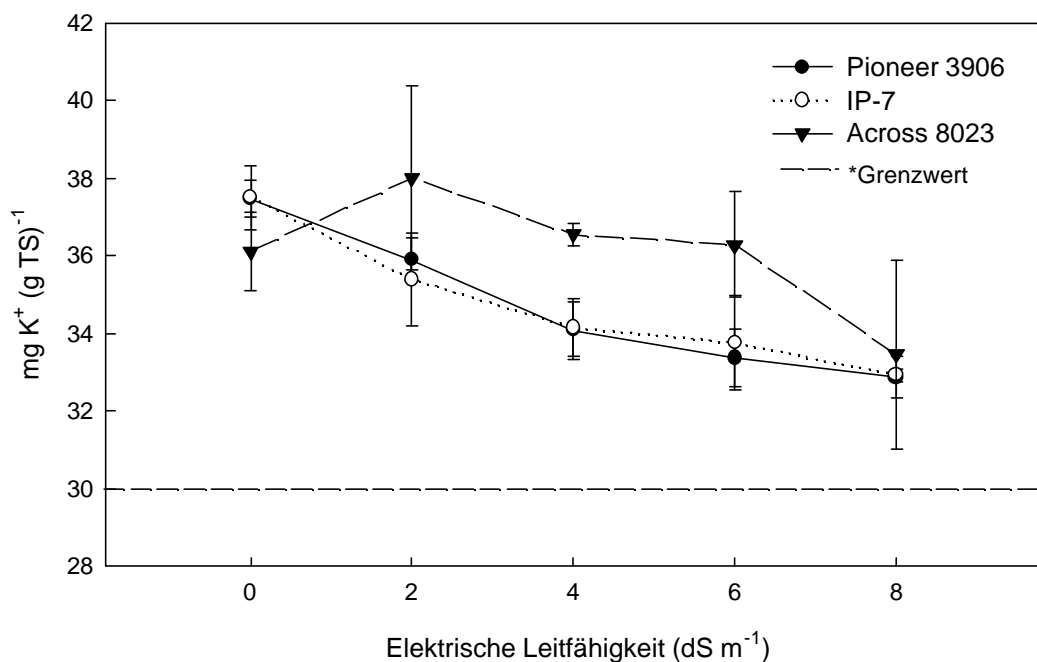


Abb. 23: Einfluss unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen im Bodenversuch während der vegetativen Phase auf die K^+ -Konzentrationen im Spross der Sorten Across 8023 und Pioneer 3906 sowie deren siebenter Inzuchtgeneration (IP-7). *Grenzwert für ausreichende Versorgung der voll entwickelten Maisblätter mit K^+ (30 mg / g TS) nach Bergmann (1992)

3.2 Bedeutung der Ionentoxizität in der ersten Phase des Salzstresses

3.2.1 Einfluss von Dürre- und Salzstress auf das Blattwachstum der Sorte Pioneer 3906

Ziel des Versuches war es zu untersuchen, ob es in der ersten Phase der Salzeinwirkung neben dem osmotischen Stress auch eine ionenspezifische Toxizität gibt. Um dieses nachzuweisen wurde durch PEG eine isoosmotische Bedingung geschaffen (siehe Tab. 2), die der NaCl-Variante entspricht. Anschließend wurde das Wachstum von Pflanzen beider Ansätze miteinander verglichen. Neun Tage nach Behandlungsbeginn waren die Spross- und Wurzelfrischmasse bei der Salz- (NaCl) und Dürrestressvariante (PEG) im Vergleich zur Kontrolle gleichermaßen hoch signifikant ($P = 0,1\%$) reduziert (Abb. 24). Zwischen PEG- und NaCl-Variante traten jedoch keine Unterschiede in der Frischmassebildung der Pflanzen auf.

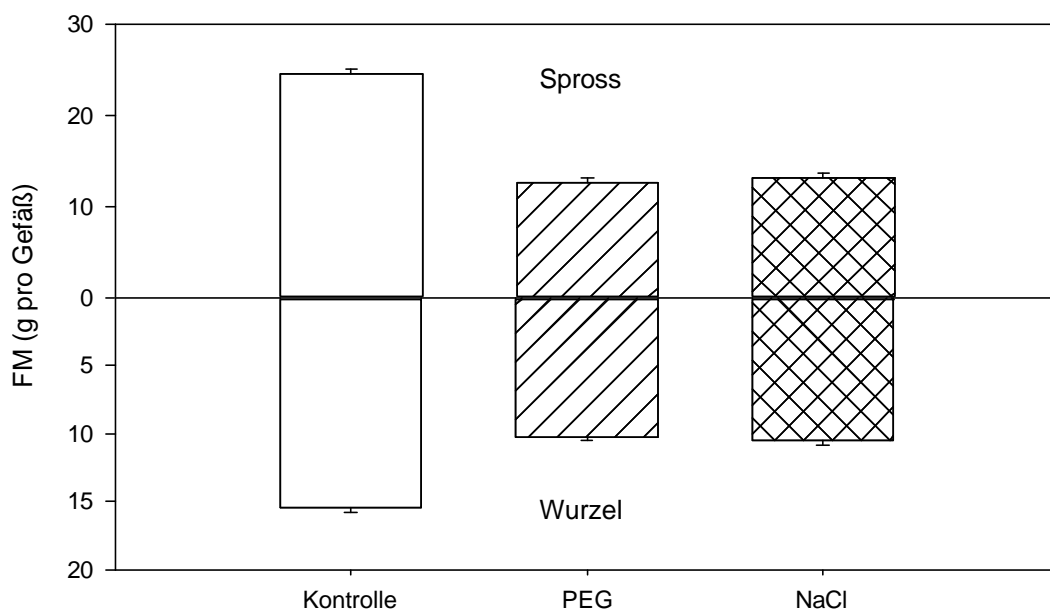


Abb. 24: Auswirkung von Dürre- (PEG) und Salzstress (100 mM NaCl) auf die Spross- und Wurzelfrischmasse der Sorte Pioneer 3906 nach neuntägiger Behandlung bei gleichem Wasserpotential (-0,51 MPa) des Wurzelmediums

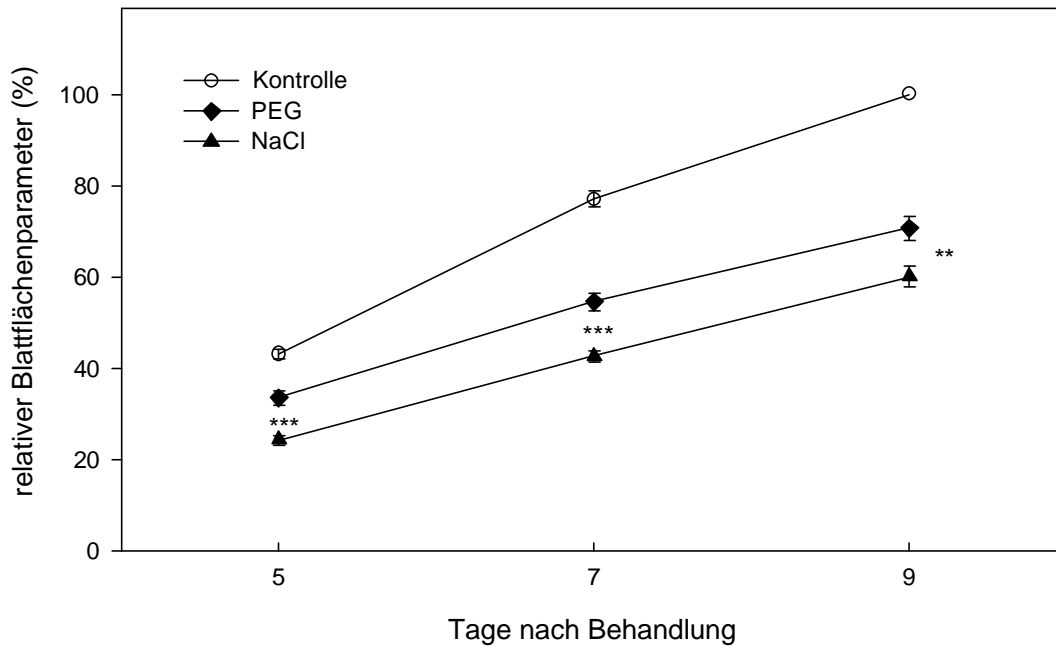


Abb. 25: Auswirkung von Dürre- (PEG) und Salzstress (100 mM NaCl) auf den relativen Flächenparameter (Länge \times Breite) des vierten Blattes der Sorte Pioneer 3906 in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer. Beide Behandlungen hatten im Wurzelmedium das gleiche Wasserpotential von $-0,51$ MPa. Der höchste Blattflächenparameter wurde auf 100% gesetzt.

In Abbildung 25 wurde der relative Blattflächenparameter unter Kontroll-, NaCl- und PEG-Bedingungen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer abgetragen. Der Blattflächenparameter bemisst sich mit dem Produkt aus Länge und Breite des vierten Blattes. Ab dem fünften Tag nahm der relative Blattflächenparameter der Kontrolle gegenüber dem der NaCl- bzw. der PEG-Behandlung stärker zu. Das als empfindlichster Parameter für Streckungswachstum geltende Blattwachstum wurde durch NaCl im Vergleich zu PEG in jedem Zeitpunkt der Messung signifikant stärker reduziert, obwohl in der Frischmasse zwischen den beiden Varianten keine Unterschiede festzustellen waren (s. Abb. 24). Auch die Messung der Blattfläche mit Hilfe eines Blattflächenmessgerätes am neunten Tag zeigte, dass das Wachstum des vierten Blattes durch NaCl im Vergleich zu PEG signifikant ($P = 5,0\%$) stärker reduziert wurde (Abb. 26).

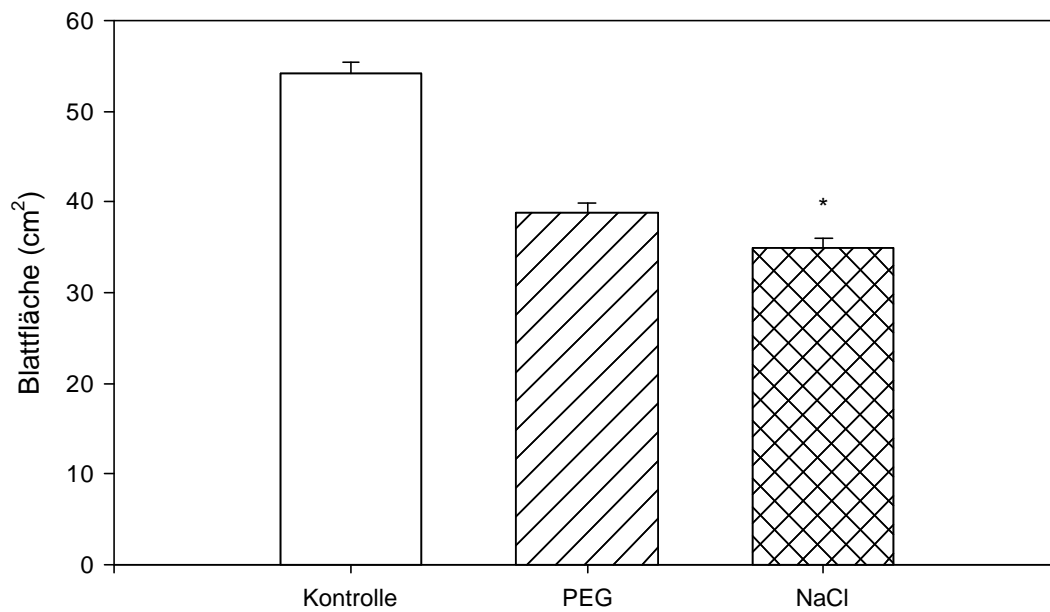


Abb. 26: Auswirkung von Dürre- (PEG) und Salzstress (100 mM NaCl) auf die Fläche des vierten Blattes der Sorte Pioneer 3906 nach neuntägiger Behandlung bei gleichem Wasserpotential (-0,51 MPa) des Wurzelmediums

Tab. 5: Einfluss von Dürre- (PEG) und Salzstress (100 mM NaCl) auf die Epidermiszellenanzahl eines bestimmten Längenabschnittes (480 μm), die Epidermisdicke und die Blattdicke in der Streckungszone vom jüngsten Blatt der Sorte Pioneer 3906 nach neuntägiger Behandlung bei gleichem Wasserpotential (-0,51 MPa) des Wurzelmediums. Anzahl und Dicke sind Mittelwerte der oberen und unteren Epidermiszellen.

Variante	Anzahl der Epidermiszellen	Epidermisdicke (μm)	Blattdicke (μm)
Kontrolle	11,9 \pm 0,2	29,09 \pm 1,49	162,00 \pm 9,20
PEG	13,3 \pm 0,4	21,83 \pm 0,68	135,60 \pm 4,69
NaCl	15,5 \pm 0,2	19,06 \pm 0,58	123,89 \pm 4,24

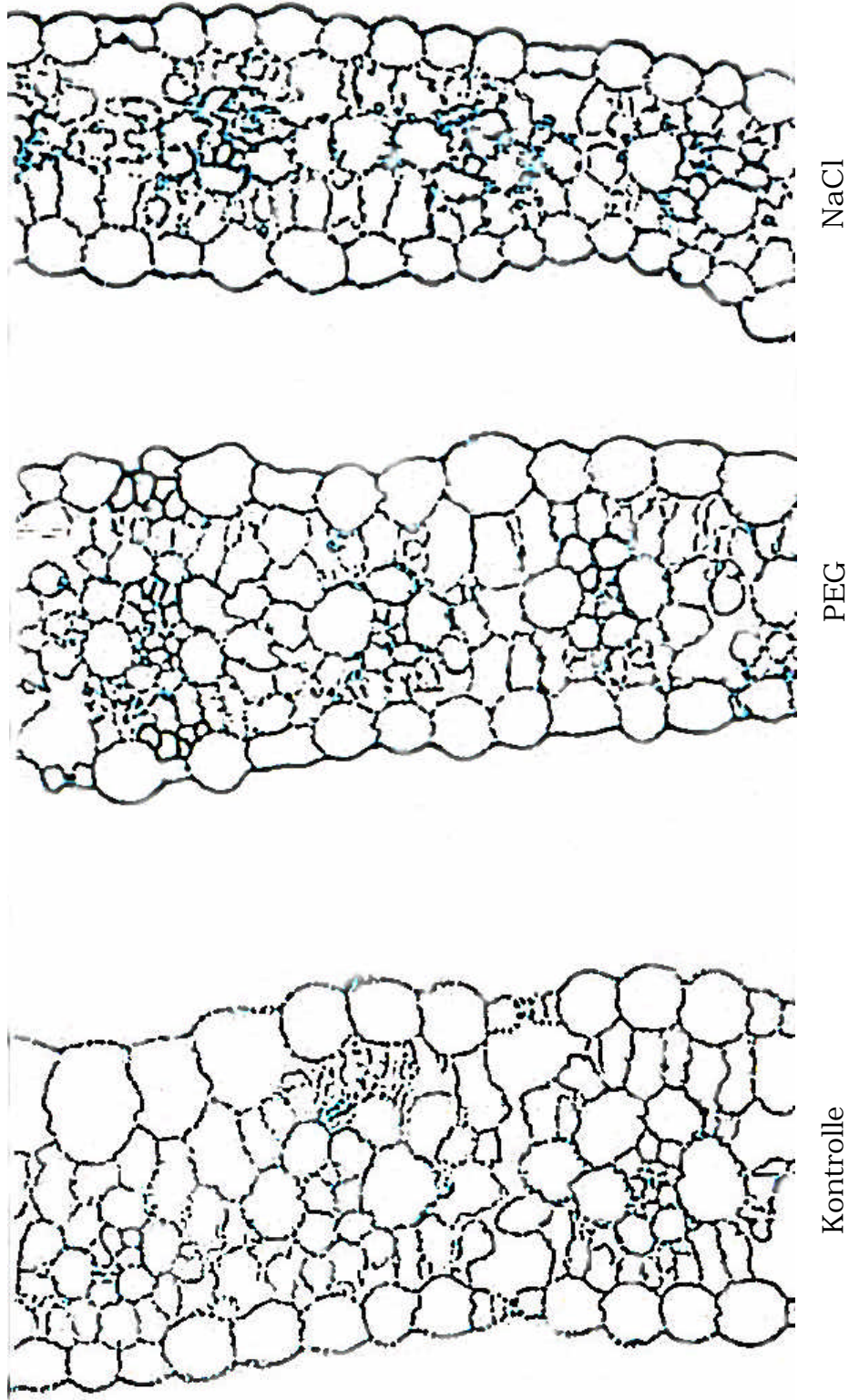


Abb. 27: Lichtmikroskopische-Aufnahmen des Blattquerschnittes aus der Streckungszone der Sorte Pioneer 3906 (Vergrößerung 100X). Gezeigt werden repräsentative Querschnitte aus 15 Aufnahmen.

Die Querschnitte der jüngsten Blätter in der Streckungszone zeigen, dass Epidermisdicke und Blattdicke der stressbehandelten Pflanzen (NaCl und PEG) gegenüber den Kontrollpflanzen hoch signifikant ($P=0,1\%$) vermindert waren (Tabelle 5). Wird ein osmotischer Stress, induziert durch Polyethylenglycol (PEG 6000), bei gleichem Wasserpotential mit dem Einfluss von 100 mM NaCl verglichen, so zeigt sich in der Streckungszone der Maisblätter eine signifikant ($P = 5,0\%$) geringere Epidermisdicke durch NaCl im Vergleich zu PEG. Bei der Blattdicke zwischen diesen beiden Varianten sind dagegen keine Unterschiede zu verzeichnen. Die Anzahl der Epidermiszellen pro definiertem Längenabschnitt waren bei den Kontrollpflanzen im Vergleich zu den mit Stress behandelten Pflanzen signifikant geringer. Die Blattquerschnitte der mit NaCl-behandelten Pflanzen zeigten in einer bestimmten Länge gegenüber den PEG-Blattquerschnitten eine signifikant ($P = 1,0\%$) höhere Anzahl von Epidermiszellen. Diese höhere Anzahl an Epidermiszellen dürfte auf eine geringere Zellstreckung zurückzuführen sein.

Sowohl die morphologischen (Blattwachstumswerte) als auch die histologischen (Epidermisdicke und Anzahl der Epidermiszellen) Ergebnisse verdeutlichen, dass das Streckungswachstum unter Salzstress (NaCl) gegenüber dem Dürrestress (PEG), welche beide isoosmotische Bedingungen aufweisen, stärker beeinträchtigt wurde. Das deutet darauf hin, dass in der ersten Phase der Salzeinwirkung neben osmotischem Stress zusätzlich auch Ioneneffekte zur Wachstumsreduktion führten.

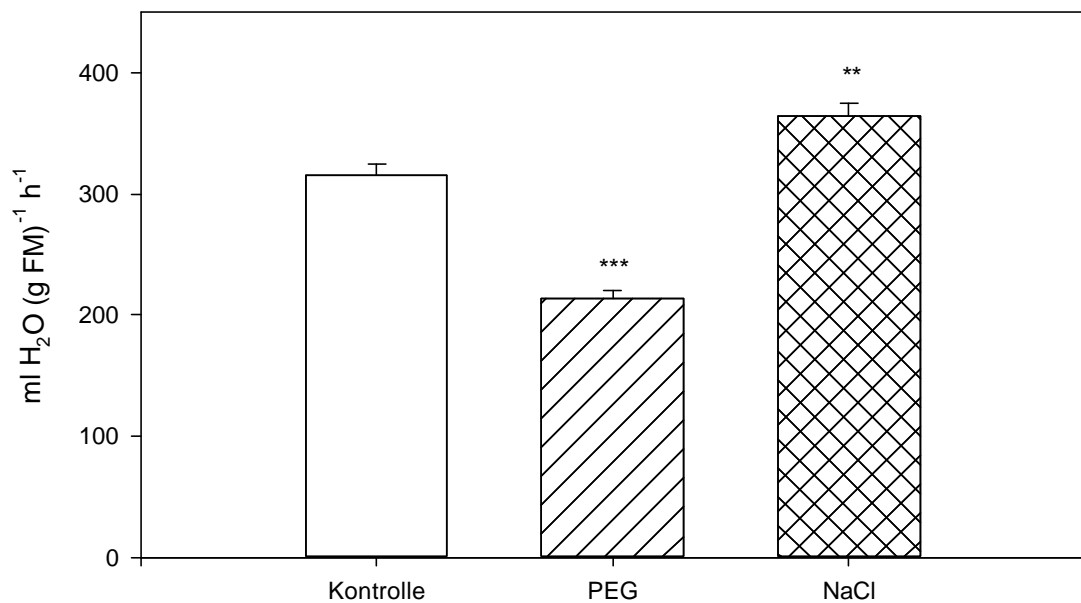


Abb. 28: Einfluss von Dürre- (PEG) und Salzstress (100 mM NaCl) auf die Transpiration der Sorte Pioneer 3906 nach achttägiger Behandlung bei gleichem Wasserpotential (-0,51 MPa) des Wurzelmediums. Die Transpirationswerte wurden durch Wiegen des Gefäßes ermittelt.

Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, wiesen die mit NaCl behandelten Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen signifikant ($P = 1,0\%$) höhere Transpirationsraten auf. Die dürrestressbehandelten Pflanzen (PEG) zeigten jedoch gegenüber der Kontrolle und der NaCl-Variante hoch signifikant geringere ($P = 0,1\%$) Transpirationswerte.

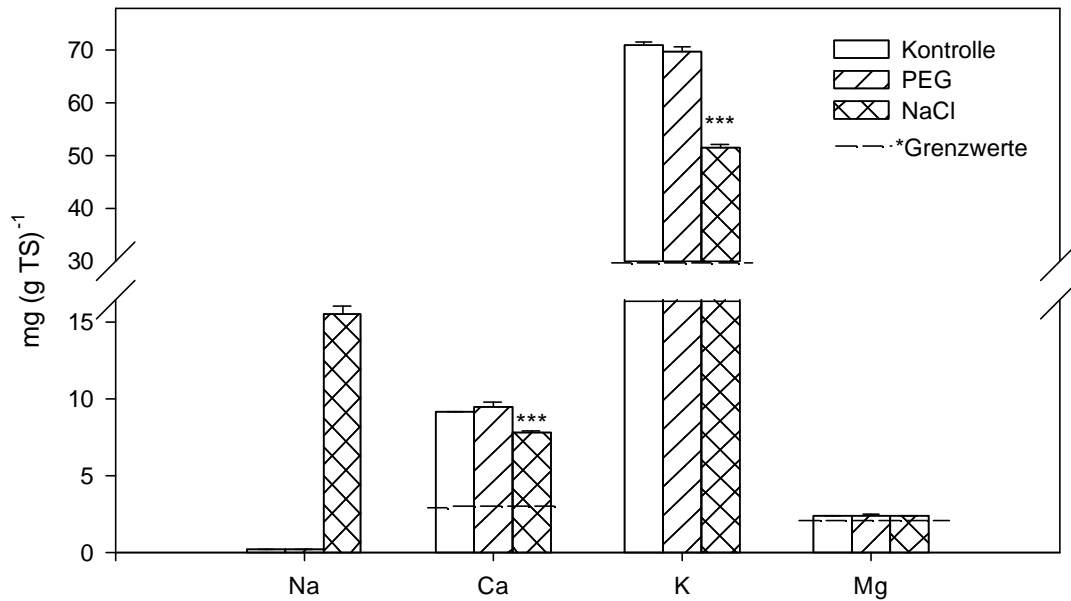


Abb. 29: Einfluss von Dürre- (PEG) und Salzstress (100 mM NaCl) auf die Na⁺-, K⁺-, Ca²⁺-, und Mg²⁺-Konzentrationen im Gesamtspross der Sorte Pioneer 3906 nach neuntägiger Behandlung bei gleichem Wasserpotential (-0,51 MPa) des Wurzelmediums. *Grenzwerte für ausreichende Versorgung der voll entwickelten Maisblätter mit K⁺ (30 mg / g TS), Ca²⁺ (3 mg / g TS) und Mg²⁺ (2,5 mg / g TS) nach Bergmann (1992)

NaCl-Zugabe führte erwartungsgemäß zu hoher Na⁺-Konzentration in der Pflanze (Abb. 29). Die Ca²⁺- und K⁺-Konzentration im Spross der PEG-Variante blieben gegenüber der Kontrolle unverändert. Durch den durch NaCl verursachten osmotischen Stress in der ersten Phase der Salzeinwirkung nahm dagegen die Konzentration an Ca²⁺ und besonders an K⁺ in der Sprosstrockenmasse ab. Zwischen den Mg²⁺-Konzentrationen in den Sprossen der Varianten konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Bei allen Behandlungen lagen die jeweiligen Nährstoffkonzentrationen oberhalb der von Bergmann (1992) als ausreichend definierten Grenzen. Die zusätzliche Blattwachstumsreduktion bei der Salzvariante (NaCl) gegenüber der PEG-Variante könnte nach diesen Ergebnissen auf eine Iontoxizität zurückzuführen sein.

3.2.2 Einfluss von Dürre- und Salzstress auf das Blattwachstum der Sorten Pioneer 3906 und Across 8023

Um zu testen, ob es in der ersten Phase der Salzeinwirkung neben osmotischem Stress tatsächlich einen Salzeffekt gibt, wurde dieser Versuch zusätzlich mit einer schwach Na⁺-ausschließenden Maissorte Across 8023 durchgeführt.

Aus Abbildung 30 ist zu erkennen, dass es neun Tage nach Behandlungsbeginn hinsichtlich der Reduktion des Blattflächenparameters keinen Sortenunterschied zwischen der NaCl- und PEG-Variante gibt. Wird ein osmotischer Stress, induziert durch Polyethylenglycol (PEG 6000), bei gleichem Wasserpotential mit dem Einfluss von 100 mM NaCl verglichen, so zeigt sich bei beiden Sorten ein signifikant (P=1,0%) stärker reduziertes Blattwachstum durch NaCl im Vergleich zu PEG.

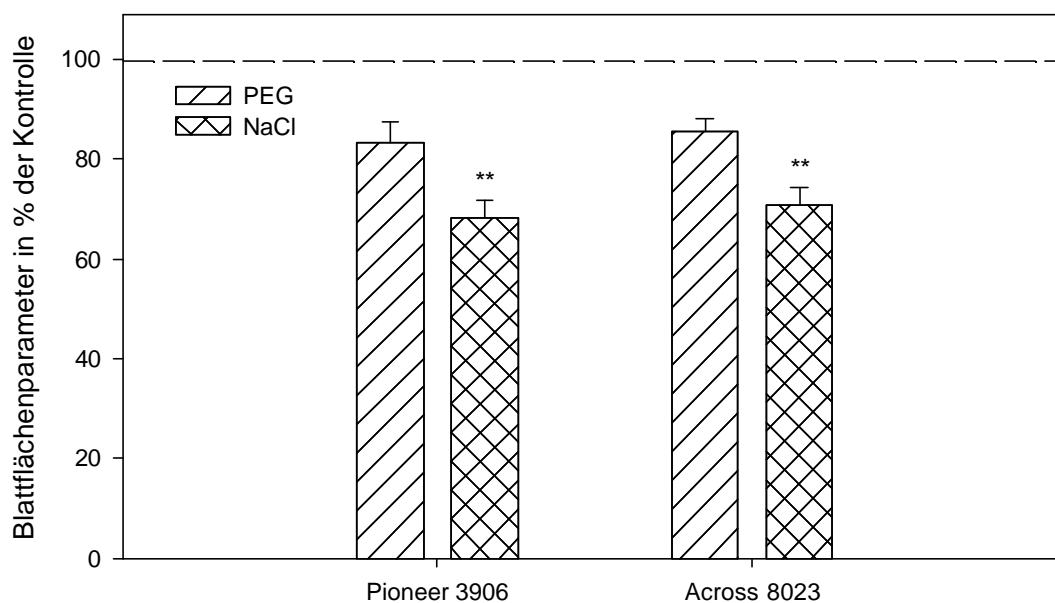


Abb. 30: Auswirkung von Dürre- (PEG) und Salzstress (100 mM NaCl) auf den Flächenparameter (Länge × Breite) des vierten Blattes der Sorten Pioneer 3906 und Across 8023 nach neuntägiger Behandlung bei gleichem Wasserpotential (-0,51 MPa) des Wurzelmediums. 100% entsprechen dem Blattflächenparameter der Kontrolle.

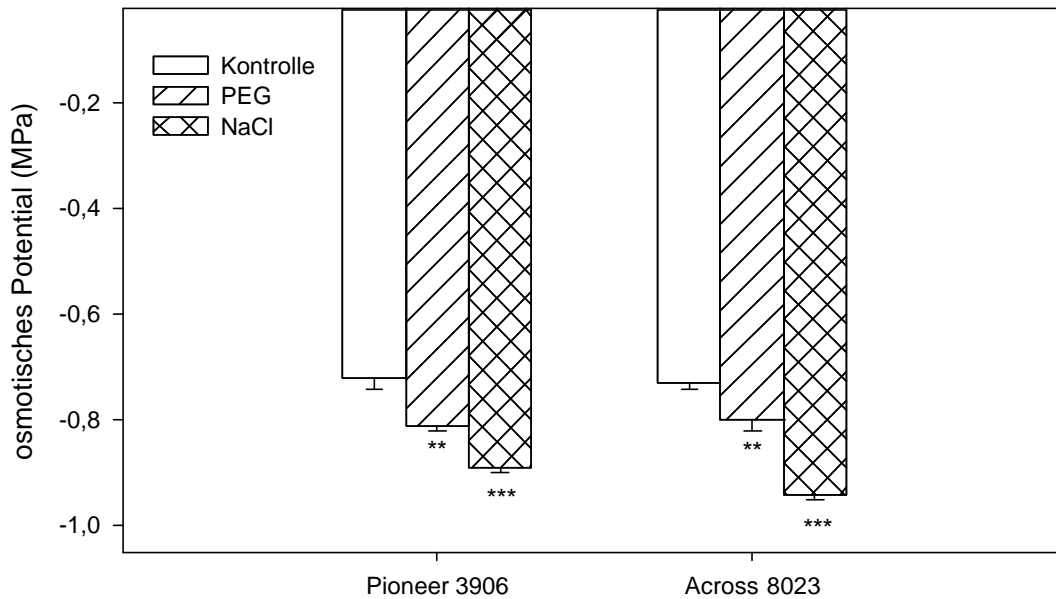


Abb. 31: Auswirkung von Dürre- (PEG) und Salzstress (100 mM NaCl) auf das osmotische Potential der jüngsten Blätter der Sorten Pioneer 3906 und Across 8023 nach neuntägiger Behandlung bei gleichem Wasserpotential (-0,51 MPa) des Wurzelmediums

Die Messung des osmotischen Potentials ergab signifikant niedrigere Werte beider Sorten nach neuntägiger NaCl- bzw. PEG-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Abb. 31). Die NaCl-Varianten wiesen im Vergleich zu den Dürrestressvarianten (PEG) signifikant niedrigere osmotische Potentiale auf, was auf eine bessere osmotische Anpassung hindeutet, wobei der Blattflächenparameter unter diesen Bedingungen allerdings noch stärker reduziert wurde (s. Abb. 30). Mit Ausnahme des osmotischen Potentials, das bei "Across 8023" mit NaCl-Behandlung niedriger lag als bei "Pioneer 3906" ($P = 1,0\%$), wurden keine signifikanten Sortenunterschiede festgestellt. Aus diesem Grund passte sich die Sorte Across 8023 unter Salzstress osmotisch besser an als die Sorte Pioneer 3906. Trotzdem konnte unter NaCl-Bedingungen zwischen den beiden Sorten hinsichtlich des Blattflächenparameters kein Unterschied festgestellt werden (s. Abb. 30). Vergleicht man dagegen die Na^+ -Konzentration der beiden Maisorten, so zeigte sich bei "Across 8023" eine signifikant höhere ($P =$

1,0%) Na^+ -Aufnahme im Restspross als bei "Pioneer 3906" (Abb. 32a), während in den jüngsten Blätter hinsichtlich der Na^+ -Konzentration kein signifikanter Unterschied festzustellen war (Abb. 32b).

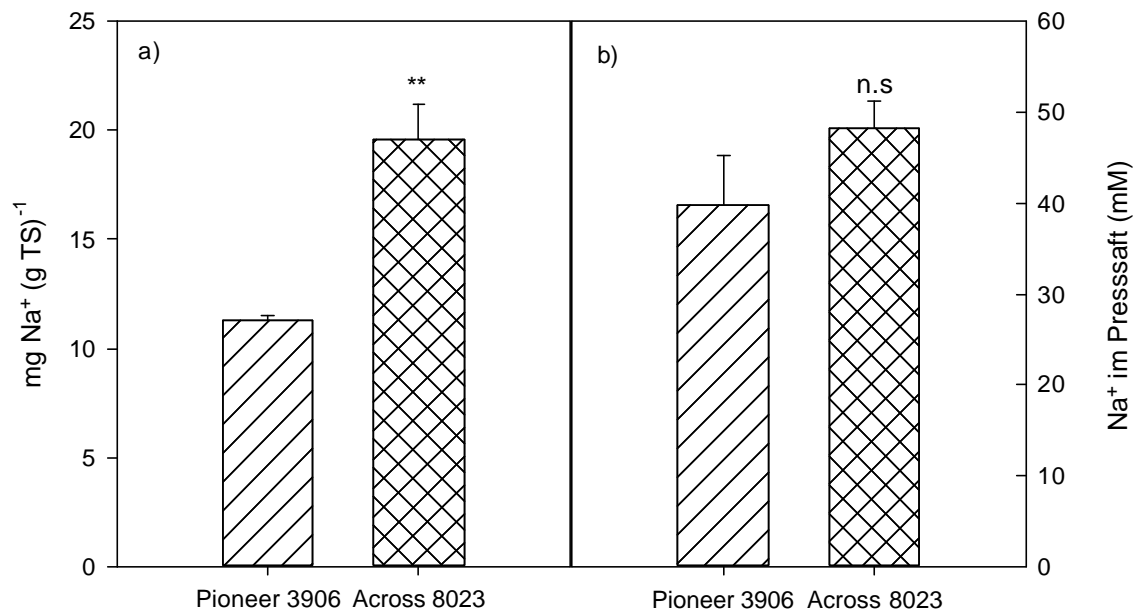


Abb. 32: Einfluss von Salzstress (100 mM NaCl) auf die Na^+ -Konzentrationen im Restspross (a) und in dem jeweils jüngsten Blatt (b) der Sorten Pioneer 3906 und Across 8023 nach neuntägiger Behandlung bei gleichem Wasserpotential (-0,51 MPa) des Wurzelmediums. Die Bestimmung von Na^+ in den jüngsten Blättern erfolgte im Presssaft.

Aus Abbildung 33 ist ersichtlich, dass die mit Na^+ behandelten Pflanzen insgesamt niedrigere K^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen im Spross aufwiesen als die mit PEG behandelten Pflanzen. Ebenfalls ist deutlich zu sehen, dass unter Salzstress (NaCl) die Ca^{2+} - und besonders die K^+ -Konzentration im Spross der Sorte Across 8023 im Vergleich zu "Pioneer 3906" stärker reduziert war. Trotzdem konnte unter NaCl-Bedingungen zwischen den beiden Sorten im Hinblick auf das Merkmal Blattflächenparameter kein Unterschied festgestellt werden (s. Abb. 30). Nach Bergmann (1992) lagen die Nährstoffkonzentrationen bei allen Varianten oberhalb der als ausreichend definierten Grenze.

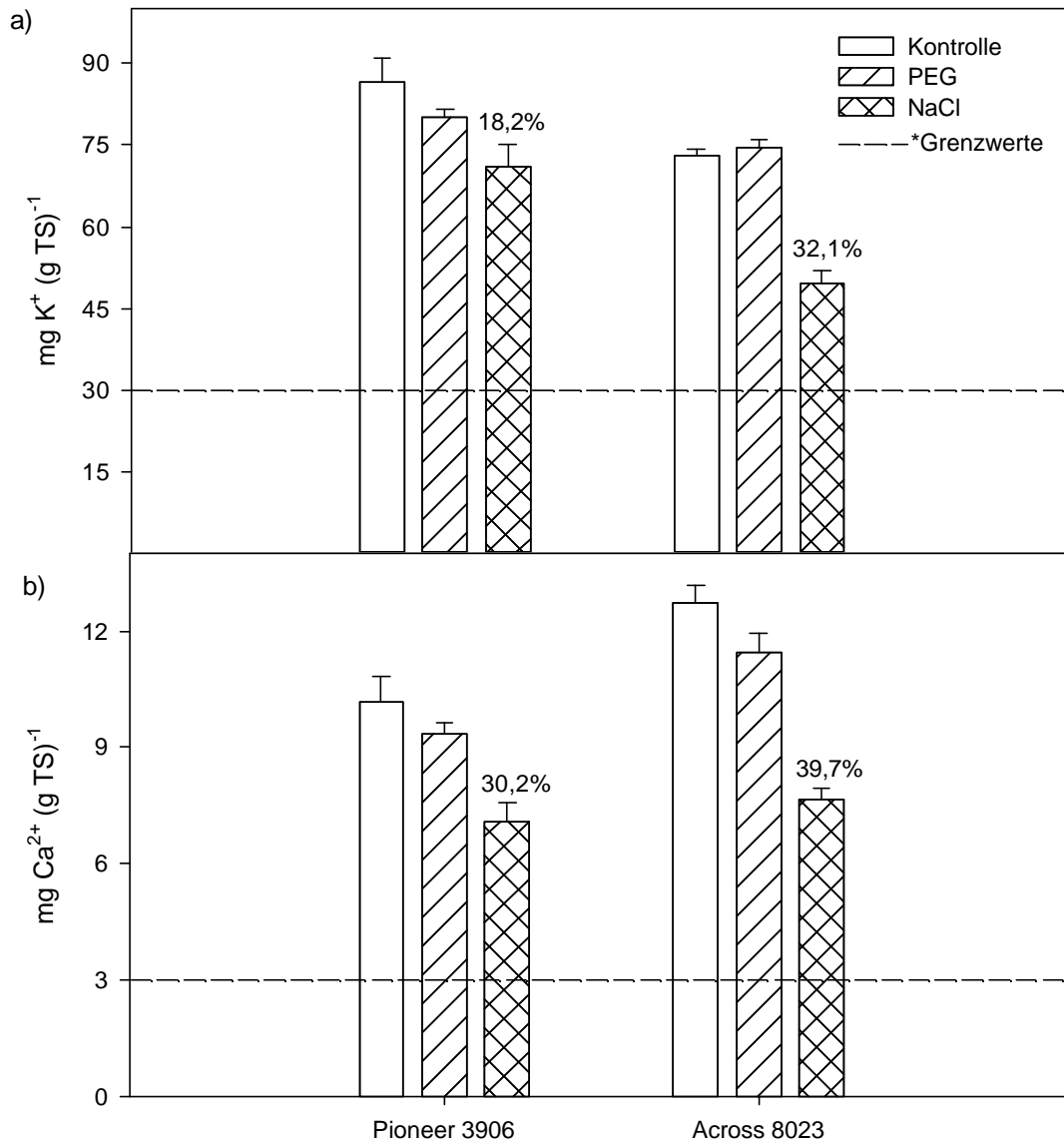


Abb. 33: Einfluss von Dürre- (PEG) und Salzstress (100 mM NaCl) auf K⁺-Konzentration (a) und Ca²⁺-Konzentration (b) im Restspross der Maissorten Pioneer 3906 und Across 8023 nach neuntägiger Behandlung bei gleichem Wasserpotential (-0,51 MPa) des Wurzelmediums. Die Prozentwerte kennzeichnen die Reduktion der K⁺- bzw. Ca²⁺-Konzentration im Spross unter dem Einfluss von 100 mM NaCl gegenüber der Kontrolle. *Grenzwerte für ausreichende Versorgung der voll entwickelten Maisblätter mit K⁺ (30 mg / g TS) und Ca²⁺ (3 mg / g TS) nach Bergmann (1992)

3.2.3 Einfluss verschiedener Salze auf das Blattwachstum der Sorte Pioneer 3906

Ziel des nachfolgenden Versuches war es zu untersuchen, welches Ion (Na^+ oder Cl^-) in der ersten Phase der Salzeinwirkung für die Hemmung des Streckungswachstums verantwortlich ist, da in den vorangegangenen Versuchen bei den NaCl-Varianten eine zusätzliche Hemmung gegenüber der Trockenstressvariante (PEG) festgestellt wurde. Um dieses nachzuweisen wurden die Anionen und Kationen der Salzlösungen variiert. Um zu klären, ob die zusätzliche Wachstumsreduktion durch Na^+ oder Cl^- beeinflusst wurde, gab man MgCl_2 bzw. Na_2SO_4 in äquivalenter Ionenkonzentrationen der Nährlösung zu. Außerdem wurde bei den Na_2SO_4 - und MgCl_2 -Behandlungen dem Wurzelmedium PEG zugegeben, um das Wasserpotential der Salzlösungen analog der 100 mM NaCl-Variante auszugleichen (s. Tab. 3).

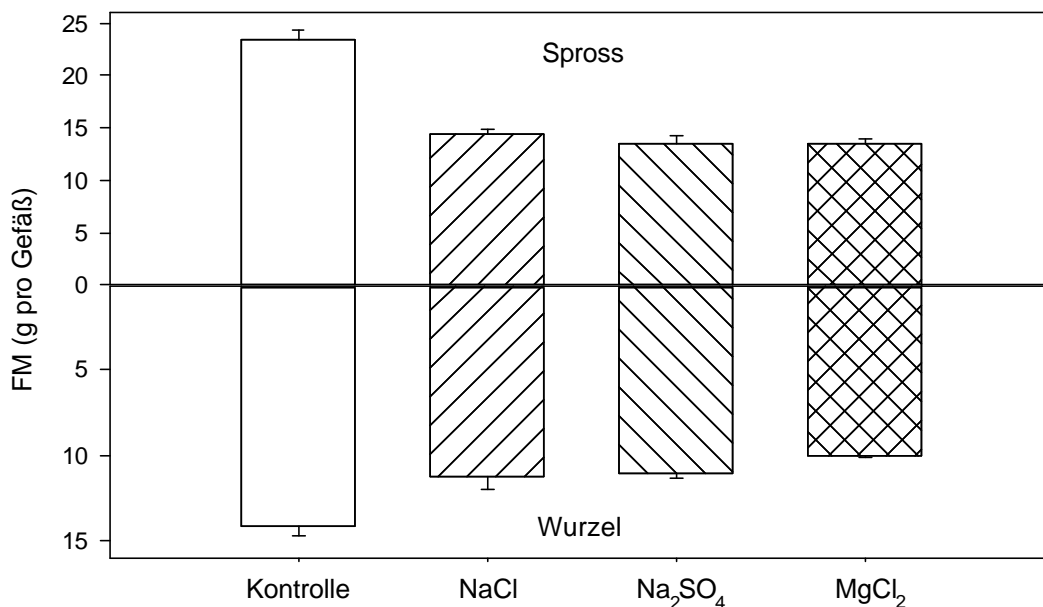


Abb. 34: Einfluss einer neuntägigen Behandlung mit 100 mM NaCl, 50 mM Na_2SO_4 und 50 mM MgCl_2 auf die Spross- und Wurzelfrischmasse der Sorte Pioneer 3906. Das Wasserpotential verschiedener Salzlösungen wurde mit PEG auf -0,51 MPa eingestellt.

Das Sprosswachstum war durch die verschiedenen Salzbehandlungen stärker beeinträchtigt als das Wurzelwachstum (Abb. 34). In der Sprossfrischmasse konnte zwischen den Salzvarianten kein Unterschied festgestellt werden, während die Wurzelfrischmasse durch die MgCl_2 -Behandlung im Vergleich zu den Na^+ -Varianten (NaCl und Na_2SO_4) signifikant ($P = 5,0\%$) stärker reduziert wurde.

Ab dem fünften Tag war das als empfindlichster Parameter für Streckungswachstum geltende Blattwachstum der Na^+ -Varianten (NaCl und Na_2SO_4) gegenüber der MgCl_2 -Variante signifikant stärker beeinträchtigt (Abb. 35). Dieser Unterschied wurde mit Fortsetzung des Versuches kleiner, weil zu hohe Konzentrationen an Mg^{2+} im Wurzelmedium auf das Wachstum ebenfalls toxisch wirken können (s. Abb. 34).

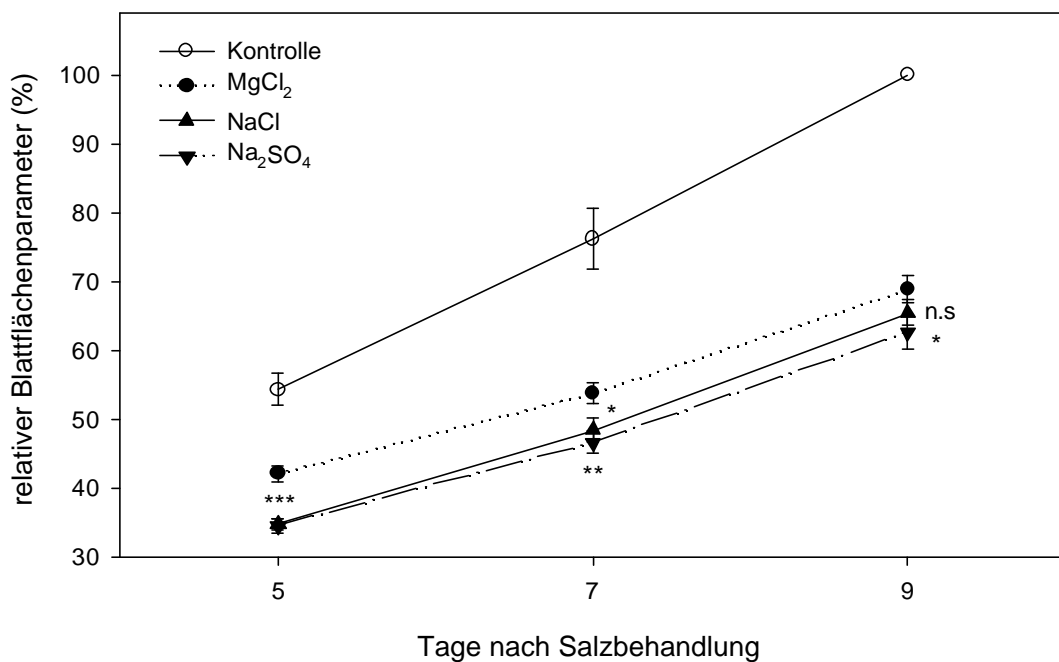


Abb. 35: Auswirkung von 100 mM NaCl , 50 mM Na_2SO_4 und 50 mM MgCl_2 auf den relativen Flächenparameter (Länge \times Breite) des vierten Blattes der Sorte Pioneer 3906 in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer. Das Wasserpotential verschiedener Salzlösungen wurde mit PEG auf $-0,51$ MPa eingestellt. Der höchste Blattflächenparameter wurde auf 100% gesetzt.

Am neunten Tag nach Beginn der Salzbehandlung konnten allerdings nur zwischen der MgCl_2 - und Na_2SO_4 -Behandlung signifikante Unterschiede ($P = 5,0\%$) bezüglich des Blattflächenparameters festgestellt werden. Zu jedem Zeitpunkt der Messung zeigte Na_2SO_4 eine mit NaCl vergleichbare Wachstumshemmung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wachstumsreduktion in der ersten Phase der Salzeinwirkung nicht auf eine Cl^- -Toxizität sondern auf einen Na^+ -Effekt zurückgeht.

Bei diesem Versuch waren zwischen den Na^+ -Varianten (NaCl und Na_2SO_4) und der Kontrolle in der Transpiration keine Unterschiede festzustellen, wobei die Pflanzen unter MgCl_2 -Behandlung hoch signifikant ($P = 0,1\%$) weniger transpirierten (Abb. 36). Dagegen zeigte die NaCl -Variante signifikant höhere ($P = 1,0\%$) Transpirationswerte als die Na_2SO_4 -Variante.

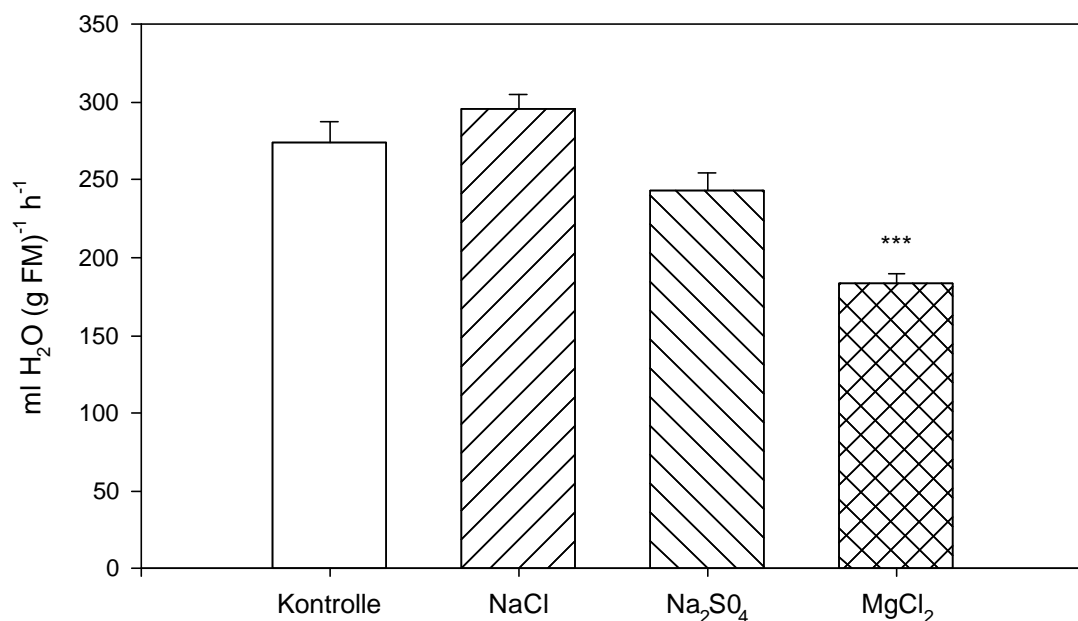


Abb. 36: Einfluss verschiedener Salze auf die Transpiration der Sorte Pioneer 3906 nach achttägiger Behandlung bei gleichem Wasserpotential ($-0,51$ MPa) des Wurzelmediums. Die Transpirationswerte wurden durch Wiegen des Gefäßes ermittelt.

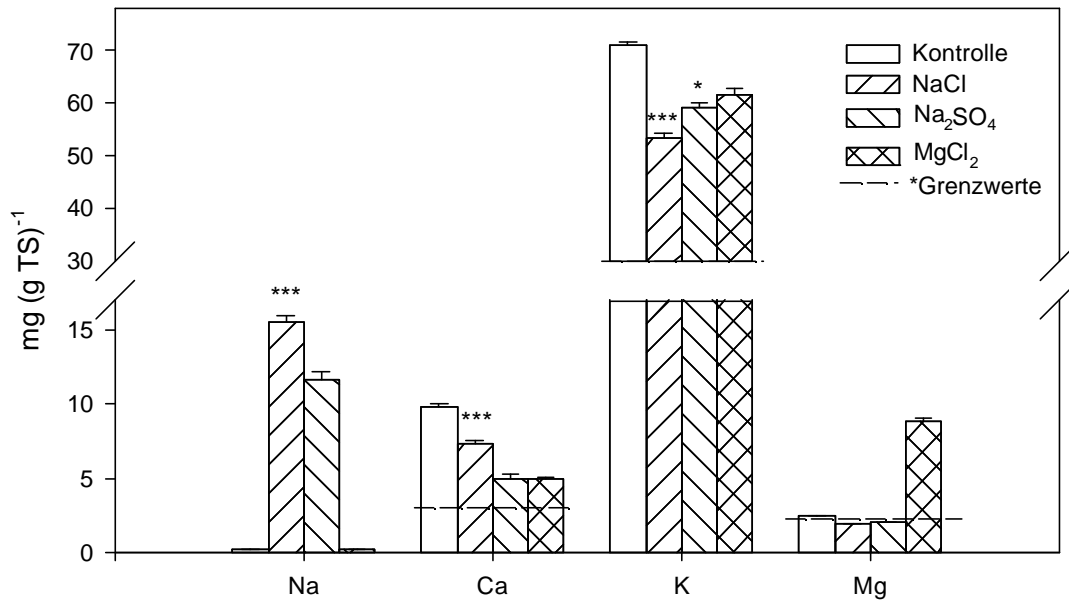


Abb. 37: Einfluss einer neuntägigen Behandlung mit 100 mM NaCl, 50 mM Na₂SO₄ und 50 mM MgCl₂ auf die Na⁺-, K⁺-, Ca²⁺-, und Mg²⁺-Konzentrationen im Gesamtspross der Sorte Pioneer 3906. Das Wasserpotential verschiedener Salzlösungen wurde mit PEG auf -0,51 MPa eingestellt. *Grenzwerte für ausreichende Versorgung der voll entwickelten Maisblätter mit K⁺ (30 mg / g TS), Ca²⁺ (3 mg / g TS) und Mg²⁺ (2,5 mg / g TS) nach Bergmann (1992)

In Abbildung 37 ist zu erkennen, dass die Pflanzen unter NaCl-Bedingungen signifikant ($P = 0,1\%$) mehr Na⁺ und Ca²⁺ im Spross aufwiesen als unter Na₂SO₄-Bedingungen, obwohl unter Zugabe von 100 mM Na⁺ mit unterschiedlichen Begleit-anionen (Cl⁻/SO₄²⁻) zu jedem Zeitpunkt der Messung keine Unterschiede im Blattflächenparameter festgestellt wurden (s. Abb. 35). Besonders bei der Behandlung mit NaCl, aber auch mit Na₂SO₄, waren die K⁺-Konzentrationen im Spross gegenüber der MgCl₂-Variante signifikant geringer, was zu dem geringeren Blattflächenparameter geführt haben könnte, obwohl in allen Varianten die Pflanzen nach Bergmann (1992) ausreichend mit K⁺ versorgt waren. Nach diesen Ergebnissen ist die zusätzliche Reduktion des Streckungswachstums in der ersten Phase einer Salzeinwirkung wahrscheinlich auf eine Na⁺-Toxizität, und nicht auf einen durch Na⁺ induzierten latenten K⁺-Mangel zurückzuführen.

3.2.4 Einfluss einer variierten K^+ -Konzentration auf das Blattwachstum der Sorte Pioneer 3906

Ziel des Versuches war es die Hypothese zu testen, dass die zusätzliche Hemmung des Streckungswachstums unter Salzstress auf einen durch Na^+ induzierten, latenten K^+ -Mangel zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurde bei den PEG-Varianten die K^+ -Konzentration von 1,2 auf 0,4 mM K^+ in 0,2 mM Schritten reduziert und dabei mit der NaCl-Variante, die sonst 1,2 mM K^+ enthielt, bezüglich der Merkmale Wachstum und Ionenkonzentrationen verglichen.

Aus Abbildung 38 ist ersichtlich, dass der relative Blattflächenparameter des vierten Blattes bei der NaCl-Variante im Vergleich zu

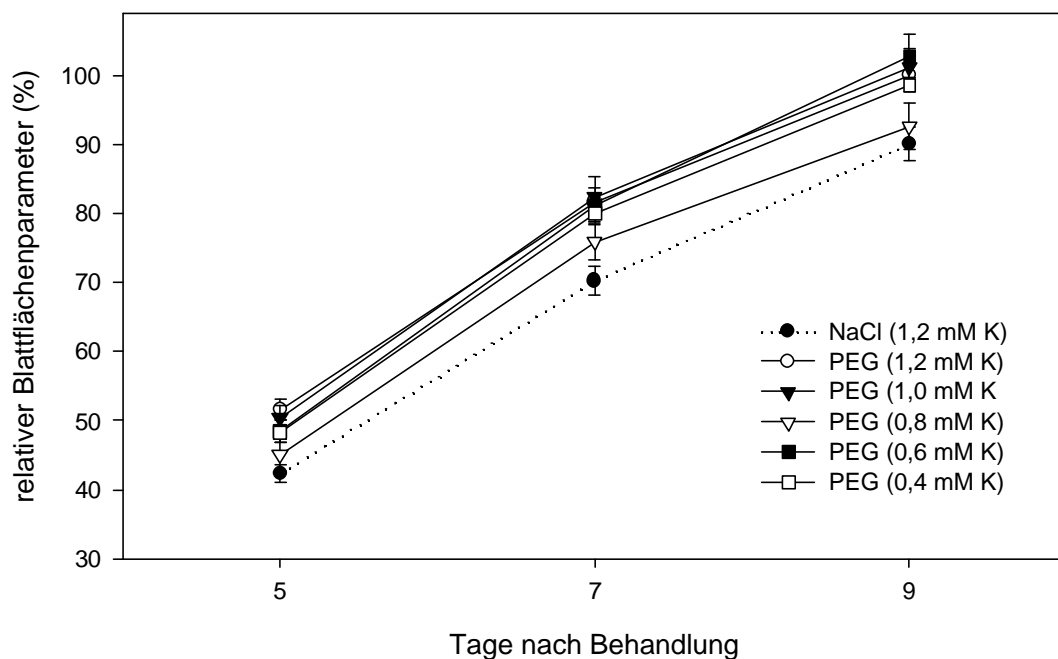


Abb. 38: Auswirkung von Salz- (100 mM NaCl) und Dürrestress (PEG) bei variiertes K^+ -Konzentration auf den relativen Flächenparameter (Länge \times Breite) des vierten Blattes der Sorte Pioneer 3906 in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer. Alle Behandlungen hatten im Wurzelmedium das gleiche Wasserpotential von -0,51 MPa. Der höchste Blattflächenparameter wurde auf 100% gesetzt.

den PEG-Varianten (bis auf die PEG-Variante mit 0,8 mM K⁺ in der Nährlösung) zu jedem Zeitpunkt der Messung signifikant kleiner war. Die Ca²⁺-Konzentration im vierten und im jüngsten Blatt wurde am stärksten durch Salzstress (100 mM NaCl) beeinträchtigt (Abb. 39). Bei den PEG-Varianten verringerte sich die Ca²⁺-Konzentration stetig mit steigender K⁺-Konzentration in der Nährlösung. Trotzdem verhielt sich der Blattflächenparameter bei allen PEG-Varianten identisch. Die Ca²⁺-Konzentrationen waren in den jüngsten Blättern, außer bei der PEG-Variante mit 0,6 und 0,4 mM K⁺ in der Nährlösung, unterhalb der von Bergmann (1992) als ausreichend definierten Grenze. Dabei lagen die Ca²⁺-Konzentrationen im vierten Blatt, in dem das Blattwachstum gemessen wurde, bei allen Varianten nicht im Mangelbereich. Darum ist die zusätzliche Reduktion des Streckungswachstums unter Salzstress nicht auf einen Na⁺ induzierten Ca²⁺-Mangel zurückzuführen.

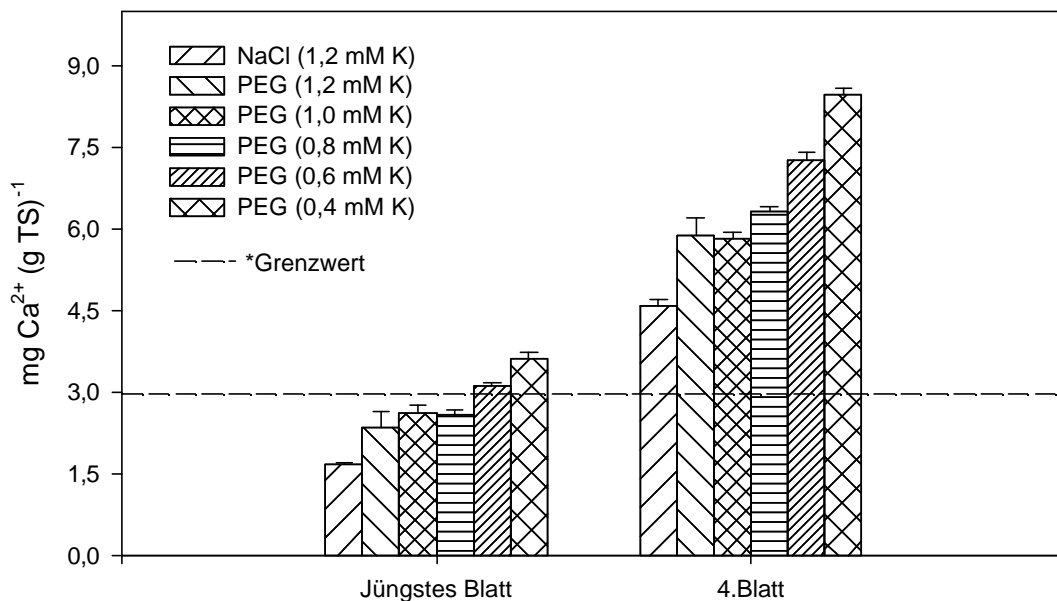


Abb. 39: Einfluss von Salz- (100 mM NaCl) und Dürrestress (PEG) bei variierter K⁺-Konzentration auf die Ca²⁺-Konzentration im jüngsten und im vierten Blatt der Sorte Pioneer 3906 nach neuntägiger Behandlung bei gleichem Wasserpotential (-0,51 MPa) des Wurzelmediums. *Grenzwert für ausreichende Versorgung der voll entwickelten Maisblätter mit Ca²⁺ (3 mg / g TS) nach Bergmann (1992)

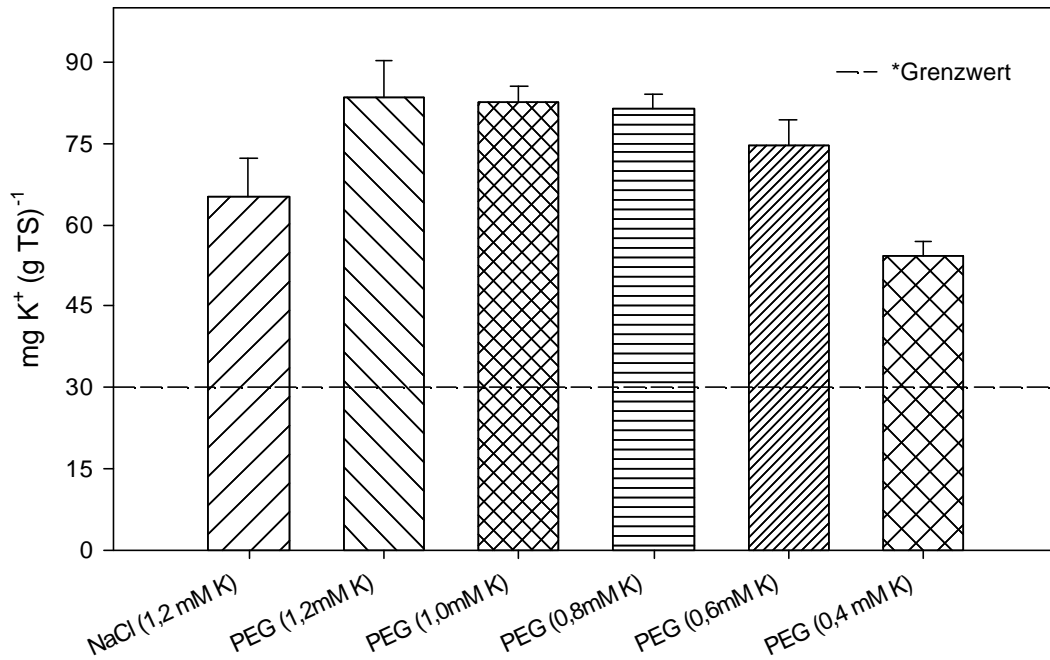


Abb. 40: Einfluss von Salz- (100 mM NaCl) und Dürrestress (PEG) bei variiertes K^+ -Konzentration auf die K^+ -Konzentration im 4. Blatt der Sorte Pioneer 3906 nach neuntägiger Behandlung bei gleichem Wasserpotential (-0,51 MPa) des Wurzelmediums. *Grenzwert für ausreichende Versorgung der voll entwickelten Maisblätter mit K^+ (30 mg / g TS) nach Bergmann (1992)

In Abbildung 40 ist zu erkennen, dass die K^+ -Konzentration im vierten Blatt der PEG-Variante mit dem niedrigsten K^+ -Angebot in der Nährlösung (0,4 mM K^+), verglichen mit der NaCl-Variante, reduziert wurde. Trotzdem zeigte diese PEG-Variante zu jedem Zeitpunkt der Messung einen signifikant größeren Blattflächenparameter als die Salzvariante (s. Abb. 38). Die anderen PEG-Varianten wiesen im Vergleich zur 0,4 mM K^+ -Variante signifikant höhere K^+ -Konzentrationen auf, obwohl sie sich von dieser hinsichtlich des Blattflächenparameters nicht unterschieden. Ebenfalls ist deutlich zu sehen, dass die Pflanzen bei allen Varianten nach Bergmann (1992) ausreichend mit Kalium versorgt waren. Es konnte also in diesem Versuch kein K^+ -Mangel induziert werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass schon im frühen Stadium eines Salzstresses Na^+ auf das Streckungswachstum der Maispflanze toxisch wirkt.

3.2.5 Einfluss der Na⁺/K⁺-Interaktion auf die hydrolytische Aktivität und Pumpaktivität der Plasmalemma-H⁺-ATPase aus Maisblättern

3.2.5.1 Charakterisierung der isolierten Plasmalemma-Fraktion

Ziel des Versuches war es, die Aktivität des wichtigsten, für das Streckungswachstum verantwortlichen Enzymes, der H⁺-ATPase, unter dem Einfluss der Na⁺/K⁺-Interaktion zu messen. Dazu war es notwendig, eine höchst reine Plasmalemma-Membran zu isolieren. Der Reinheitsgrad der isolierten Plasmalemma-Fraktion informiert über die Kontamination mit anderen Membranen. Dieser konnte durch Zusatz verschiedener Inhibitoren für Membran-Markerenzyme bei der Messung der ATPase-Aktivität ermittelt werden. Abbildung 41 zeigt die ATPase-Aktivität in den Plasmalemma-Fraktionen bei Zusatz der, in Kapitel 2.3.4.1 angegebenen Inhibitoren, relativ zu einer Kontrolle, bei der kein Inhibitor zugesetzt wurde. Die ATPase-Aktivität der Kontrolle entspricht 100%. Zunächst wurde die im Plasmalemma lokalisierte H⁺-ATPase bei dem optimalen pH-Wert von 6,5 gemessen. Nitrat hemmt in erster Linie die Tonoplasten-ATPase und Azid die Mitochondrien-ATPase. Die Zugabe von 50 mM Nitrat zum Reaktionsmedium erhöhte die hydrolytische H⁺-ATPase-Aktivität im Mittel auf ca. 104% der Kontrollaktivität. Wurde 1 mM Azid zugegeben, veränderte sich die hydrolytische H⁺-ATPase-Aktivität mit durchschnittlich 102% kaum gegenüber der Kontrolle. Molybdat hemmt die saure Phosphatase. Bei Zusatz von 1 mM Molybdat zur Reaktionslösung sank die hydrolytische H⁺-ATPase-Aktivität im Mittel auf ca. 87% der Kontrollaktivität. Vanadat hemmt die Plasmalemma-spezifische H⁺-ATPase-Aktivität. Die Zugabe von 0,1 mM Vanadat in die Messlösung verursachte jeweils einen durchschnittlichen Abfall der H⁺-ATPase-Aktivität auf gut 8% der Kontrollaktivität.

Da das pH-Optimum der Tonoplasten- und Mitochondrienmembran-ATPasen bei ca. 8,0 liegt, wurden die Messungen mit den zugesetzten Inhibitoren Nitrat und Azid nochmals bei einem pH-Wert von 8,0

durchgeführt, um eine Verunreinigung mit dieser Vakuolenmembran mit größtmöglicher Sicherheit zu erkennen. Die bei pH 8,0 durch 1 mM Azid hemmbare ATPase-Aktivität war mit durchschnittlich 102% kaum gegenüber der Kontrolle verändert. Zugabe von 50 mM Nitrat bei pH 8,0 ließ in den Membran-Fractionen die Aktivität des Enzyms auf ca. 92% der Kontrollaktivität sinken.

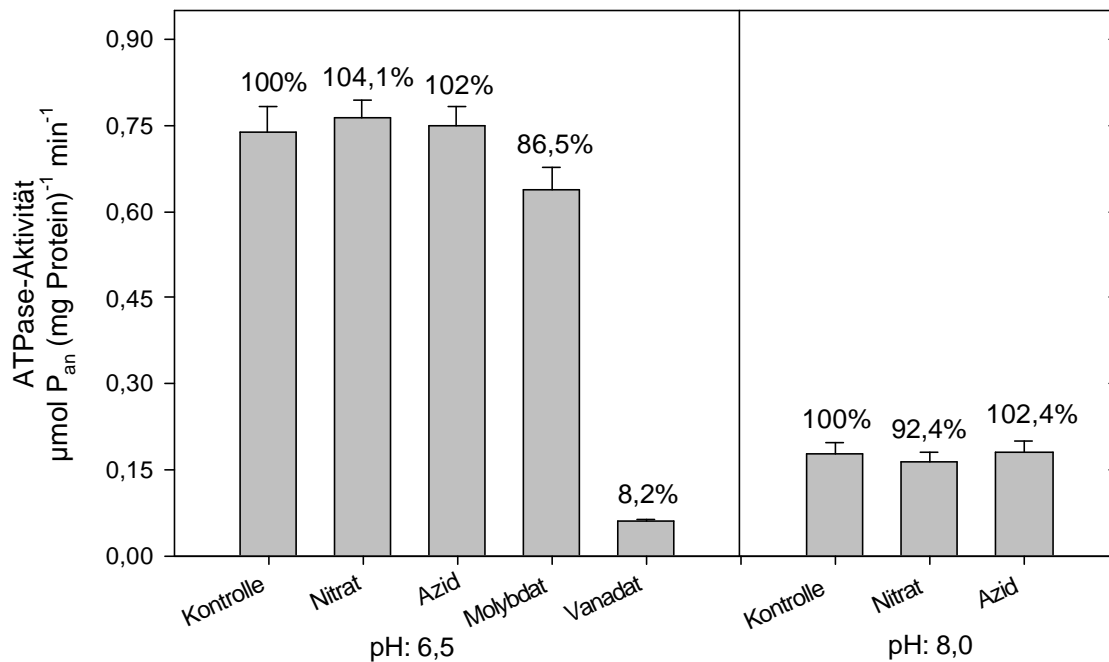


Abb. 41: ATPase-Aktivität der isolierten Membran-Fraktion unter Zusatz der angegebenen Inhibitoren (50 mM NaNO_3 ; 1 mM NaN_3 ; 1 mM Na_2MoO_4 ; 0,1 mM Na_3VO_4) relativ zu einer Kontrolle ohne Inhibitorzusatz. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von vier unabhängigen Membran-Isolierungen aus zweitägigen Maisblättern.

3.2.5.2 Einfluss der Na^+/K^+ -Interaktion auf die vanadatempfindliche Plasmalemma- H^+ -ATPase-Aktivität

Um den Einfluss der Na^+/K^+ -Interaktion auf die Plasmalemma-ATPase-Aktivität zu untersuchen, wurde in der Inhibitor-Komplexlösung (50 mM Nitrat, 1 mM Azid und 1 mM Molybdat) die Plasmalemma- H^+ -ATPase-Aktivität bei pH 6,5 mit und ohne Zusatz des ATPase-

spezifischen Inhibitors Vanadat gemessen. Aus der Differenz wurde die spezifische Plasmalemma-ATPase-Aktivität berechnet.

Abbildung 42 zeigt, dass die Plasmalemma-spezifische hydrolytische H^+ -ATPase-Aktivität mit steigender NaCl-Konzentration im Reaktionsmedium, mit Ausnahme der Aktivität bei 50 mM NaCl, sowohl bei 100 mM K^+ - als auch bei 50 mM K^+ -Konzentration gleichermaßen abfiel. Die 100 mM K^+ -Variante lag hier signifikant ($P = 1,0\%$) höher als die der 50 mM K^+ -Variante. Die H^+ -ATPase-Aktivität war bei den K^+ -Gaben im Reaktionsmedium kaum von Kalium abhängig. Bei höchster Salzkonzentration (100 mM NaCl) und bei ausreichend vorhandener K^+ -Konzentration sank die Plasmalemma-spezifische H^+ -ATPase-Aktivität in beiden Fällen gegenüber der Kontrolle (ohne NaCl) um maximal etwa 15%.

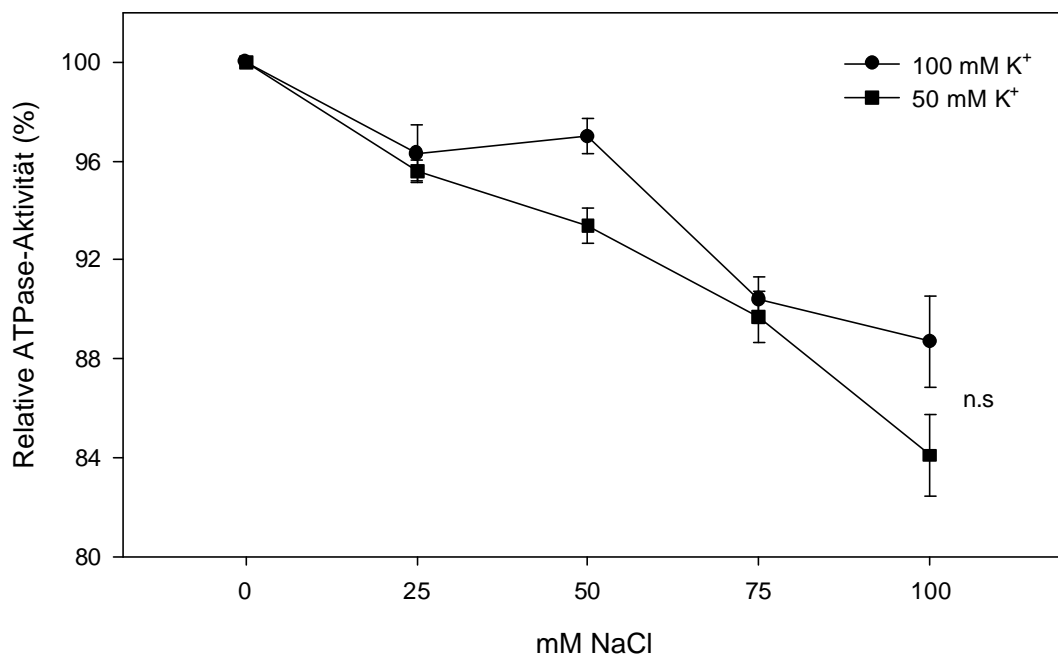


Abb. 42: Einfluss der Steigerung von NaCl im Reaktionsmedium auf die relative hydrolytische Aktivität der Plasmalemma- H^+ -ATPase von Membran-Isolierungen aus Maisblättern in Abhängigkeit von der K^+ -Konzentration im Reaktionsansatz (100 mM K^+ = 50 mM KNO_3 + 50 mM KCl; 50 mM K^+ = 50 mM KNO_3). 100% Aktivität entspricht bei 100 mM K^+ $0,676 \pm 0,04 \mu\text{mol } P_{\text{an}} (\text{mg Protein})^{-1} \text{ min}^{-1}$ und bei 50 mM K^+ $0,641 \pm 0,02 \mu\text{mol } P_{\text{an}} (\text{mg Protein})^{-1} \text{ min}^{-1}$. Diese ATPase-Aktivitäten ohne NaCl-Zugabe weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Die Werte stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von vier unabhängigen Membran-Isolierungen dar.

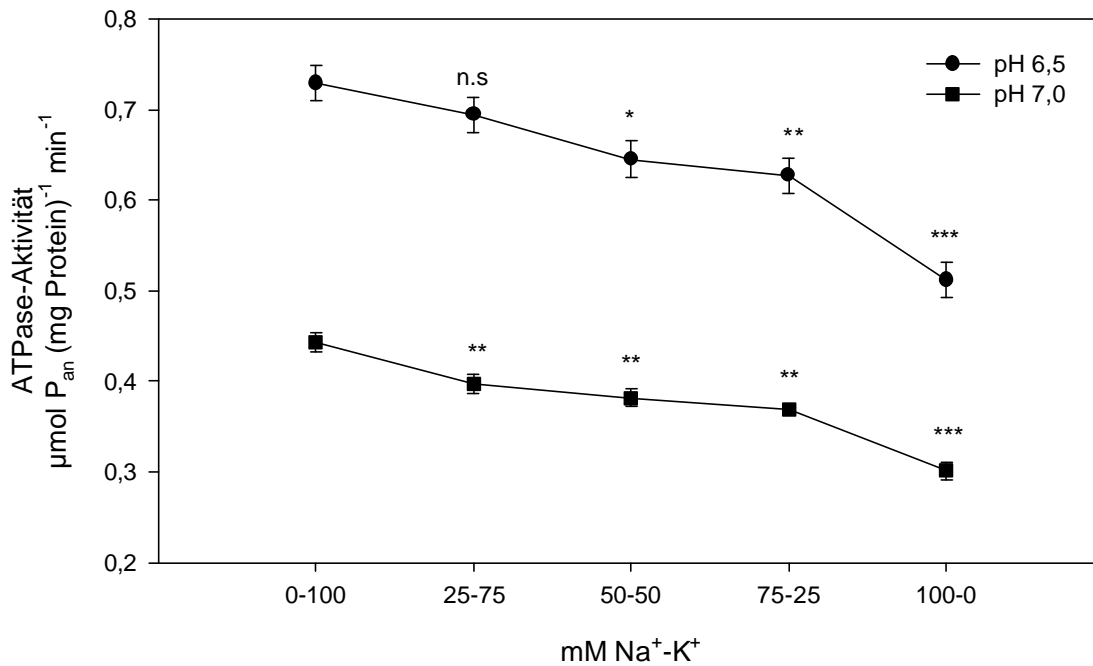


Abb. 43: Einfluss unterschiedlicher Na⁺-K⁺-Verhältnisse im Reaktionsmedium auf die Plasmalemma-H⁺-ATPase-Aktivität bei zwei pH-Werten im Reaktionsansatz. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler von vier unabhängigen Membran-Isolierungen dar.

In diesem Versuch war es wichtig, die Begleitaneionen in allen Versuchsansätzen konstant zu halten (50 mM Cl⁻ und 50 mM NO₃⁻). Deswegen wurden in den verschiedenen Versuchsansätzen sowohl die Salzmengen als auch die Salzformen im Reaktionsmedium wie unter Punkt 2.3.4.1 beschrieben variiert. In Abb. 43 ist zu sehen, dass mit zunehmender Na⁺- und abfallender K⁺-Konzentration die H⁺-ATPase-Aktivität sowohl im biochemisch optimalen (6,5) als auch im physiologisch relevanten pH-Bereich (7,0) parallel abfiel. Erst bei Zugabe von 50 mM Na⁺ und 50 mM K⁺ in das Reaktionsmedium (pH 6,5) ging die H⁺-ATPase-Aktivität gegenüber der Kontrolle (0 Na⁺, 100 mM K⁺) signifikant zurück. Bei vollständigem Ersatz von K⁺ durch 100 mM Na⁺ war die H⁺-ATPase-Aktivität hoch signifikant (P=0,1%) um etwa 30% reduziert.

3.2.5.3 Einfluss der Na⁺/K⁺-Interaktion auf die Protonenpump-Aktivität der Plasmalemma-ATPase

Neben der hydrolytischen Aktivität wurde auch die H⁺-Transporteigenschaft der im Plasmalemma lokalisierten H⁺-ATPase untersucht. Dazu wurden die isolierten *inside out*-Vesikel, wie in Kapitel 2.3.4.2 beschrieben, in ein Reaktionsmedium (pH 6,5) gegeben. Das katalytische Zentrum der H⁺-ATPase war bei diesen Vesikeln dem Medium zugewandt. Durch Zugabe von Mg-ATP wurde die Plasmalemma-H⁺-ATPase aktiviert. Die *inside out*-Vesikel waren in der Lage, mit Hilfe der H⁺-ATPase einen pH-Gradienten (ΔpH , innen sauer) aufzubauen, der als Quench der Acridin Orange (AO)-Absorption messbar war. Dieser wurde nach 50 Minuten durch Gramacidin vollständig kollabiert. Zu diesem Zeitpunkt betrug der Netto H⁺-Transport über das Plasmalemma null. Dieser Parameter lässt auf den größten pH-Gradienten schließen, der durch die Pumpaktivität gebildet werden kann (Yan et al., 1998). Es wurden zwei Parameter für die Charakterisierung der H⁺-Pumpe herangezogen: a) Die Pumpaktivität der H⁺-ATPase (Initial Rate), b) die Pumpleistung der H⁺-ATPase (maximaler pH-Gradient).

Tab. 6: Einfluss von 200 mM KCl und 100 mM NaCl + 100 mM KCl im Reaktionsmedium auf den H⁺-Transport an Plasmalemmavesikeln der Maisblätter. Der pH-Gradient wurde mittels AO-Absorption bei 492 nm und 25 °C gemessen. Initial Rate wurde aus der ersten Minute der Reaktion berechnet. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von vier unabhängigen Membran-Isolierungen.

Variante	Initial Rate ($A_{492} \text{ min}^{-1}$) Pumpaktivität	pH-Gradient (ΔA_{492} von AO)
200 mM K ⁺	0,015 \pm 0,002	0,046 \pm 0,001
100 mM Na ⁺ + 100 mM K ⁺	0,013 \pm 0,001	0,052 \pm 0,003

Da der H^+ -Transport der H^+ -ATPase sehr stark von den Anionenarten abhängig ist, wurden bei den Pumpaktivitätsmessungen Konzentration und Form der Anionen im Reaktionsmedium konstant gehalten (200 mM Cl^-). In Tabelle 6 ist zu sehen, dass bei ausreichend vorhandener K^+ -Konzentration im Reaktionsmedium die Beladung der Vesikel mit 100 mM Na^+ kaum einen negativen Einfluss auf die H^+ -Pumpaktivität (Initial Rate) und den maximal aufgebauten pH-Gradient (ΔpH) hatte. Bei den verschiedenen Versuchsansätzen wurden, wie unter 2.3.4.1 beschrieben, sowohl die Salzmengen als auch die Salzformen im Reaktionsmedium in der Weise variiert, dass die Anionen (50 mM Cl^- und 50 mM NO_3^-) konstant blieben. Abb. 44 zeigt, dass die Pumpaktivität (IR) und der maximal aufbaubare pH-Gradient durch zunehmende Na^+ - und abfallende K^+ -Konzentration stark beeinflusst war.

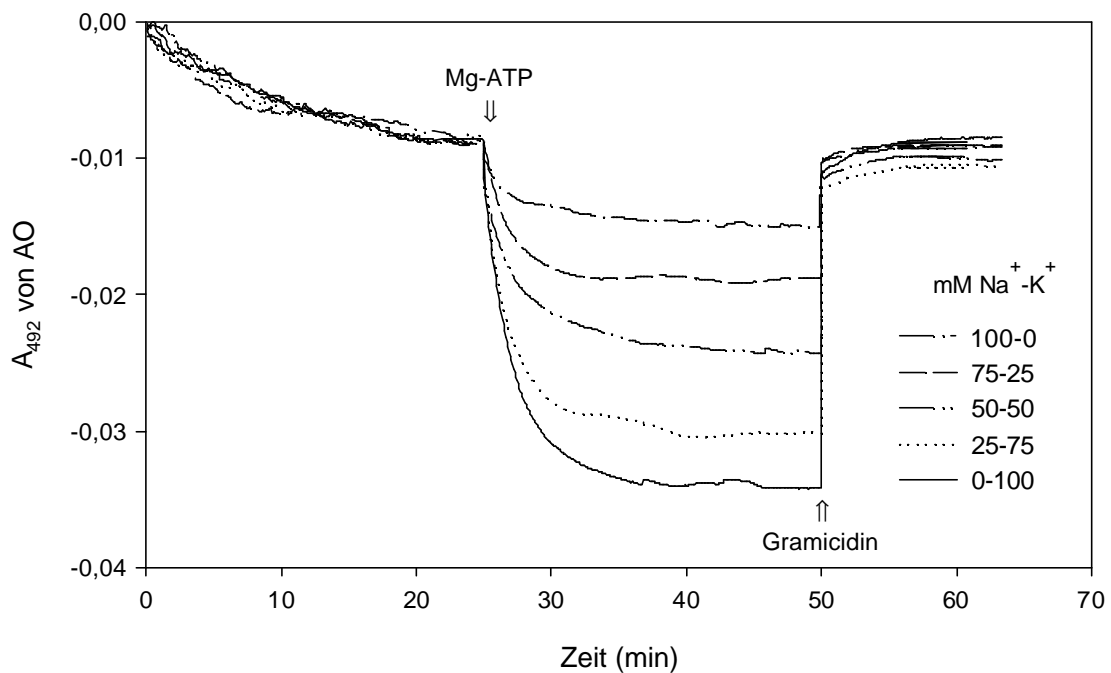


Abb. 44: Einfluss der unterschiedlichen Na^+ - K^+ -Verhältnisse im Reaktionsmedium auf den H^+ -Transport an Plasmalemmvesikeln aus Maisblättern. Der Aufbau eines pH-Gradienten über die Vesikelmembranen wurde als Absorptionsänderung der Base Acridin Orange (AO) bei 492 nm und 25°C gemessen. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis aus vier unabhängigen Messungen.

Die hydrolytische Aktivität der H⁺-ATPase und die H⁺-Transporteigenschaft der Plasmalemma-H⁺-ATPase ist in Abbildung 45 zusammengefasst worden. Deutlich ist zu erkennen, dass alle gemessenen Parameter erst ab 50 mM Na⁺ und 50 mM K⁺ gegenüber der Kontrolle (0 Na⁺, 100 mM K⁺) signifikant abnehmen. Auffällig ist, dass ab diesen Konzentrationen (50-50) der H⁺-Transport noch stärker gehemmt wurde als die hydrolytische Aktivität. Bei vollständigem Ersatz von K⁺ durch 100 mM Na⁺ im Reaktionsmedium ging die H⁺-ATPase-Aktivität gegenüber der Kontrolle (100 mM K⁺) um etwa 30% zurück, während der H⁺-Transport um etwa 80% zurückging.

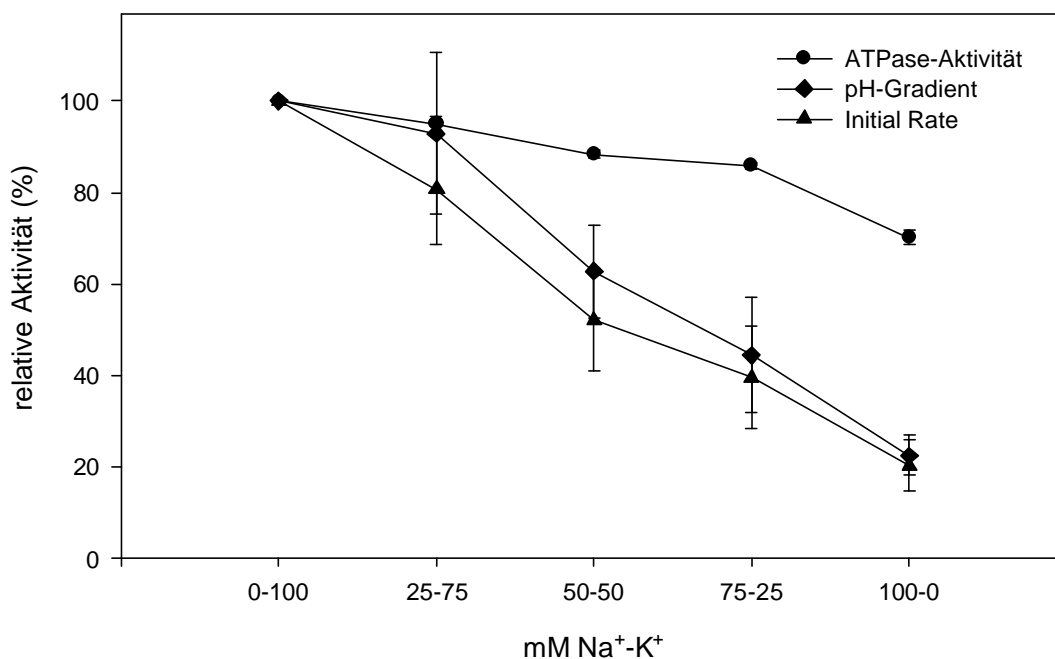


Abb.45: Einfluss der unterschiedlichen Na⁺-K⁺-Verhältnisse im Reaktionsmedium auf die relative H⁺-ATPase-Aktivität und den relativen H⁺-Transport an Plasmalemmavesikeln von Maisblättern. 100% entsprechen der Aktivität ohne NaCl-Zugabe. Die Werte stellen Mittelwerte ± Standardfehler von vier unabhängigen Membran-Isolierungen dar.

4. Diskussion

4.1 Entwicklung einer Inzuchtlinie mit großem Na⁺-Exklusionsvermögen

Die Wirkung von Salzstress auf die Ertragsbildung ist wegen der polygenen Vererbung (Fooland, 1996; Serrano und Gaxiola, 1994) extrem vielfältig und kann nicht monokausal erklärt werden. Eine eingehende Auseinandersetzung mit den physiologischen Mechanismen und Anpassungsreaktionen könnte einen deutlichen Fortschritt in der Züchtung salzresistenter Kulturpflanzen hervorbringen (Hale und Orcutt, 1987; Waisel, 1989; Schubert, 1999; Mengel und Kirkby, 2001). Auch Flowers et al. (1995, 2000) postulieren, dass die Salzresistenzmerkmale von Reis am besten durch die jeweilige Selektion nach den einzelnen physiologischen Merkmalskomponenten erreicht werden kann, welche dann in einem Züchtungsprogramm "pyramidisiert" werden sollen.

Schubert und Läuchli (1990) berichten über zwei Na⁺-Exklusionsmechanismen bei Mais. Die Sorte Pioneer 3906 besitzt beide Mechanismen effektiv, wobei der eine an der Wurzeloberfläche und der andere am Xylemparenchym liegt. Diese Strategien beschreiben das Heraushalten des Natriums einerseits aus der Pflanze, d.h. an der Wurzeloberfläche, und andererseits aus den Blättern, indem das Natrium im Xylemparenchym der Wurzel zurückgehalten wird.

Ist die Na⁺-Exklusion ein Teil des Gesamtmerkmals Salzresistenz, so sollte bei der vorhandenen genetischen Variabilität in der Intensität der Na⁺-Exklusion auf dieses Teilmerkmal selektiert werden. Jedoch war die Bedeutung der Na⁺-Exklusion für die Salzresistenz von Mais lange Zeit umstritten (Schubert, 1990). Lessanie und Marschner (1978), Alberico und Cramer (1993) und Cramer et al. (1994) konnten keine Abhängigkeit zwischen der Na⁺-Exklusion und der Salzresistenz feststellen. Auch Schubert und Läuchli (1986) zeigten, dass bei den Maissorten Pioneer 3906 (hohes Na⁺-Exklusionsvermögen) und DeKalb

XL 75 (schwaches Na⁺-Exklusionsvermögen) keine Unterschiede in der Reduktion der Sprossfrischmasse gegenüber der Kontrolle nach achttägiger Behandlung mit 50 bzw. 100 mM NaCl auftraten, obwohl die Sorte DeKalb XL 75 die doppelte Na⁺-Konzentration im Spross wie die Sorte Pioneer 3906 aufwies. Die oben erwähnten Untersuchungen wurden über relativ kurze Zeiträume bei geringen NaCl-Konzentrationen durchgeführt. Eine Rolle der Na⁺-Exklusion für die Salzresistenz konnte daher nicht nachgewiesen werden.

Erst die Formulierung des Zweiphasenmodells von Munns (1993) (Abb. 1) ermöglichte einen wesentlichen Durchbruch. Nach diesem Modell sind bei Salzbehandlungen einer Kulturpflanze zunächst im Wesentlichen osmotische Effekte für eine Verminderung des Wachstums verantwortlich. Unterschiedlich salzresistente Genotypen reagieren in dieser, eine bis zu mehreren Wochen dauernden Zeit, mit der gleichen prozentualen Wachstumsreduktion, und erst nach dieser ersten Phase unterscheiden sich einzelne Genotypen aufgrund der unterschiedlich stark auftretenden Ionentoxizität in ihrer Salzresistenz. Da Hajibagheri et al. (1987), die 26 Maissorten unter dem Einfluss von 200 mM NaCl über 30 Tage getestet haben, konnten einen Zusammenhang zwischen der Na⁺-Exklusion aus dem Spross und der Salzresistenz bei Mais finden. Bei der ersten aufgespalteten Selbstungsgeneration der Hybridsorte Pioneer 3906 konnte auch Schierholt (1995) unter 14-tägiger Behandlung mit 150 mM NaCl eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Intensität der Natriumexklusion und der Sprossfrischmasse feststellen.

Generell schädigt Salinität das Pflanzenwachstum durch verschiedene Effekte wie osmotischer Stress, Ionentoxizität und Ionenungleichgewicht (Läuchli, 1986; Serrano, 1996). Das Gesamtmerkmal Salzresistenz setzt sich also aus vielen Teilmerkmalen zusammen. Wichtig ist es zu wissen, wie groß der Anteil eines bestimmten Teilmerkmals am Gesamtmerkmal ist, um so die Einzelmerkmale untereinander gewichten zu können. Na⁺-Exklusion ist eine wertvolle Eigenschaft für die Salzresistenz der Pflanze, die auf

zellulärer Ebene zu einer Senkung der cytosolischen Na^+ -Konzentration führt, sowie auf der Ebene der ganzen Pflanze, indem die Aufnahme und die Verlagerung von Na^+ -Ionen in die Blätter verhindert wird (Läuchli, 1984; Schubert, 1990; Mathhuis und Amtmann, 1999; Munns, 2002).

Aufbauend auf den Kenntnissen der Na^+ -Exklusion und ihrer Bedeutung für die Salzresistenz von Mais sollte eine Inzuchtlinie entwickelt werden, die nicht nur beide Na^+ -Exklusionsstrategien in sich vereinigt, sondern möglichst noch bessere Exklusionseigenschaften aufweist als "Pioneer 3906". Es sollte also in dieser Arbeit ein Screening auf Basis der Na^+ -Exklusion vorgenommen werden. Eine Selektion auf Salzresistenz ist nach dem Munnsschen Modell nur in Langzeitversuchen möglich, da sonst die Toleranz für niedrige Wasserpotentiale getestet wird. Die Individuen sollten deswegen in der zweiten Phase des Salzstresses mit der höchsten Intensität der Na^+ -Exklusion selektiert und durch Selbsten weitergeführt werden. Dazu kam für eine Selektion nur ein nicht destruktiver Parameter in Frage.

Hybriden aus der Kreuzung zweier reinerbiger (homozygoter) Pflanzen, die sich in einem Merkmal unterscheiden, sind uniform, so dass in dieser Generation aufgrund der phänotypischen Homogenität keine Selektion möglich ist. Nach dem Mendelschen Spaltungsgesetz findet erst in der F_2 -Generation eine Aufspaltung der Merkmale statt, so dass frühestens in der F_2 -Generation mit der Selektion begonnen werden kann (Ordon und Friedt, 1998). Zu diesem Zweck wurde von Schierholt (1995) die Hybridsorte "Pioneer 3906" geselbstet und das F_2 -Material hinsichtlich der beiden Exklusionsstrategien überprüft. Erwartungsgemäß ergab sich bei beiden Merkmalen eine starke Aufspaltung in der F_2 -Generation, wobei besonders Typen mit wesentlich schlechteren Exklusionseigenschaften gefunden wurden. Während keine Nachkommen mit verbesserter Na^+ -Exklusion an der Wurzeloberfläche auftraten, wurden F_2 -Individuen mit verbesserter Na^+ -Exklusion aus dem Spross identifiziert (Schierholt, 1995).

An der Universität Hohenheim wurden die Individuen nach ihrem Na^+ -Exklusionsvermögen bis zur vierten Inzuchtgeneration geselbstet und gescreent (Schubert, 1999). In dieser Arbeit wurden die Selektionen und Selbstungen ab dieser Generation mit dem gleichen Verfahren von Schierholt (1995) in Nährlösung weitergeführt. Nährlösungen wurden schon für das Screening auf Salzresistenz bei Mais (Ashraf et al., 1990) und Reis (Yeo und Flowers, 1986) verwendet. In Nährlösungen können Salzkonzentration und Belüftung gut kontrolliert werden. Durch diese kontrollierten Umweltbedingungen können genetische Effekte von zufälligen umweltbedingten Effekten unterschieden werden, d.h. der Selektionserfolg hängt von der Minimierung umweltbedingter Variation und der Maximierung der genetischen Variation ab (Shannon, 1997; Subbarao und Johansen, 1994). Die Individuen wurden in einer hohen NaCl -Konzentration (150 mM NaCl) für sieben Tage behandelt, wobei in den ersten sieben Tagen die NaCl -Konzentration bis zu dieser Endkonzentration sukzessiv gesteigert wurde, um einen osmotischen Schock zu vermeiden. Setzt man die Pflanzen in einem Schritt in eine Lösung mit hoher NaCl -Konzentration, könnte dies zu einem Austritt von Wasser aus den Wurzeln oder zu einem ungehinderten Eintritt von NaCl in die Wurzelzellen führen (Munns, 2002). Damit die beiden Exklusionsmechanismen sich nicht gegenseitig beeinflussten und die Beendigung der ersten Phase schneller stattfand, wurde die Selektion bei hoher Na^+ -Konzentration (150 mM) durchgeführt. Bei einer hohen Konzentration findet das Füllen des Xylemparenchyms der Wurzel schneller statt, so dass die Pflanzen schneller in die Ionentoxizitätsphase (2. Phase) eintreten. Schubert (1990) konnte bei den Elternlinien der Hybride Pioneer 3906 die Mechanismen klar voneinander trennen, weil die Dauer der Salzbehandlung wesentlich kürzer und die Na^+ -Konzentration in der Nährlösung viel niedriger war. Anscheinend wurde in diesem Ansatz von Schubert das Füllen des Xylemparenchyms der Wurzel noch nicht abgeschlossen. Nach 14-tägiger Salzbehandlung wurde die Na^+ -Konzentration des dritten Blattes als Selektionsparameter für Na^+ -Exklusion genommen.

Die Na^+ -Konzentration im dritten Blatt stellte sich nach Schierholt (1995) als ein geeignetes Selektionskriterium für die beiden Na^+ -Exklusionsstrategien heraus. Die Na^+ -Konzentration im dritten Blatt spiegelte mit der engsten Korrelation die Intensität der Na^+ -Exklusion wider. Auch Blum (1988) postulierte, dass die Blattanalyse auf die spezifischen Ionen ein wichtiges Hilfsmittel für die Selektion auf die Salzexklusion ist. Die Na^+ -Konzentration im 3. Blatt wurde auch schon von Hajibagheri (1987) bei Mais, von Yeo und Flowers (1983) bei Reis und von Schachtman und Munns (1992) bei verschiedenen *Triticum*-spezies als Parameter für die Na^+ -Aufnahme und Salzresistenz verwendet. Das dritte Blatt eignete sich auch insofern als Selektionsparameter, als es nach 14-tägiger Salzbehandlung voll entwickelt war, gleichzeitig aber der Pflanze mit den nachwachsenden jüngeren Blättern ausreichend Assimilationsfläche zum Überleben blieb. Wegen der Multigenität der Salzresistenz ist die Na^+ -Exklusion ein Teil des Gesamtmerkmals Salzresistenz. Deswegen wurde zusätzlich zu dem Parameter Na^+ -Konzentration auch der Habitus mitbeurteilt. Trotz gleich hoher Na^+ -Konzentration im Blatt können die Individuen unterschiedlich resistent sein (Yeo und Flowers, 1983), weil die Zellen in besser exkludierenden Individuen die Ionen effektiver kompartimentieren können. Würde man die Individuen nur auf Ionenkonzentration selektieren, würde man annehmen, dass die Resistenz nur auf unterschiedlich großer Salzakkumulation beruht und nicht auch auf Unterschieden in der Kompartimentierung der Salze (Munns, 1993). Die an den Interkostalfeldern und an den Blattspitzen teilweise entstandenen Nekrosen, die bei der Selektion mitberücksichtigt wurden (Abb. 12), zeigten, dass die Selektion in der zweiten Phase des Salzstresses erfolgte.

Bei den Inzuchtgenerationen verringerte sich die Na^+ -Konzentration im dritten Blatt im Vergleich zur Hybride "Pioneer 3906" bis um das Vierfache (Abb. 11). Dies könnte auf eine verbesserte Na^+ -Exklusion zurückzuführen sein. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass die Na^+ -Konzentration im Spross abhängig von dem Wachstum der Pflanze ist. Bei den Hybrid-Pflanzen trat das 3. Blatt

früher auf als bei den Inzuchtpflanzen, d.h. diese Blätter waren längere Zeit mit den hohen Na^+ -Konzentrationen in der Nährlösung ausgesetzt, was zu höheren Na^+ -Konzentration im dritten Blatt führen könnte. Andererseits waren die Hybridpflanzen deutlich größer, was zu einer Verdünnung der Na^+ -Konzentration im 3. Blatt führte.

Im Laufe der Inzucht verbesserte sich auch die Intensität der Na^+ -Exklusion und es konnte in Bezug auf dieses Merkmal eine verbesserte Homogenität beobachtet werden, was anhand der verringerten Streuung hinsichtlich der Na^+ -Konzentrationswerte in der Abbildung 11 erklärt werden kann. Nach Ordon und Friedt (1998) wird die Homogenität erst ungefähr in F_6 - F_7 -Nachkommen erreicht. Die in dieser Arbeit erstellte sechste Inzuchtgeneration weist aufgrund der erwähnten verbesserten Na^+ -Exklusionseigenschaften eine genetische Homogenität auf. Es wurde eine homogene und weitgehend homozygote Linie erstellt, in der die beiden Exklusionsstrategien vereinigt sind.

Nachdem durch wiederholte Selbstungen und Selektionen eine homozygote Linie vorlag, sollte diese Inzuchtgeneration sowohl in Nährlösungs- als auch in Bodenversuchen auf ihr Na^+ -Exklusionsvermögen überprüft werden (Kap. 3.1.4 und 3.1.5). Bei der Selektion wurde nicht die gesamte Pflanze, sondern nur das dritte Blatt berücksichtigt, weil es in diesem Fall wichtig war, einen nicht destruktiven Parameter anzuwenden, da die Pflanzen durch Selbsten noch weitergeführt werden sollten. Das Exklusionsvermögen der letzten Inzuchtgeneration sollte mit dem der Elterngeneration und einer salzempfindlichen Sorte verglichen werden. Bei diesem Vergleich der verschiedenen Genotypen wurde die Na^+ -Aufnahme sowohl in der Wurzel als auch im Gesamtspross berücksichtigt. Um den Verdünnungseffekt aufgrund der unterschiedlichen Wüchsigkeit der verschiedenen Genotypen auszuschließen, wurden für die Berechnung der Intensität der Na^+ -Exklusion die folgenden Formeln von Schubert (1990) verwendet. Bezieht man die gesamte, von der Pflanze (Spross + Wurzel) während des Versuchszeitraumes aufgenommene Menge an

Natrium auf die Wurzelmasse (mg Na^+ Gesamtpflanze / g Wurzel-TM), so erhält man ein Maß für die Na^+ -Exklusion an der Wurzeloberfläche. Dadurch wird das Zurückhalten des Natriums an der Wurzeloberfläche, bzw. die über die Wurzeloberfläche erfolgte Aufnahme präzise quantifiziert. Die Na^+ -Menge in der Sprossmasse, bezogen auf die Na^+ -Menge in der Wurzelmasse, ist dagegen ein Hinweis auf die Na^+ -Exklusion am Xylemparenchym. Dieser Parameter zeigt an, wieviel Natrium tatsächlich im Xylemparenchym der Wurzel zurückgehalten wird und welche Menge des aufgenommenen Natriums in den Spross gelangt.

Bei Inzuchtlinien wird generell eine mehr oder weniger ausgeprägte Inzuchtdepression beobachtet (Ordon und Friedt, 1998). Aus diesem Grund war auch das Wachstum der Inzuchtpflanzen im Vergleich zu der Hybride Pioneer 3906 sehr stark reduziert (Abb. 19). In Nährlösung zeigte die sechste Inzuchtgeneration im Vergleich zu der Na^+ -ausschließenden Hybride Pioneer 3906 eine noch effizientere Na^+ -Exklusion, sowohl an der Wurzeloberfläche als auch am Xylemparenchym (Abb. 14). In Bodenversuchen wies die salzempfindliche Sorte Across 8023 trotz größerer Streuung in allen Salzstufen gegenüber der Sorte Pioneer 3906 und deren siebenter Inzuchtgeneration ein schlechteres Na^+ -Exklusionsvermögen auf (Abb. 21). Die größere Variabilität der Sorte Across 8023 hängt damit zusammen, weil dies eine Populationssorte ist. In einem Vergleich der Na^+ -Aufnahme in den Spross zwischen den beiden Maissorten Pioneer 3906 und Across 8023 wurde das hohe Na^+ -Exklusionsvermögen der Sorte Pioneer 3906 gegenüber der Sorte Across 8023 schon in mehreren Literaturangaben bestätigt (Maas et al., 1983; Schubert und Lächli, 1986; Fortmeier, 1995). Bei geringeren Salzstufen im Boden war die Na^+ -Exklusion an der Wurzeloberfläche der siebenten Inzuchtgeneration ebenso gut wie die ihrer Elternlinie. In höheren Salzstufen (8 dS m^{-1}) war die Na^+ -Exklusion sogar noch besser als bei der Hybride (Abb. 21a). Dabei muss berücksichtigt werden, dass bei der Berechnung der Na^+ -Exklusion an der Wurzeloberfläche die Na^+ -Nettoaufnahme auf die Wurzelmasse bezogen wird. Trotz der kleineren

Wurzelmasse der Inzuchtlinie konnte ein gleich gutes oder besseres Exklusionsvermögen als für die Elternlinie festgestellt werden. Bezüglich der Intensität der Na⁺-Exklusion am Xylemparenchym war die siebente Inzuchtgeneration bei allen Salzstufen ebenso gut wie die Sorte Pioneer 3906 (Abb.21b). Wird dagegen die Na⁺-Nettoaufnahme in der Gesamtpflanze nicht auf die Wurzelmasse bezogen, um die oben erwähnte Benachteiligung zu minimieren, so ist in Abbildung 20 deutlich zu sehen, dass die Inzuchtlinie in jeder Salzstufe eine geringere Na⁺-Nettoaufnahme aufweist als die Sorte Pioneer 3906. Die Na⁺-Nettoaufnahmen aller Genotypen stiegen bis zu der Salzstufe von 6 dS m⁻¹ kontinuierlich an. Ab dieser Salzkonzentration gibt es eine Sättigung der Na⁺-Nettoaufnahme. Mais, der als salzempfindliche Kulturpflanze eingestuft wird (Maas, 1984), zeigt eine hohe Salzresistenz bis zu ca. 15 dS m⁻¹ des Bodensättigungsextraktes während der Stadien der Keimung, des Rispschiebens und der Kornfüllung. Ganz im Gegensatz dazu reagieren junge Maispflanzen im vegetativen Stadium bereits schon ab etwa 2 – 3 dS m⁻¹ Salzkonzentration mit deutlicher Reduktion des Sprosswachstums (Maas und Grattan, 1999). Es wurde also in dieser Versuchsreihe, die in der vegetativen Wachstumsphase durchgeführt wurde, mit einer recht hohen NaCl-Salinität gearbeitet. Dennoch konnte bei der Inzuchtlinie eine wesentlich effizientere Na⁺-Exklusion festgestellt werden. Da die durch wiederholte Selbstungen und Selektionen erstellte Maisinzuchtlinie sowohl in Nährlösung als auch im Bodenversuch geringere Na⁺-Aufnahmewerte aufwies als die Hybride Pioneer 3906, ist die Schlussfolgerung berechtigt, dass die Inzuchtgeneration gegenüber dem Ausgangsmaterial ein wesentlich verbessertes Na⁺-Exklusionsvermögen aufweist.

Das Gesamtmerkmal Salzresistenz setzt sich aus vielen Teilmerkmalen zusammen. Natriumexklusion ist nur ein Teil des Gesamtmerkmals Salzresistenz. Die osmotische Anpassung ist in dieser Hinsicht auch ein bedeutsamer Bestandteil. In Bodenversuchen mit hohen Salzkonzentrationen, vor allem bei 8 dS m⁻¹, wurden bei der Hybride Pioneer 3906 und insbesondere bei der stark Na⁺-

ausschließenden siebenten Inzuchtgeneration in der vegetativen Phase osmotische Probleme beobachtet. Bei der schwach Na⁺-ausschließenden Sorte Across 8023 traten diese Symptome jedoch nicht auf. In Nährlösungsversuchen konnten dagegen bei den stark Na⁺-ausschließenden Genotypen keine Welkeerscheinungen beobachtet werden. Einerseits waren die Durchschnittstemperaturen während des Versuchszeitraumes nicht so hoch wie bei den Bodenversuchen, was zu keinen Welkeerscheinungen geführt haben könnte. Andererseits könnte die geringere Verfügbarkeit an freiem Wasser in salzhaltigen Böden (Marschner, 1995; Mengel und Kirkby, 2001) im Vergleich zu salzhaltigen Wasserkulturen auch ein Grund dafür sein. Obwohl die verschiedenen Genotypen in Wasserkultur unter NaCl-Bedingungen keine Welkeerscheinungen zeigten, waren die schwach Na⁺-ausschließenden bzw. dürretoleranten Genotypen im Vergleich zu den stark Na⁺-ausschließenden Genotypen osmotisch besser angepasst (Abb. 15). Als generelle Regel gilt, dass Halophyten große Mengen von Natrium im Spross akkumulieren, wobei es in den Vakuolen für die osmotische Adaptation genutzt wird (Inkluder) und die Wasseraufnahme erleichtert (Flowers und Läuchli, 1983; Flowers und Yeo, 1988; Koyro, 1997; Short und Colmer, 1999). Viele Gräser sind demgegenüber Salzausschließer (Na⁺-Exkluder), die sich damit vor Ionentoxizität schützen. Die Exkluder müssen also die osmotisch wirksamen organischen Verbindungen "compatible solutes" wie z.B. Prolin, Betain, Glycinbetain oder Zucker unter Energieaufwand synthetisieren oder anorganische Elemente wie z.B. K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ oder NO₃⁻ akkumulieren, um den Zellturgor aufrechtzuerhalten (Marschner, 1995; Chen et al., 1998; Hu und Schmidhalter, 1998; Glenn et al., 1999). Einige salzresistente Glycophyten (z.B. Gerste) kompartimentieren Na⁺ in der Vakuole, um Salzstress zu vermeiden (Schachtmann und Munns, 1992; Ashraf, 1994; Jacoby, 1994). Zum einen wird dadurch eine geringe Na⁺-Konzentration im Cytoplasma aufrechterhalten, zum anderen führt dies zu einem osmotischen Ausgleich, da Na⁺ als Osmotikum wirkt (Greenway und Munns, 1980; Serrano, 1996; Blumwald et al., 2000; Zhu, 2001). Da *Zea mays* eine C-4 Pflanze ist

und dadurch reichlich Assimilate synthetisiert, müssten diese "compatible solutes" für die osmotische Anpassung sorgen. Die osmotisch wirksamen anorganischen Elemente wie z.B. K^+ und Cl^- waren bei den stark Na^+ -ausschließenden Genotypen im Vergleich zu den schwach Na^+ -ausschließenden Genotypen nicht wesentlich verändert (Abb. 16, 22, 23). Die osmotischen Probleme bei den Na^+ -exkludierenden Genotypen kamen also durch die effiziente Exklusion zustande. Die Pflanzen haben dadurch mehr Na^+ ausgeschlossen (Abb. 14, 21) und konnten das Ion nicht als Osmotikum nutzen. Aus diesem Grund waren die Na^+ -ausschließenden Genotypen gegenüber osmotischem Stress empfindlicher. Durch die osmotischen Probleme, mit steigender NaCl-Konzentration im Boden, war deshalb die Wuchshöhe der Inzuchtpflanzen im Vergleich zu den Pflanzen der schwach Na^+ -ausschließenden zum Teil stärker beeinträchtigt (Abb. 18).

In den vorliegenden Experimenten war die effizientere Na^+ -Exklusion, wegen der oben diskutierten Gründe, nicht direkt mit einer größeren Salzresistenz verbunden. Eine Kreuzung mit einer gegenüber osmotischem Stress toleranten Linie könnte eine wesentliche Basis für die Entwicklung einer salzresistenten Hybridsorte sein.

4.2 Führt Na⁺-Exklusion zu Nährstoffmangel?

In den vorliegenden Untersuchungen konnten unter Salinitätsbedingungen bei der stark Na⁺-ausschließenden Sorte Pioneer 3906 nach einigen Tagen, ähnlich wie von Kawasaki et al. (1979) beschriebenen, Ca²⁺-Mangelsymptome an den jüngsten Blättern beobachtet werden. Diese Blätter konnten sich nicht entfalten und an der Spitze des Blattes traten Absterbeerscheinungen auf. Nach einiger Zeit verschwanden diese Symptome jedoch wieder. Bei der schwach Na⁺-ausschließenden Sorte Across 8023 konnten diese Symptome dagegen nicht beobachtet werden. Identische Probleme bei der Sorte Pioneer 3906 wurden auch von Schubert (1990), Benzinger (1994) und Fortmeier (1996) beobachtet.

Der Ca²⁺-Transport in der Pflanze verläuft, angetrieben durch den Transpirationssog oder den Wurzeldruck durch die Xylemgefäße, wobei wenig transpirierende Organe vor allem auf den Wurzeldruck angewiesen sind (Mengel, 1991). Allerdings wird unter salinen Bedingungen der Wurzeldruck gehemmt, so dass der Ca²⁺-Einstrom in die jungen Blätter vermindert wird (Läuchli, 1990; Fortmeier, 1995; Hu und Schmidhalter, 1997). In der Pflanze befindet sich der Hauptteil des Calciums im Apoplast: in den Zellwänden sowie an den Außenseiten des Plasmalemmas (Hanson, 1984; Peterson und Enstone, 1996; Marin et al., 1998). Durch mangelnde Versorgung des Blattes mit Ca²⁺ werden die Zellen unvollkommen ausgebildet und es kommt dadurch zu den erwähnten Mangelsymptomen.

Fraglich war, warum Ca²⁺-Mangelsymptome nur bei der Na⁺-ausschließenden Sorte Pioneer 3906 auftraten. Diese Sorte hat zwar im Vergleich zu den schwach Na⁺-ausschließenden Genotypen, sowohl unter Kontroll- als auch unter NaCl-Bedingungen, gleich oder mehr Ca²⁺ in die Wurzeln aufgenommen, konnte es aber nicht so effektiv in die jüngsten Blättern verlagern (Abb. 17). In einem Vergleich zwischen den Sorten Pioneer 3906 und Across 8023, in Bezug auf die Ca²⁺-Aufnahme der Wurzeln und der Ca²⁺-Verlagerung in die jüngsten

Blätter, kamen auch Benzinger (1994) und Fortmeier (1995) zu den gleichen Ergebnissen. Die angeführten Beobachtungen lassen vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen der Intensität des Na⁺-Exklusionsvermögens und dem mangelnden Ca²⁺-Transport in die jungen Sprosssteile besteht.

Für die Ca²⁺-Mangelsymptome bei der Na⁺-exkludierenden Hybride Pioneer 3906 wurden in dieser Arbeit zwei Hypothesen aufgestellt. Nach der ersten Hypothese spielt die Na⁺-Exklusion an der Wurzeloberfläche eine Rolle. Dafür spricht, dass die Zellen an der Wurzelspitze sehr dicht gepackt sind und sich dadurch die Bindungsstellen für Ca²⁺ erhöhen (Mengel, 1991). Außerdem können die dichtgepackten Zellen an der Wurzelspitze den Diffusionswiderstand erhöhen. Beides führt dazu, dass Ca²⁺ apoplastisch nicht ausreichend in die Xylemgefäße weitergeleitet wird. Der Transpirationsstrom ist bei Reis nach Yeo et al. (1987) und Yadav et al. (1996) sehr wichtig für die Na⁺-Aufnahme und den apoplastischen Na⁺-Transport in die Xylemgefäße, wobei eine derartige Beziehung bei Weizen nicht festgestellt werden konnte (Garcia et al. 1997). Dieselben Autoren konnten bei der Reissorte IR36 unterschiedliche Linien charakterisieren, die sich im Na⁺-Transport unterscheiden. Schwacher und starker Na⁺-Transport der Reislilien korrelierten sehr stark mit dem apoplastischen Weg. Der längere apoplastische Weg der Reiwurzeln führte zu einem geringeren Na⁺-Transport in den Spross. Nach Lehrbuchwissen wird Ca²⁺ über die Wurzelspitze aufgenommen und über den apoplastischen Weg bis in den Zentralzylinder transportiert (Mengel, 1991 und Marschner, 1995). Nach einer Erhöhung der Transpirationsbedingungen konnte Fortmeier (1995) jedoch keine verbesserte Ca²⁺-Einlagerung in den jüngsten Blättern und keine erhöhte Na⁺-Konzentration im Spross der Maissorte Pioneer 3906 feststellen. Auch Atkinson et al. (1992) fanden bei einer großen Anzahl von untersuchten Pflanzenarten keinen Zusammenhang zwischen der Ca²⁺-Aufnahme bzw. -Verteilung in der Pflanze und der Transpiration. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Transport von Na⁺- und Ca²⁺-Ionen in Mais nicht auf den Transpirationsstrom angewiesen ist. Nach der ersten Hypothese

könnte die stärkere Intensität der Na^+ -Exklusion an der Wurzeloberfläche zu der geringeren Ca^{2+} -Verlagerung im Xylemexsudat führen. Bei der Annahme, dass Na^+ und Ca^{2+} apoplastisch durch die Zellwände transportiert werden, könnte eine Zellmorphologie mit einem größeren apoplastischen Anteil an der Wurzeloberfläche die negativen Bindungsstellen bzw. den Diffusionswiderstand für die beiden Ionen erhöhen. Dieses führt dazu, dass Ca^{2+} apoplastisch nicht ausreichend in die Xylemgefäße und durch geringen Wurzeldruck nicht in die jüngere Blätter weitergeleitet wird. Ist der Transport von diesen beiden Ionen symplastisch, so könnte Ca^{2+} wie auch Na^+ durch dicht gepackte Zellen an der Wurzelspitze vermehrt in die Vakuole durch primär aktive Ca^{2+} -ATPase (Sze, 1985; Felle, 1991; Davies, 1997) und sekundär aktive $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter (Blumwald und Poole, 1986; Pfeiffer und Hager, 1993; Gerald, 1999) kompartimentiert oder durch die negative Ladung der Zellen direkt gebunden werden.

Nach der zweiten Hypothese wird Ca^{2+} wie auch Na^+ aus der Xylemleitbahn in die Xylemparenchymzellen transloziert. Die Maissorte Pioneer 3906 ist effektiv in der Lage, Na^+ aus den Xylemgefäßen in die angrenzenden Parenchymzellen zurückzuverlagern, um den Spross vor zu hohen Na^+ -Konzentrationen zu bewahren (Schubert, 1990). Auch bei morphologischen Untersuchungen im Zentralzylinder der Sorte Pioneer 3906 im Vergleich zu "Across 8023" konnte Fortmeier (1995) eine größere Anzahl dieser Zellen nachweisen. Die Absorption von Ca^{2+} in die Xylemparenchymzellen könnte für ein geringeres Ca^{2+} -Gehalt im Xylemsaft verursachen. Um dies zu untersuchen war es notwendig, mit Genotypen zu arbeiten, die in Bezug auf die Na^+ -Exklusionsstrategien sehr stark variieren. In der ersten aufspaltenden Selbstungsgeneration der Hybridsorte Pioneer 3906 konnte Schierholt (1995) eine große Variation der Nachkommenschaft bezüglich der beiden Na^+ -Exklusionsstrategien feststellen. In der aufspaltenden F_2 -Generation konnte zwischen der Intensität der Na^+ -Exklusion an der Wurzeloberfläche bzw. am Xylemparenchym und der Ca^{2+} -Menge des Xylemexsudates keine positive Korrelation festgestellt werden (Abb. 10). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die verbesserten Na^+ -

Exklusionsstrategien nicht zu einer verminderten Ca^{2+} -Menge im Xylemexsudat führen. Bei der Entnahme des jüngsten Blattes für die Ca^{2+} -Analyse waren diese noch in eingerolltem Zustand. Für den Transport von Ca^{2+} in die jüngsten Blätter spielt der Transpirationsstrom daher nur eine untergeordnete Rolle und ist somit nur auf den Wurzeldruck angewiesen. Bei der sehr unterschiedlichen Intensität der beiden Exklusionsstrategien in verschiedenen Individuen der F_2 -Population führte der Wurzeldruck auch nicht zu einer geringeren Ca^{2+} -Verlagerung in die jüngsten Blätter bei stärkerer Na^+ -Exklusion (Abb. 8, 9). Der Versuch wurde bei einer Konzentration von 25 mM NaCl in der Nährlösung durchgeführt, weil ab etwa 35-40 mM NaCl kein nennenswerter Wurzeldruck mehr von der Pflanze aufgebaut wird (Benzinger, 1994; Fortmeier, 1996).

Vergleicht man dagegen bei 100 mM NaCl Konzentration die noch effizienter Na^+ -ausschließende Inzuchtgeneration (IP-6) mit ihrer Elternlinie Pioneer 3906, so ist zu sehen, dass die Ca^{2+} -Konzentration im jüngsten Blatt bei der Inzuchtgeneration im Vergleich zu Pioneer 3906 signifikant höher ist (Abb. 17). Nach Bergmann (1992) sind Ca^{2+} -Konzentrationen von 0,3-1,0 % in der Trockenmasse von Maisblättern im vegetativen Stadium ausreichend. Unter Salzbehandlung (100 mM NaCl) lagen die Ca^{2+} -Konzentrationen in den jüngsten Blättern der verschiedenen Genotypen unter der als ausreichend angegebenen Grenze. Allerdings gelten die Grenzwerte von Bergmann (1992) für voll entwickelte Maisblätter bei einer Pflanzenhöhe von 40-60 cm. Die Pflanzen wurden in diesem Experiment im 5- bis 6-Blattstadium bei einer Höhe von 20-30 cm geerntet. Daher liegen wahrscheinlich die Ca^{2+} -Konzentrationen in den jüngsten Blättern von verschiedenen Genotypen unterhalb des angegebenen Grenzwertes. Ausreichende Konzentrationswerte von Ca^{2+} wurden im restlichen Sprossmaterial der Sorte Pioneer 3906 und Across 8023 unter dem Einfluss von 100 mM NaCl erreicht (Abb. 33b). Es kam auch bezüglich der Ca^{2+} -Konzentration in diesem Organ unter dem Einfluss der Salzbehandlung zu keinen wesentlichen Unterschieden zwischen den beiden Sorten. Auch die K^+ -Konzentrationen der Maispflanzen wurden

unter Salzbehandlung durch das effizientere Na⁺-Exklusionsvermögen nicht stärker beeinträchtigt (Abb. 16, 23, 33a). Diese lagen sogar höher als die der schwach Na⁺-ausschließenden Genotypen. Kramer et al. (1977) stellten mittels Koppelung eines Raster-Elektronenmikroskopes mit einer Einrichtung zur Röntgenmikroanalyse fest, dass bei der Bohne (*Phaseolus coccineus*) der K⁺-Gehalt in den Wurzeln mit steigender Salinität abnahm und in den Blättern zunahm, da bei Versalzung K⁺ im Xylemparenchym gegen Na⁺ eingetauscht und in den Gefäßen aufwärts geleitet wird. In dieser Arbeit lagen die K⁺-Konzentrationen der verschiedenen Genotypen unter Salinitätsbedingungen innerhalb der von Bergmann (1992) als ausreichend definierten Konzentrationsbereiche.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Ca²⁺-Mangelsymptome in den jüngsten Blättern bei den Na⁺-ausschließenden Genotypen nicht auf die Na⁺-Exklusionsstrategien zurückzuführen sind. Anscheinend sind diese vorübergehenden Ca²⁺-Mangelsymptome bei diesen Genotypen auf einen unterschiedlichen physiologischen Ca²⁺-Bedarf der jüngsten Blätter zurückzuführen. Die verbesserte Na⁺-Exklusion führte auch nicht zu einer verminderten Ca²⁺- bzw. K⁺-Ernährung der Gesamtpflanze. Dies ist unter salinen Bedingungen für die Salzresistenz eine sehr wichtige Eigenschaft. Der Austausch von stabilisierenden Ca²⁺-Ionen durch Na⁺ am Plasmalemma der Wurzelzellen (Cramer et al., 1985; Lynch et al., 1987) führt zu einer Veränderung der Membranpermeabilität (Cramer und Läuchli, 1986), so dass der Na⁺-Influx erhöht und der K⁺-Influx beeinträchtigt wird (Cramer et al., 1986). Durch Na⁺-Exklusion sowie durch eine erhöhte Absorption von Ca²⁺ und K⁺ wird die K⁺/Na⁺-Selektivität verbessert und damit letztlich ein günstiges K⁺/Na⁺-Verhältnis im Cytoplasma für die einwandfreie Funktion von Zellorganellen und für die Enzymaktivität geschaffen (Hajibagheri et al., 1987; Serrano und Gaxiola, 1994; Läuchli, 1999). Diese effiziente Regulation der Kalium-Homeostase im Cytoplasma könnte ein wichtiger genetischer Faktor mit Beitrag zur Salzresistenz sein (Gregorio und Senadhira, 1993; Shannon, 1997; Yeo, 1998).

4.3 Wirkt Cl⁻ in der zweiten Phase eines Salzstresses toxisch auf die Maispflanze?

Unter salinen Bedingungen können die Aufnahmeraten von Cl⁻ sehr hoch sein, und es kann somit zu beachtlichen Chloridanreicherungen im Cytoplasma und auch in der Vakuole kommen (Cram, 1973). Zusätzlich zum Na⁺, welches hauptsächlich mit K⁺, Mg²⁺ und Ca²⁺ um Bindungsstellen z.B. an Enzymen konkurriert und damit diese in ihrer Funktionstüchtigkeit beeinträchtigt, wirkt Chlorid in hohen Konzentrationen toxisch. Man nimmt an, dass Chlorid anionische Bindungsstellen an der RNA blockiert (Serrano et al. 1999). Cl⁻-Überschuss führt zu Chloropyllzerstörungen und damit zu fleckenartigen, chlorotischen Aufhellungen entlang der Blattränder (Bergmann, 1992). Generell gilt, dass viele Gräser (Monokotyledonen) auf Na⁺ und viele Dikotyledonen bzw. Gehölzarten auf Cl⁻ sehr empfindlich reagieren. Nach Marschner (1986) könnte bei Cl⁻-empfindlichen Pflanzenarten eine Züchtung auf Cl⁻-Exklusion Fortschritte bezüglich der Salzresistenz bringen. Nach Baumeister und Ernst (1978), Greenway und Munns (1980) sowie Kemmler (1985) gilt die Maispflanze als chloridverträglich. Mühling, K.H. (persönliche Mitteilung) stellte allerdings bei der Sorte Helix nach einer langfristigen Salzbehandlung mit NaCl die von Bergmann (1992) beschriebenen Cl⁻-Toxizitätssymptome fest. In einem langfristigen Versuch mit 100 mM Na⁺ mit unterschiedlichen Begleitaneionen (Chlorid/Sulfat) bei der Sorte Pioneer 3906 und Across 8023 stellte Fortmeier (1996) fest, dass die Ionentoxizität bei Mais eindeutig auf Na⁺ und nicht auf Cl⁻ zurückzuführen war. Allerdings liefen die NaCl- und Na₂SO₄-Experimente nicht gleichzeitig, so dass die unterschiedlichen Umweltbedingungen auch einen Einfluss auf das Wachstum der Pflanzen haben konnten. Auch nach Schubert (1990) scheidet die Cl⁻-Toxizität trotz der bei NaCl-Salinität erhöhten Cl⁻-Konzentrationen in Spross- und Wurzelgewebe der Maissorten "Pioneer 3906" und "DeKalb XL75" aus. Um zu überprüfen, ob Cl⁻ für die Maispflanze, nach Angaben von Mühling, doch toxisch wirkt, wurde in dieser Arbeit das Wachstum der beiden Mais-Genotypen "Helix" und "Pioneer 3906" unter langfristigen

Einfluss von 100 mM NaCl bzw. 50 mM Na₂SO₄ miteinander verglichen. Die Versuche liefen gleichzeitig und unter kontrollierten Umweltbedingungen.

Das Pflanzenwachstum war zwar unter NaCl-Bedingungen stärker beeinträchtigt (Abb. 3), Unterschiede in Bezug auf die Na⁺-Konzentrationen in der Pflanze zwischen den beiden Salzbehandlungen waren jedoch nicht zu verzeichnen (Abb. 4). Na⁺ konnte nach diesen Angaben bei der NaCl-Variante nicht zu dem geringeren Pflanzenwachstum geführt haben. Ein Mineralstoffmangel durch NaCl-Gabe konnte auch nicht nachgewiesen werden, da die K⁺- und Ca²⁺-Konzentrationen der Pflanzen innerhalb der von Bergmann (1992) als ausreichend definierten Grenze lagen (Abb. 6, 7). Die kritische Cl⁻-Konzentrationen von Cl⁻-toleranten Pflanzen liegen nach Bergmann (1992) bei 40 mg/g TS und nach White et al. (2001) zwischen 15-50 mg/g TS. Die Mobilität von Cl⁻ in der Pflanze ist sehr gut. Chlorid kann im Xylem und mit hoher Rate im Phloem transportiert werden (Lessani und Marschner, 1978; Lohaus et al., 2000; White et al. 2001). Bei Cl⁻-Überschuss wird dieses Anion in basipetaler Richtung verlagert (Greenway und Munns, 1980) und dementsprechend können die Toxizitätssymptome in älteren Blättern auftreten. Unter NaCl-Bedingungen lagen die Cl⁻-Konzentrationen in älteren Blättern der beiden Genotypen im Grenzbereich der Toxizitätsgrenzwerte von Bergmann (1992) und White (2001), während hingegen das zweit-älteste Blatt der Sorte Pioneer 3906 sogar im kritischen Bereich lag (Abb. 5). Es wurde jedoch in diesen Blättern der beiden Genotypen keine der von Bergmann (1992) beschriebenen Cl⁻-Toxizitätssymptome festgestellt. Hinzu kommt, dass "Pioneer 3906" trotz höherer Cl⁻-Konzentration im Spross und in der Wurzel genauso gut wie "Helix" gewachsen war (Abb. 3). All diese Ergebnisse sprechen gegen ein Vorhandensein von Cl⁻-Toxizität in der Pflanze. Das verminderte Wachstum in der NaCl-Variante ist nach diesen Angaben weder auf Na⁺- noch auf Cl⁻-Toxizität oder Mineralstoffmangel zurückzuführen. Dafür könnte das Wasserpotential verantwortlich sein, weil das osmotische Potential der Nährlösung mit NaCl wesentlich niedriger

(-0,51 MPa) war als das derjenigen mit Na_2SO_4 -Behandlung (-0,34 MPa). Vergleicht man dagegen die Pflanzen in NaCl - und Na_2SO_4 -Varianten miteinander, so wurden bei beiden Behandlungen die gleichen Toxizitätssymptome an den älteren Blättern beobachtet. Diese Blätter starben in gleichem Ausmaß an den Blattspitzen ab, was auf eine Na^+ -Toxizität hindeutete.

Daher kann aus dieser Arbeit in Übereinstimmung mit Schubert (1990) und Fortmeier (1996) gefolgert werden, dass in der zweiten Phase eines Salzstresses Na^+ und nicht Cl^- auf die Maispflanze toxisch wirkt.

4.4 Gibt es in der ersten Phase eines Salzstresses Ionentoxizität?

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird die Wachstumshemmung der Pflanze unter Salzeinwirkung nach dem Modell von Munns (1993) mit einer zweiphasigen Reaktion beschrieben (Abb. 1). Trotz der höheren Na^+ -Aufnahme im Restspross der salzempfindlichen Sorte Across 8023 im Vergleich zu der salzresistenten Sorte Pioneer 3906 (Abb. 32a), konnte neun Tage nach Behandlungsbeginn mit 100 mM NaCl zwischen den beiden Sorten hinsichtlich des Blattwachstums kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 30). Fortmeier (1996) fand ebenso bis ca. 20-25 Tage nach Beginn der Salzbehandlung eine identische prozentuale Reduktion der Sprosstrockenmasse von den unterschiedlich salzempfindlichen Maissorten Pioneer 3906 und Across 8023, wobei das Wachstum der beiden Genotypen sich erst nach diesem Zeitraum unterschied. Auch in einigen Literaturangaben konnten während einer kurzfristigen Salzbehandlung keine Wachstumsunterschiede zwischen verschiedenen salzresistenten Mais- und Weizengenotypen festgestellt werden (Schubert und Läuchli, 1986; Peterson et al., 1987; Cramer et al., 1994a; Munns et al., 1995). Dieser Zeitraum entspricht nach Munns (1993) der ersten Phase der Einwirkung von Salinität auf das Pflanzenwachstum, welche

vornehmlich durch den von Salz induzierten osmotischen Stress geprägt ist und in der unterschiedlich salzresistente Genotypen mit der gleichen prozentualen Wachstumsreduktion reagieren. Im Gegensatz dazu konnte Neumann (1997) in dieser Phase der Salzeinwirkung Wachstumsunterschiede bei unterschiedlich salzempfindlichen Maisgenotypen feststellen. Auch Schierholt (1994) konnte 11 Tage nach Behandlungsbeginn mit 25 mM NaCl Unterschiede in Bezug auf die Sprossfrischmasse der Sorten Pioneer 3906 und Across 8023 identifizieren. In dieser Arbeit stellte sich nun die Frage, ob das Modell von Munns (1993) auf Mais zutrifft, oder ob schon in der frühen osmotischen Stressphase eine ionenspezifische Toxizität wirkt.

Um die Wachstumshemmung in der ersten Phase eines durch Salzstresses induzierten physiologischen Trockenstress mit Dürrestress vergleichen zu können, wurde in dieser Arbeit Polyethylenglycol (PEG 6000) als Osmotikum verwendet. Für diese Zwecke wird PEG in vielen Literaturangaben als ein akzeptiertes Molekül angesehen (Jackson, 1962; Parmar und Moore, 1966; Lawlor, 1970; Mexal et al., 1975; Kawasaki et al., 1983a; Fan und Blake, 1997; Verslues et al., 1998). PEG 6000 ist besonders gut als externes Osmotikum für die Untersuchung von Trockenstressreaktionen geeignet, da es wegen des hohen Molekulargewichts nicht in die Zellwände bzw. Apoplasten eindringt, und dadurch nicht von der Zelle aufgenommen wird (Carpita et al., 1979; Oertli, 1987; Hohl und Schopfer, 1991). Das osmotische Potential von PEG 6000 fällt mit steigender Konzentration nicht wie bei NaCl linear, sondern exponentiell ab (Abb. 2). Das starke Abfallen des osmotischen Potentials durch steigende PEG-Mengen wurde von Burlyn et al. (1973), Steuter et al. (1981), Money (1989) und Plietsch-Balzer (1993) gezeigt. Gel-bildende Polysaccharide wie PEG haben im Gegensatz zu Monosacchariden eine vergrößerte Oberfläche und dadurch eine höhere Wasser-Absorptionskapazität (Franks, 1975). Die Gel-bildenden Eigenschaften von PEG beruhen auf den polaren Gruppen bzw. Doppelbindungen der polymeren PEG-Ketten. Das Matrixpotential variiert mit der Größe des Moleküls. Kurzkettiges PEG zeigt einen schwächeren exponentiellen Abfall des Matrixpotentials

wogegen langkettiges PEG (MG >1000) einen stärkeren exponentiellen Verlauf zeigt (Steuter et al., 1981).

Das Wurzelwachstum bei Mais wird unter salinen bzw. Dürre-Bedingungen mehr oder weniger stark reduziert, wobei das Sprosswachstum stärker beeinflusst wird (Lewis et al., 1989; Cramer et al., 1994b; Schmidhalter et al., 1998a; Hsiao und Xu, 2000). Marschner (1986) bezeichnet die stärkere Reduktion des Sprosswachstums unter dem Einfluss von Salzstress als generelles Phänomen. Verringertes expansives Blattwachstum und Stomataschluss gelten als erste messbare Antworten auf osmotischen Stress bzw. Salinität, sogar wenn die Blattwasserverhältnisse nicht direkt von den osmotischen Veränderungen betroffen sind (Munns, 1993). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das Sprosswachstum berücksichtigt. Ein durch PEG und NaCl hervorgerufener Stress führte gegenüber der Kontrolle zu einer gleichen Reduktion der Frischmasse (Abb. 24). In einer kurzfristigen Behandlung mit isoosmotischen Konzentrationen von NaCl, PEG, Mannitol und KCl konnte kein spezifischer NaCl-Effekt auf das Pflanzenwachstum von Mais und Reis festgestellt werden (Acevedo et al., 1971; Cramer und Bowman, 1991; Yeo et al., 1991; Chazen und Neumann, 1994). Einen spezifischen Ioneneffekt durch eine 9-tägige Behandlung mit isoosmotischen Konzentrationen von NaCl im Vergleich zu PEG bei zwei unterschiedlich trockenresistenten Maisgenotypen konnte auch Mladenova (1990) in Bezug auf die Frischmasse nicht nachweisen. In diesem Zeitraum waren die Pflanzen nach dem Modell von Munns (1993) in der osmotischen Stressphase, in der Ionentoxizität noch keine Rolle spielte. In dieser Phase könnte die Wachstumsreduktion auf Abscisinsäure (ABA) zurückgeführt werden, da unter Stressbedingungen wie Trockenheit und Salinität ein Anstieg der Konzentration des Phytohormons im Xylemsaft von Pflanzen festgestellt wurde (Wolf et al., 1990; Davies und Zhang, 1991; Ben Haj Saleh und Tardieu, 1997). Bei Monokotyledonen ist der empfindlichste Parameter gegenüber Salz- bzw. Dürrestress das Blattwachstum (Munns und Termaat, 1986; Dale, 1988; Schmidhalter et al., 1998b) wobei die erste Wirkung des

reduzierten Sprosswachstums in den wachsenden Geweben stattfindet und nicht in den bereits entwickelten photosynthetisch aktiven Geweben (Iyengar und Reddy, 1994). Vergleicht man somit das als empfindlichster Parameter für Streckungswachstum geltende Blattwachstum (4. Blatt) der Sorte Pioneer 3906, so ist deutlich zu sehen, dass dieses durch NaCl im Vergleich zu PEG, bei isoosmotischen Bedingungen, stärker reduziert wurde (Abb. 25, 26). Obwohl die Maissorten Pioneer 3906 und Helix 8023 unter NaCl- im Vergleich zu PEG-Behandlung osmotisch besser angepasst waren (Abb. 31), konnte trotzdem bei NaCl im Hinblick auf das Streckungswachstum des 4. Blattes bei beiden Sorten eine stärkere Reduktion festgestellt werden (Abb. 30). In einem Vergleich zwischen einer NaCl- und PEG-Behandlung unter isoosmotischen Bedingungen war das Wachstum bei Gerste (Storey & Wyn Jones, 1978; Kawasaki et al., 1983b) und bei verschiedenen Tomaten Genotypen (Pérez-Alfocea et al., 1993) in NaCl stärker beeinträchtigt als im Vergleich zu PEG. Diese von verschiedenen Autoren belegten Ergebnisse sowie die Befunde in den vorliegenden Untersuchungen deuten darauf hin, dass in der ersten Phase der Salzeinwirkung neben osmotischem Stress zusätzlich auch Ioneneffekte zur Wachstumsreduktion führen können. Es stellt sich nun die Frage, auf welches Ion die Ionentoxizität in der ersten Phase der Einwirkung von Salzstress auf Mais zurückgeht.

Ein Vergleich verschiedener Salzlösungen äquivalenter Ionenkonzentration bei gleichem Wasserpotential (eingestellt mit PEG) zeigt, dass das Blattwachstum bei der $MgCl_2$ -Variante im Vergleich zu den Na_2SO_4 - und NaCl-Varianten größer war (Abb. 35). Dieser Unterschied wurde mit Fortsetzung des Versuches kleiner, weil zu hohe Konzentrationen an Mg^{2+} auf das Wachstum ebenfalls toxisch wirken könnten. Nach Schleiff und Finck (1976) liegt der Mg^{2+} -Toxizitätsgrenzwert bei Gramineen in vegetativen Stadium bei 6-8 mg / g TS. Nach neuntägiger Salzbehandlung lag die Mg^{2+} -Konzentration mit 9 mg / g TS oberhalb des angegebenen Toxizitätswertes (Abb. 37), was auch zu einer Wachstumsreduktion führen konnte. In diesem engen Wachstumsbereich das toxisch wirkende Ion festzustellen, ist

schwierig, weil die verschiedenen Begleitaneionen auch zu einer unterschiedlichen Kationenaufnahme führen können. Chlorid als Begleitaneion ist mobiler als SO_4^{2-} (Awada et al., 1995). Deswegen wurde bei der NaCl- im Vergleich zu der Na_2SO_4 -Variante mehr Na^+ und Ca^{2+} aufgenommen (Abb. 37). In jedem Zeitpunkt der Messung zeigte dagegen die NaCl- eine vergleichbare Wachstumshemmung wie die Na_2SO_4 -Variante (Abb. 35). Diese Ergebnisse mit verschiedenen Salzlösungen deuten darauf hin, dass die zusätzliche Wachstumsreduktion in der ersten Phase eines Salzstresses nicht auf eine Cl^- -Toxizität sondern auf einen Na^+ -Effekt zurückgeht. Ein eventueller Na^+ -Effekt konnte auch in einem Vergleich von zwei verschiedenen Maissorten gezeigt werden. Obwohl unter NaCl-Bedingungen die Sorte Across 8023 im Vergleich zu "Pioneer 3906" osmotisch besser angepasst war (Abb. 31), konnten im Hinblick auf das Blattwachstum keine Sortenunterschiede festgestellt werden (Abb. 30). Die höhere Na^+ -Aufnahme der Sorte Across 8023 könnte zu diesem Ausgleich geführt haben (Abb. 32a).

Die Ca^{2+} -Konzentration im Spross wurde bei NaCl-Applikation stärker reduziert als durch PEG (Abb. 29, 33b). Unter diesen Bedingungen lagen zwar die Ca^{2+} -Konzentrationen oberhalb der von Bergmann (1992) als ausreichend definierten Grenzen, es konnten aber wegen des Pflanzenalters keine eindeutigen Aussagen getroffen werden (s. Kap. 2.3.2.5). Storey & Wyn Jones (1978), Kawasaki et al., 1983 und Pérez-Alfocea et al. (1993) haben ebenso bei NaCl im Vergleich zu PEG eine geringere Ca^{2+} -Konzentration im Spross der Gerste und der Tomate festgestellt. Das geringere Blattwachstum der Pflanzen in der NaCl-Behandlung im Vergleich zu PEG führten diese Autoren auf einen salzinduzierten Ca^{2+} -Mangel zurück. Unter dem Einfluss von isoosmotischen Salzkonzentrationen mit unterschiedlichen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Verhältnissen fanden Grieve und Fujiyama (1987) bei Reis sowie Maas und Grieve (1987) bei Mais, dass das Sprosswachstum nach ca. drei Wochen bei überoptimaler Ca^{2+} -Konzentration reduziert war. Das bedeutet, dass in dieser Zeit die Wachstumsreduktion durch Salzstress nicht in erster Linie durch Mangel an Ca^{2+}

sondern durch den osmotischen Stress verursacht wird. Auch Fortmeier (1996) stellte für Mais fest, dass die Ca^{2+} -Konzentration im Spross durch die Steigerung mit Na_2SO_4 bei gleicher Na^+ -Konzentration stärker reduziert wurde als durch die Steigerung mit NaCl . Die Entwicklung der Blattfläche verhielt sich jedoch umgekehrt, was ebenfalls darauf hindeutete, dass in dieser Zeit osmotischer Stress, und nicht Ca^{2+} -Mangel den limitierenden Faktor für das Wachstum darstellte. Diese von verschiedenen Autoren durchgeführten Experimente erklären aber noch nicht, warum in der ersten Phase eines Salzstresses das Wachstum unter NaCl stärker beeinträchtigt wurde als durch PEG. Obwohl im Spross unter NaCl - im Vergleich zu Na_2SO_4 -Bedingungen eine höhere Ca^{2+} -Konzentration zu verzeichnen war (Abb. 29), konnten zwischen den beiden Salzbehandlungen keine Unterschiede im Blattwachstum festgestellt werden (Abb. 35). Ebenfalls ist deutlich zu erkennen, dass unter NaCl -Behandlung die Ca^{2+} -Konzentration im Spross der Sorte Across 8023 im Vergleich zu "Pioneer 3906" stärker reduziert wurde (Abb. 33b). Wäre die Entwicklung der Blattfläche in dieser Phase des Salzstresses durch einen Ca^{2+} -Mangel im Spross limitiert, so hätte "Across 8023" eine stärkere Reduktion zur Folge haben müssen. Da dies nicht der Fall ist (Abb. 30), kann davon ausgegangen werden, dass in der ersten Phase eines Salzstresses ein Mangel an Ca^{2+} für die Reduktion des Wachstums keine Rolle spielt.

Besonders durch die Behandlung mit 100 mM Na^+ nahm die K^+ -Konzentration im Spross stärker ab (Abb. 29, 33a, 37). Wegen chemischen Ähnlichkeiten von Na^+ - und K^+ - Ionen führen hohe Na^+ -Konzentrationen zu einer Verschiebung des Na^+/K^+ -Verhältnisses und damit zu einer Verdrängung von K^+ in der Pflanze (Greenway und Munns, 1980; Rathert, 1983). Im Unterschied zu den hoch selektiven Transportsystemen für K^+ erfolgt der Na^+ -Transport durch weniger selektive Kanäle (Matthuis und Amtmann, 1999), so dass bei erhöhten Na^+ -Außenkonzentrationen der Na^+ -Influx wahrscheinlich eher über ein K^+ -Aufnahmesystem geringer Affinität erfolgt, wobei Na^+ die K^+ -Aufnahme hemmt (Schroeder et al., 1994; Glenn et al., 1997). Helal

und Mengel (1979) konnten in Nährlösungskultur für Gerste zeigen, dass durch K^+ -Ernährung über ein verbessertes K^+/Na^+ -Verhältnis im Blatt das Blattwachstum deutlich verbessert wurde. Ebenso konnte in einem Feldversuch in der Türkei mit Mandarinenbäumen durch K^+ -Düngung das gehemmte Blattwachstum, ausgelöst durch NaCl-Salinität, wieder deutlich verbessert werden (Anac et al., 1997). Allerdings ist durch Na^+ -Exklusion das K^+/Na^+ -Verhältnis bei Gräsern in der Regel deutlich höher als bei dikotylen Pflanzen (Kinzel, 1982). Da in dieser Arbeit die K^+ -Konzentrationen im Spross oberhalb der von Bergmann (1992) als ausreichend definierten Grenzen lagen und keinerlei K^+ -Mangelsymptome festgestellt werden konnten, ist nicht davon auszugehen, dass ein latenter K^+ -Mangel unter den vorgegebenen Salinitätsbedingungen vorgelegen hat.

Kalium hat eine beachtliche Bedeutung für das meristematische Wachstum und muss deswegen in einer bestimmten Mindestkonzentration vorliegen, damit es nicht zur Wachstumsreduktion kommt (Schubert, 1990; Mengel, 1991). Eine cytoplasmatische K^+ -Konzentration von 100-200 mM gilt als wichtige Voraussetzung für eine optimale Aktivierung der in diesem Kompartiment vorhandenen Enzyme (Leigh und Wyn Jones, 1984; Leigh et al., 1986; Bethmann et al., 1995). Wachstum umfasst Zellteilung und Zellstreckung, wobei insbesondere der letztere Prozess von der Beschaffenheit der Zellwand und Zellturgor abhängt (Boyer, 1987). Für die Zellstreckung ist K^+ in Verbindung mit einem begleitenden Anion die bedeutendste Substanz in den Vakuolen, da es dort das osmotische Potential vermindert und dadurch eine Rolle bei dem Aufbau des Zellturgors spielt (Marschner, 1995). Durch die Aktivierung der im Plasmalemma gebundenen H^+ -ATPase könnte K^+ zusätzlich indirekt Einfluss auf die Struktur der Zellwand bzw. die Zellwandelastizität nehmen (Anthon und Spanswick, 1986).

Um die Hypothese zu überprüfen, ob in der ersten Phase die zusätzliche Hemmung des Streckungswachstums unter Na^+ -Bedingungen auf einen durch Na^+ induzierten latenten K^+ -Mangel

beruht, wurden in den PEG-Varianten die K^+ -Konzentrationen variiert. Obwohl die K^+ -Konzentration im vierten Blatt der PEG-Behandlung mit dem niedrigsten K^+ -Angebot im Wurzelmedium (0,4 mM K^+), verglichen mit der NaCl-Behandlung (1,2 mM K^+), gleichermaßen reduziert wurde (Abb. 40), wies diese PEG-Variante trotzdem einen größeren Blattflächenparameter als die NaCl-Variante auf (Abb. 38). Die Pflanzen waren nach Bergmann (1992) ebenfalls ausreichend mit K^+ versorgt. Es konnte also kein K^+ -Mangel induziert werden, weil das K^+ -Angebot in der Nährlösung ausreichend hoch war. Nach unseren Versuchsbedingungen spielte K^+ -Mangel für die Wachstumsreduktion in dieser Phase keine Rolle. Zusammenfassend läßt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass Na^+ schon in der ersten Phase eines Salzstresses toxisch auf das Streckungswachstum der Maispflanze wirkt.

Neben dem verringerten expansiven Blattwachstum gilt Stomatenschluss auch als eine erste messbare Antwort auf osmotischen Stress bzw. Salinität (Munns, 1993). Abscisinsäure wird im Blattmesophyll, aber auch in der Wurzel sehr schnell synthetisiert, wenn das Wasserpotential im Wurzelmedium durch Dürre oder Salinität sinkt. Die Synthese von ABA in der Wurzel und insbesondere deren Anstieg im Xylem wird als ein frühes Signal interpretiert, das zum Stomatenschluss im Blatt führt und damit vor hohen Wasserverlusten schützt (Davies und Zhang, 1991; Munns und Sharp, 1993; Munns und Cramer, 1996). Abscisinsäure steuert den Stomataschluss vermutlich über eine Vielzahl von Vorgängen (Blatt und Thiel, 1993), die über die Membrandepolarisation der Schließzelle, zur massiven Freisetzung von K^+ führt; Wasser diffundiert entlang des Wasserpotentialgradienten heraus und führt damit durch Turgorabfall zum Stomataschluss. Auffällig ist, dass die Transpiration bei den Na^+ behandelten Pflanzen gleich groß oder sogar größer als die der Kontrollpflanzen war (Abb. 28, 36). Osmotischer Stress durch PEG bzw. $MgCl_2$ -Salinität führte bei Mais gegenüber Na^+ -induziertem Dürrestress ($NaCl$, Na_2SO_4) zu einer geringeren Transpiration. Diese Befunde deuten darauf hin, dass sich die Stomata unter Na^+ -Bedingungen nicht schließen konnten. Trotzdem waren die Pflanzen turgeszent, weil Na^+ in der Pflanze eine

osmotische Adaptation gewährleisten. Auch McCree (1986) stellte bei Sorghum fest, dass im Unterschied zur Trockenheit, NaCl-induzierter Wasserstress zu erhöhter Transpiration bei voll turgeszenten Blattspreiten führte. Zum Öffnen der Stomata muss das Wasserpotential in den Schließzellen ausreichend niedrig sein, um einen Wassereinstrom zu gewährleisten, der die Zunahme des Turgordrucks bewirkt. Dazu müssen die K^+ -Konzentration und die Konzentration eines Gegenions (hauptsächlich Chlorid oder Malat) in den Schließzellen erhöht werden (Heß, 1991). Das Eindringen von Na^+ in die Schließzellen könnte toxische Folgen haben bzw. die Stomataregulation stören. Wegen der größeren Hydrathülle des Natriums im Vergleich zu K^+ kann Na^+ nicht aus den Schließzellen herausdifundieren und für offene Stomata sorgen. Der Vergleich der Transpirationswerte in dieser Arbeit gibt einen zusätzlichen Hinweis für einen Na^+ -Effekt in der ersten Phase eines Salzstress.

4.5 Wirkung von Salzstress auf das Streckungswachstum von Mais

Durch den von Salz verursachten osmotischen Stress wird die Streckungszone, die sich bei Monokotyledonen an der Blattbasis befindet (Kemp, 1980), schon nach einigen Stunden bis zu mehreren Tagen beeinträchtigt (Munns, 1993; Cramer et al., 1998; Hu et al., 2000; Munns et al., 2000). Durch histologische Untersuchungen in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach neuntägiger Behandlung mit NaCl und PEG, welche beide isoosmotische Bedingungen aufwiesen, die Blattdicke in der Streckungszone (50 mm entfernt von der Blattbasis) gegenüber den Kontrollpflanzen gleichermaßen reduziert wurde (Abb. 27, Tab. 5). Tardieu et al. (2000) konnten zeigen, dass bei Mais in der Streckungszone (0-20 mm entfernt von der Blattbasis) die Zellgröße an den Epidermen unter Trockenstress stark reduziert wurde. Epidermiszellen sind demnach für die Zellstreckung ein empfindlicher Parameter. Vergleicht man somit die Epidermisdicke

zwischen der NaCl- und PEG-Behandlung, so war bei der Salzvariante eine stärkere Reduktion zu beobachten. Auch die Anzahl der Epidermiszellen (ohne Stomata) in einer definierten Länge war bei der NaCl- im Vergleich zu der PEG-Variante höher. Die kleineren Epidermiszellen sind auf eine verminderte Zellstreckung zurückzuführen. Die verminderte Epidermis-Zellgröße gibt einen Hinweis auf das Vorhandensein eines Na⁺-Effektes in der ersten Phase eines Salzstresses.

Es stellt sich nun die Frage, wie Na⁺ schon in der frühen osmotischen Stressphase das Streckungswachstum von Mais beeinträchtigen kann. Wachstum umfasst Zellteilung und Zellstreckung. Voraussetzung für die Streckung der Zellen sind insbesondere der Turgor und die Zellwandextensibilität (Boyer, 1987). Unter salinen Bedingungen spielt jedoch der Turgor für die Zellstreckung keine Rolle, denn häufig treten gleiche oder sogar höhere Turgordrucke im Vergleich zu nicht salinen Bedingungen auf (Schubert, 1990; Arif und Tomos, 1993; Cramer et al., 1998). Unter salinen Bedingungen stellten Cramer & Bowman (1992) und Neumann (1993) bei Mais fest, dass die Zellwandhärtung den eigentlich begrenzenden Faktor für das Streckungswachstum der Zelle darstellt. Eine durch Auxin induzierte Ansäuerung der Zellwände führt zur Hydrolyse von Bindungen zwischen den Cellulosemikrofibrillen und somit zu einer Lockerung der Zellwandstruktur (Säure-Wachstums-Theorie nach Hager et al., 1971). Durch H⁺-Abgabe vermindert die Plasmalemma-H⁺-ATPase den pH-Wert im Apoplasten (Taiz, 1984; Kutschera, 1994). Untersuchungen zur Expression von H⁺-ATPasen haben gezeigt, dass die Plasmalemma-ATPase während der Zellstreckung reguliert wird. Bei jungen, expandierenden Blättern von Baumwollpflanzen erreichte die Transkriptionsrate der Pumpe ihr Maximum während der maximalen Streckungsrate (Smart et al., 1998). Aufgrund des ähnlichen Hydratationsradius von Na⁺ (360 nm) und K⁺ (331 nm) (Marschner, 1986) können diese an der Bindungsstelle des ATPase-Enzyms konkurrieren und auf die Aktivität des wichtigsten, für das Streckungswachstum verantwortlichen Enzyms, Einfluss nehmen.

Die Plasmalemma-Isolation erfolgte an 2d alten Maissprösslingen (s. Kap. 2.3.3), weil diese einen größeren Anteil an Streckungswachstumszonen enthalten. Um die im Plasmalemma lokalisierte H⁺-ATPase unter *in vitro*-Bedingungen untersuchen zu können, ist eine hohe Reinheit der isolierten Membranfraktionen unerlässlich. Mit Hilfe spezifischer Hemmstoffe können Verunreinigungen mit anderen Membranen bestimmt werden (Briskin et al., 1987). Zunächst wurde die im Plasmalemma lokalisierte H⁺-ATPase-Aktivität bei einem pH-Wert von 6,5 gemessen, der gemäß vieler Untersuchungen bei Mais das pH-Optimum des Enzymes darstellt (DuPont et al., 1981; De Michelis und Spanswick, 1986; Cowan et al., 1993). Die Zugabe von Vanadat wies eine 92%ige Hemmung der Enzymaktivität auf (Abb. 41), was nach vielen Literaturangaben auf eine hohe Reinheit an Plasmalemma-spezifischer H⁺-ATPase-Aktivität der gewonnenen Membranfraktionen hindeutete (Faraday und Spanswick, 1992; Yan et al., 1998; Fortmeier, 2000). Der Inhibitor Molybdat hemmt die saure Phosphatase (Gallagher und Leonard, 1982). Die leichte Hemmung der H⁺-ATPase-Aktivität durch die Zugabe dieses Inhibitors stimmte mit den Untersuchungen von Sandstrom et al. (1987), Faraday und Spanswick (1992) sowie Fortmeier (2000) überein. Die ATPase-Aktivitäten der möglichen Kontaminanten Tonoplasten- und Mitochondrienmembranen erreichen erst bei höheren pH-Werten von 8,0 und 8,5 ihr Aktivitätsoptimum (Anthon und Spanswick, 1986; Briskin et al., 1982; Widell und Larsson, 1990). Die Zugabe von Nitrat und Azid bei einem pH-Wert von 8,0 bestätigen, dass bei den isolierten Membranfraktionen nach Faraday und Spanswick (1992) von einer vernachlässigbaren Kontamination von Tonoplasten- und Mitochondrienmembranen ausgegangen werden kann. Um trotzdem einen Kontaminationseffekt auszuschließen, wurden die Aktivitätsmessungen mit einer Inhibitor-komplexlösung (Nitrat, Azid und Molybdat) und einer Inhibitor-komplexlösung, die zusätzlich Vanadat enthielt, durchgeführt. Die aus beiden Messreihen berechnete Differenz der Enzymaktivität wurde als die Plasmalemma-spezifische H⁺-ATPase-Aktivität bezeichnet.

Bei höchster Salzkonzentration (100 mM NaCl) unter *in vitro*-Bedingungen sank die hydrolytische H⁺-ATPase-Aktivität sowohl bei 100 mM K⁺ als auch bei 50 mM K⁺ gegenüber der Kontrolle um maximal 15% (Abb. 42), was auf einen sehr schwachen Na⁺-Effekt hindeutet. Die K⁺-Konzentration im Reaktionsmedium zeigte keinen Einfluss auf die hydrolytische ATPase-Aktivität, weil die Konzentration nach Perlin und Spanswick (1981) im Sättigungsbereich lag. Auch Fortmeier (2000) und Schubert (1990) konnten bei der Sorte Pioneer 3906 sowohl bei *in vitro*- als auch *in vivo*-Salzbedingungen keine veränderte H⁺-ATPase-Aktivität belegen. Allerdings wurden diese Messungen an der Wurzel vorgenommen und mit einem Na⁺/H⁺-Antiportsystem begründet. Die H⁺-Pumpaktivität der H⁺-ATPase ist sehr stark von den Anionenarten (Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻) abhängig (Giannini und Briskin, 1987). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Anionen mit unterschiedlicher Rate durch das Plasmalemma transportiert werden und somit auch das Membranpotential unterschiedlich beeinflussen, welches wiederum maßgeblich den H⁺-Transport durch die H⁺-ATPase beeinflussen kann (Briskin, 1990). Um diesen Anioneneffekt auszuschließen wurden bei den Messungen die Begleitaneionen konstant gehalten. Bei ausreichend vorhandener K⁺-Konzentration (100 mM) war auch die H⁺-Pumpaktivität durch Na⁺ kaum negativ beeinflusst (Tab. 6). Nach diesen Ergebnissen ist die Schlussfolgerung berechtigt, dass bei ausreichend vorhandener K⁺-Konzentration sowohl die hydrolytische- als auch die Pumpaktivität der H⁺-ATPase nicht sehr durch eine Na⁺-Toxizität beeinträchtigt wird.

In einem Vergleich zwischen der hydrolytischen Aktivität und der Pumpaktivität zeigte sich, dass bei vollständigem Ersatz von K⁺ durch 100 mM Na⁺ die hydrolytische H⁺-ATPase-Aktivität gegenüber der Kontrolle um etwa 30%, die H⁺-Pumpaktivität aber noch stärker um etwa 80% zurückging (Abb. 45). Unter natürlichen Bedingungen ist eine vollständige Substitution von K⁺ durch Na⁺ in der Zelle kaum realisierbar. Selbst bei dieser extremen Konzentration ist die hydrolytische Aktivität der H⁺-ATPase mit 70%iger Leistung immer

noch recht hoch. In dieser Versuchsreihe könnten die Bedingungen bis 50 mM K^+ /50 mM Na^+ noch auf physiologische Verhältnisse übertragbar sein. Selbst bei dieser Konzentration ist die H^+ -Pumpaktivität gegenüber der Kontrolle um etwa 50% reduziert, während bei der hydrolytischen Aktivität keine nennenswerte Reduktion festgestellt werden konnte. Dieses Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Stimulation der hydrolytischen Aktivität der H^+ -ATPase durch K^+ und durch Na^+ erfolgt. Das ist aber bei der H^+ -Pump-Aktivität nicht der Fall. In einer Untersuchung mit Haferwurzeln konnten auch Fisher und Hodger (1969) zeigen, dass bei der hydrolytischen H^+ -ATPase-Aktivität K^+ durch Na^+ ersetzt werden kann. In Literaturangaben wird über den stimulierenden Effekt von K^+ auf die ATPase berichtet, weil K^+ die Dephosphorylierung des Enzyms fördert (O'Neill und Spanswick, 1984; Briskin, 1986; Gibrat et al., 1990). Jedoch stellten Perlin und Spanswick (1981) bei aus Maisblättern isolierten Plasmamembranen fest, dass eine Stimulation der hydrolytischen ATPase-Aktivität bei einer K^+ -Konzentration ab 0,5 mM vorhanden ist. Eine Sättigung trat ab 20 mM K^+ ein. Auch F. Yan (persönliche Mitteilung) konnte in einem Konzentrationsbereich von 1 mM bis 300 mM K^+ keinen fördernden Effekt auf die hydrolytische Aktivität der H^+ -ATPase bei Lupinenwurzeln feststellen. Es ist bekannt, dass hohe Na^+ -Konzentrationen im Cytoplasma zumeist zu einem relativen K^+ -Mangel für Enzyme führen können (Munns, 1993). Durch zunehmende Na^+ - und abfallende K^+ -Konzentration im Reaktionsmedium war die hydrolytische Aktivität der H^+ -ATPase kaum verändert (Abb. 45). Die Pumpaktivität dagegen reagierte bei geringer K^+ -Konzentration, die auch infolge zunehmenden Na^+ verstärkt induziert war, mit einer stärkeren Hemmung. Die Konkurrenz von Na^+ mit K^+ im Cytoplasma könnte die Kopplung zwischen der H^+ -Pumpaktivität und der hydrolytischen Aktivität der H^+ -ATPase gestört haben. Aufgrund dessen kann auch angenommen werden, dass die katalytische Region und der Pumpmechanismus des Enzymes unabhängig voneinander auf verschiedene K^+ -Konzentrationen reagieren.

Die reduzierte H⁺-Pumpaktivität der ATPase unter NaCl-Bedingungen könnte eine Verminderung der Azidifizierung des Apoplasten bewirken. Dieser Prozess könnte nach der Säure-Wachstums-Theorie die Zellwandextensibilität und somit das Streckungswachstum limitieren.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand physiologischer Exklusionsstrategien der Maissorte Pioneer 3906 eine noch effizienter Na⁺-ausschließende Inzuchtlinie zu erstellen, um eine wesentliche Basis für die Entwicklung einer salzresistenten Hybridsorte zu erhalten. Weiterhin sollte das Zweiphasenmodell von Munns (1993) für Mais überprüft werden, ob in der ersten Phase der Salzeinwirkung auf das Wachstum der Pflanze neben osmotischem Stress auch eine ionenspezifische Toxizität existiert. Die Experimente führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Na⁺-ausschließende Sorte Pioneer 3906 zeigte unter Salinitätsbedingungen nach einigen Tagen Ca²⁺-Mangelsymptome an den jüngsten Blättern. In der ersten aufspaltenden F₂-Generation konnte gezeigt werden, dass Na⁺-Exklusion an der Wurzeloberfläche und am Xylemparenchym nicht mit den beobachteten Ca²⁺-Mangelsymptomen in den jüngsten Blättern korreliert war. Diese vorübergehenden Symptome sind anscheinend auf einen höheren physiologischen Ca²⁺-Bedarf der Sorte Pioneer 3906 zurückzuführen.
2. Wie die langfristige Salzbehandlung mit 100 mM Na⁺ mit unterschiedlichen Begleitaneionen (Cl⁻/SO₄²⁻) zeigte, wirkte in der zweiten Phase eines Salzstresses Na⁺ und nicht Cl⁻ auf die Maispflanze toxisch.
3. Durch wiederholte Selbstungen und Selektionen wurde eine homozygote Inzuchtlinie erstellt, in der nicht nur die beiden Na⁺-Exklusionsstrategien vereinigt wurden, sondern sich auch noch bessere Exklusionseigenschaften, sowohl an der Wurzeloberfläche als auch am Xylemparenchym, erreichen ließen als beim Ausgangsmaterial "Pioneer 3906". Das effizientere Na⁺-Exklusionsvermögen der Inzuchtlinie führte sowohl in Wasserkultur als auch in Bodenversuchen nicht zu einer mangelnden

Ca²⁺- und K⁺-Ernährung der Maispflanze. Allerdings traten verstärkt osmotische Probleme auf.

4. Nach dem Zweiphasenmodell von Munns sind in der ersten Phase eines Salzstressses zunächst osmotische Effekte für die Verminderung des Wachstums verantwortlich. Wird ein osmotischer Stress durch Polyethylenglycol (PEG 6000) und NaCl induziert, so war das Blattwachstum der beiden Varianten gegenüber der Kontrolle stark reduziert. Dies zeigt, dass osmotischer Stress in der ersten Phase dominierend für die Wachstumsreduktion verantwortlich ist. Die zusätzliche Wachstumsreduktion des 4. Blattes unter Einfluss der NaCl-Behandlung gegenüber der PEG-Behandlung, bei gleichem Wasserpotential, deutet auf einen zusätzlichen Ioneneffekt hin. Ein Vergleich verschiedener Salzlösungen äquivalenter Ionenkonzentration bei gleichem Wasserpotential (in den Salzlösungen eingestellt mit PEG) spricht für einen Na⁺-Effekt in der ersten Phase eines Salzstressses. Das Modell von Munns (1993) muss somit für Mais modifiziert werden.
5. Durch ein erhöhtes Na⁺/K⁺-Verhältnis war die hydrolytische H⁺-ATPase-Aktivität weniger stark beeinflusst, während die H⁺-Pumpaktivität der ATPase deutlich stärker beeinträchtigt wurde. Die Reduktion des Streckungswachstums unter NaCl-Bedingungen könnte aufgrund der geringeren Ansäuerung der Zellwände durch eine verminderte H⁺-Pumpaktivität der ATPase verursacht werden.

6. Summary

In order to achieve a basis for the development of a salt-resistant maize hybrid cultivar, this study was conducted to provide an efficient Na⁺-excluding inbred line on the basis of physiological exclusion strategies in maize cultivar Pioneer 3906. Further, the two-phase model by Munns (1993) for maize was tested if there was an ion-specific effect apart from the osmotic stress in the first phase of the salt stress. The experiments led to following results:

1. The Na⁺-excluding cultivar Pioneer 3906 showed Ca²⁺ deficiency symptoms at the youngest leaves after some days of salinity stress. In the segregating F₂-generation, it was shown that Na⁺ exclusion at the root surface and at the xylem parenchyma was not correlated with the observed Ca²⁺ deficiency symptoms in the youngest leaves. These temporary symptoms seemed to be due to a higher physiological Ca²⁺ requirement of the cultivar.
2. The long-term salt treatment with 100 mM Na⁺ with different ratios of anions (Cl⁻/SO₄²⁻) showed that Na⁺ and not Cl⁻ affected the plant growth in the second phase of the salt stress.
3. A homozygote inbred line was obtained by repeated selfings and selections which combined both Na⁺ exclusion strategies: a more effective exclusion property was achieved at the root surface as well as at the xylem parenchyma cells compared to the parent material "Pioneer 3906". The more efficient Na⁺ exclusion capability of the inbred line did not lead to Ca²⁺ or K⁺ deficiency, both in nutrient solution culture and in soil experiments. However, osmotic problems of the plants increased.
4. According to the two-phase model by Munns, in the first phase of salt stress osmotic effects are responsible for the reduction of growth. By inducing osmotic stress through polyethylenglycol (PEG 6000) or NaCl, leaf growth of the two treatments was strongly reduced in comparison to their controls.

This indicates a prevalence of osmotic stress in the first phase of growth reduction. The additional growth reduction of the fourth leaf under the NaCl treatment compared to the PEG treatment, with same water potential in nutrient solution, reveals an additional ion effect. A comparison of different salt solutions of equivalent ion concentration with the same water potential (adjusted in the salt solutions with PEG) showed an Na⁺ effect in the first phase of the salt stress. Therefore, the model of Munns (1993) must be modified for maize.

5. The hydrolytic plasmalemma H⁺-ATPase activity in leaf cells was less strongly affected through an increased Na⁺/K⁺ relationship, while the H⁺-pump activity of the ATPase was affected more strongly. The reduction in leaf elongation under NaCl stress may be caused through a diminished acidification of the cell walls by a decreased H⁺-pump activity of the ATPase.

7. Literaturverzeichnis

- Acevedo, E., T.C. Hsiao und D.W. Henderson (1971): Immediate and subsequent growth responses of maize leaves to changes in water status. *Plant Physiol.* **48**, 631-636
- Alberico, G.J. und G.R. Cramer (1993): Is the salt tolerance of maize related to sodium exclusion? I. Preliminary screening of seven cultivars. *J. Plant Nutr.* **16** (11), 2289-2303
- Anac, D., B. Okur, C. Kilic, U. Aksoy, Z. Can, S. Hepaksoy, S. Anac, M.A. Ul und F. Dorsan (1997): Potassium fertilisation to control salinization effects. In: Food Security in the WANA Region, the Essential Need for Balanced Fertilization. Johnston A.E. (Hrsg.), International Potash Institute, Basel, Schweiz, 370-377
- Amtmann, A. und D. Sanders (1999): Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Adv. Bot. Res.* **29**, 75-112
- Anthon, G.E. und R.M. Spanswick (1986): Purification and properties of the H⁺-translocating ATPase from the plasma of tomato roots. *Plant Physiol.* **81**, 1080-1085
- Arif, H. und A.D. Tomos (1993): Control of wheat leaf growth under saline conditions. In: H. Lieth, A. Al Masoom, eds. Towards the Rational Use of High Salinity Tolerant Plants. Kluwer, London 45-52
- Ashraf, M. (1994): Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **13**, 17-42
- Ashraf, M. und T. McNeilly (1990): Improvement of salt tolerance in maize through selection and breeding. *Plant Breeding* **104**, 101-107
- Atkinson, C.J., L.P. Ruiz und T.A. Mannsfield (1992): Calcium in xylem sap and the regulation of its delivery to the shoot. *J. Exp. Bot.* **43**, 1315-1324
- Awada, S., W.F. Campbell, L.M. Dudley, M.A. Khan und J.J. Jurinak (1995): Interactive effects of sodium chloride, sodium sulfate, calcium sulfate, and calcium chloride on snapbean growth, photosynthesis, and ion uptake. *J. Plant Nutr.* **18**, 889-900
- Baginski, E.S., P.P. Foa und B. Zak (1967): Determination of phosphate: study of labile organic phosphate interference. *Clin. Chim. Acta* **15**, 155-158

- Barzegar, A.R., P.N. Nelson, J.M. Oades und P. Rengasamy (1997): Organic matter, sodicity, and clay type: Influence on soil aggregation. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **61**, 1131-1137
- Baumeister, W. und W. Ernst (1978): *Mineralstoffe und Pflanzenwachstum*. Fischer, Stuttgart
- Ben Haj Salah, H. und F. Tardieu (1997): Control of leaf expansion rate of droughted maize plants under fluctuating evaporative demand. A superposition of hydraulic and chemical messages? *Plant Physiol.* **114**, 893-900
- Bennett, A.B. und R.M. Spanswick (1983): Optical measurements of ΔpH and $\Delta\Psi$ in corn root membrane vesicles: kinetic analysis of Cl^- effects on a proton-translocating ATPase. *J. Membrane Biol.* **71**, 95-107
- Bergmann, W. (1992): *Nutritional Disorders of Plants*. Gustav Fischer Verlag, Jena
- Bethmann, B., M. Thaler, W. Simons und G. Schonknecht (1995): Electrochemical potential gradients of H^+ , K^+ , Ca^{2+} and Cl^- across the tonoplast of the green alga *Eremosphaera viridis*. *Plant Physiol.* **109**, 1317-1326
- Blatt, M.R. und G. Thiel (1993): Hormonal control of ion channel gating. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 453-467
- Blum, A. (1988): *Plant Breeding for Stress Environments*. CRC Press, London
- Blumwald, E. und R.J. Poole (1986): Kinetics of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* **80**, 727-731
- Blumwald, E., G.S. Aharon und M.P. Apse (2000): Sodium transport in plant cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**, 140-151
- Boyer, J.S. (1987): Hydraulics, wall extensibility and wall proteins. Proc. of II. Annual Penn-State Symposium on Plant Physiology, American Society of Plant Physiologists, Pennsylvania State University, University Park, PA, 109-121
- 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
- Briskin, D.P. (1986): Plasma membrane H^+ -translocating ATPase: Role in potassium ion transport? *Physiol. Plant.* **68**, 159-163

- Briskin, D.P. (1990): Transport in plasma membrane vesicles – approaches and perspectives. In: The Plant Plasma Membrane. Structure, Function and Molecular Biology. (C.Larsson and I.M. Møller, Hrsg.) Springer, Berlin S. 154-181
- Burlyn, E. und M. R. Kaufmann (1973): The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol.* **51**, 914-916
- Carpita, N., D. Sabulase, D. Montezinos, D.P. Delmer (1979): Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science* **205**, 1144-1147
- Chazen, O. und P.M. Neumann (1994): Hydraulic signals from the roots and rapid cell-wall hardening in growing maize (*Zea mays* L.) leaves are primary responses to polyethylene glycol-induced water deficits. *Plant Physiol.* **104**, 1385-1392
- Chen, D.M., F.J. Keiper und L.F. De Filippis (1998): Physiological changes accompanying the induction of salt tolerance in *Eucalyptus microcorys* shoots in tissue culture. *J. Plant Physiol.* **152**, 555-563
- Cheeseman, J.M. (1988): Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol.* **87**, 547-550
- Christiansen, M.N. (1982): World environmental limitations to food and fiber culture. In: Breeding Plants for Less Favourable Environments (M.N. Christiansen and C.F. Lewis, Hrsg.). John Wiley and Sons, New York, S. 1-13
- Cowan, D.S.C., D.T. Clarkson und J.L Hall (1993): A comparison between the ATPase and proton pumping activities of plasma membranes isolated from the stele and cortex of *Zea mays* roots. *J. Exp. Bot.* **44**, 983-989
- Cram, W.J. (1973): Chloride fluxes in cells of the isolated root cortex of *Zea mays*. *Aust. J. Biol. Sci.* **26**, 757-779
- Cramer, G.R. (1994): Response of maize (*Zea mays* L.) to salinity. In: Handbook of Plant and Crop Stress (M. Pessierakli, Hrsg.). Marcel Dekker, New York, S. 449-459
- Cramer, G.R. (1997): Uptake and role of ions in salt tolerance. In: Jaiwal, P.K.; Singh, R.P.; Gulati, A. (Hrsg.): Strategies for Improving Salt Tolerance in Higher Plants, Science Publishers Inc., Enfield, 55-186
- Cramer, G.R., A. Läuchli und V.S. Polito (1985): Displacement of Ca²⁺ by Na⁺ from the plasmalemma of root cells: a primary response to salt stress? *Plant Physiol.* **79**, 207-211

- Cramer, G.R. und A. Läuchli (1986): Ion activities in solution in relation to Na⁺-Ca²⁺ interactions at the plasmalemma. *J. Exp. Bot.* **37**, 321-330
- Cramer, G.R.; Lynch J.; Läuchli, A. und E. Epstein (1987): Influx of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ into roots of salt-stressed cotton seedlings: Effects of supplemental Ca²⁺. *Plant Physiol.* **83**, 510-516
- Cramer, G.R. und D.C. Bowman (1991): Kinetics of maize leaf elongation. I. Increased yield threshold limits short-term, steady-state elongation rates after exposure to salinity, *J. Exp. Bot.* **42**, 1417-1426
- Cramer, G.R. und D.C. Bowman (1992): Kinetics of maize leaf elongation. II. Responses of a sodium excluding cultivar and a Na-including cultivar to varying Na/Ca salinity. *J. Exp. Bot.* **43**, 1857-1864
- Cramer, G.R., G.J. Alberico und C. Schmidt (1994a): Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids. *Aust. J. Plant Physiol.* **21**, 675-692
- Cramer, G.R., G.J. Alberico und C. Schmidt (1994b): Leaf expansion limits dry matter accumulation of salt-stressed maize. *Aust. J. Plant Physiol.* **21**, 663-674
- Cramer, G.R., K. Krishnan und S.Z. Abrams (1998): Kinetics of maize leaf elongation. IV. Effects of (+)- and (-)-abscisic acid. *J. Exp. Bot.* **49**, 191-198
- Dale J.E. (1988): The control of leaf expansion. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, **39**, 267-295
- Davies, J.M. (1997): Vacuolar energization: pumps, shunts, and stress. *J. Exp. Bot.* **48**, 633-641
- Davies, W.J. und J. Zhang (1991): Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Mol. Biol.* **42**, 55-57
- Davis, R.F. und A.Z. Jaworski (1979): Effects of ouabain and low temperature on the sodium efflux pump in excised corn roots. *Plant Physiol.* **63**, 940-946
- De Michelis, M.I. und R.M. Spanswick (1986): H⁺-pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiol.* **81**, 542-547
- Drew, M.C. und A. Läuchli (1985): Oxygen-dependent exclusion of sodium ions from shoots by roots of *Zea mays* L. (cv. Pioneer 3906) in relation to salinity damage. *Plant Physiol.* **79**, 171-176

- DuPont, F.M., L.L. Burke und R.M. Spanswick (1981): Characterization of a partially purified adenosine triphosphatase from a corn root plasma membrane fraction. *Plant Physiol.* **67**, 59-63
- Engels, C. und H. Marschner (1993): Influence of the form of nitrogen supply on root uptake and translocation of cations in the xylem exudate of maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* **44**, 1695-1701
- Epstein, E. und D.W. Rains (1987): Advances in salt tolerance. *Plant Soil* **99**, 17-29
- Fan, S. und T.J. Blake (1997): Comparison of polyethylene glycol 3350 induced osmotic stress and soil drying for drought simulation in three woody species. *Trees* **11**, 342-348
- Faraday, C.D. und R.M. Spanswick (1992): Maize root plasma membranes isolated by aqueous polymer two-phase partitioning: assessment of residual tonoplast ATPase and pyrophosphatase activities. *J. Exp. Bot.* **43**, 1583-1590
- Felle, H. (1991): The control of cytoplasmic levels of Ca^{2+} and H^+ in Plants. In: *Plant Signalling, Plasma Membrane and Change of State*, Penel C. & Greppin H. (eds.), Universite de Geneve, 79-104
- Fisher, J.D. und T.K. Hodges (1969): Monovalent ion stimulated adenosine triphosphatase from oat roots. *Plant Physiol.* **44**, 385-395
- Flowers, T.J. (1988): Chloride as nutrient and as an osmoticum. In: *Advances in Plant Nutrition Vol. III B*. Tinker and A. Läuchli (eds.). Praeger, New York, 55-78
- Flowers, T.J., P.F. Troke und A.R. Yeo (1977): The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **28**, 89-121
- Flowers, T.J. und A. Läuchli (1983): Sodium versus potassium: Substitution and compartmentation. In: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 15 B* (A. Läuchli und R.L Bieleski, Hrsg.). Springer, Berlin, S. 651-681
- Flowers, T.J. und A.R. Yeo (1988): Ion relations of salt tolerance. In: *Solute Transport in Plant Cells and Tissues*. (D.A. Baker und J.L. Hall, Hrsg.). Longman Scientific & Technical, S. 392-416
- Flowers, T.J. und A.R. Yeo (1995): Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Aust. J. Plant Physiol.* **22**, 875-884
- Flowers, T.J., M.L. Koyama, S.A. Flowers, C. Sudhakar, K.P. Singh und A.R. Yeo (2000): QTL: Their place in engineering tolerance of rice to salinity. *J. Exp. Bot.* **51**, 99-106

- Fooland, M.R. (1996): Genetic analysis of salt tolerance during vegetative growth in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. Plant Breed. **115**, 245-250
- Fortmeier, R. und S. Schubert (1995): Salt tolerance of maize (*Zea mays* L.): The role of sodium exclusion. Plant Cell Environ. **18**, 1041-1047
- Fortmeier, R. (1996): Einfluss der Na⁺-Salinität auf das vegetative Wachstum von Mais (*Zea mays* L.): eine zweiphasige Reaktion. Diss., Hohenheim
- Fortmeier, H. (2000): Na⁺/H⁺-Antiport in Maiswurzeln? *In vitro*-Untersuchungen zum Mechanismus des aktiven Na⁺-Transports am Plasmalemma von Maiswurzeln (*Zea mays* L.). Diss., Gießen
- Franks, F. (1975): Water, Ice and Solutions of Simple Molecules. Biosciences Division, Unilever Research Laboratory Colworth/Welwyn, Colworth House, Sharnbrook, Bedford, England
- Gallagher, S.R. und R.T. Leonard (1982): Effect of vanadate, molybdate and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots. Plant Physiol. **70**, 1335-1340
- Garcia, A., C.A. Rizzo, J. Ud-Din, S.L. Bartos, D. Senadhira, T.J. Flowers und A.R. Yeo (1997): Sodium and potassium transport to the xylem are inherited independently in rice, and the mechanism of sodium: potassium selectivity differs between rice and wheat. Plant, Cell Environ. **20**, 1167-1174
- Gerald, A. (1999): Die Bedeutung tonoplastenständiger Ca²⁺-Transporter für die zytoplasmatische Signalübertragung und Ca²⁺-Homöostase bei *Zea mays* L. -Koleoptilen. Diss., Gießen
- Gibrat, R., J.-P. Grouzis, J. Rigaud und C. Grignon (1990): Potassium stimulation of corn root plasmalemma ATPase. II. H⁺-pumping in native and reconstituted vesicles with purified ATPase. Plant Physiol. **93**, 1183-1189
- Glenn, E.P., J.J. Brown und M.J. Khan (1997): Mechanisms of salt tolerance in higher plants. In: Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants, Harwood Academic, Amsterdam, 83-110
- Greenway, H. und R. Munns (1980): Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. Annu. Rev. Plant Physiol. **31**, 149-190
- Gregorio, G.B. und D. Senadhira (1993): Genetic analysis of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. **86**, 333-338
- Grieve, C.M. und H. Fujiyama (1987): The response of two rice cultivars to external Na/Ca ratio. Plant Soil **103**, 245-250

- Hager, A.H., H. Menzel und A. Krauss (1971): Versuch und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. *Planta* **100**, 47-75
- Hajibagheri, M.A., D.M.R. Harvey und T.J. Flowers (1987): Quantitative ion distribution within root cells of salt-sensitive and salt-tolerant maize varieties. *New Phytol.* **105**, 367-379
- Hanson, J.B. (1984): The function of calcium in plant nutrition. In: *Advances in Plant Nutrition*. P.B. Tinker and A. Läuchli (eds.), Praeger, New York, 149-208
- Helal, H.M. und K. Mengel (1979): Nitrogen metabolism of young barley plants as affected by NaCl-salinity and potassium. *Plant Soil* **51**, 457-462
- Heß, D. (1991): *Pflanzenphysiologie*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Hohl, M. und P. Schopfer (1991): Water relations of growing maize coleoptiles. Comparison between mannitol and polyethylene glycol 6000 as external osmotica for adjusting turgor pressure. *Plant Physiol.* **3**, 716-722
- Hsiao, T.C. und L.K. Xu (2000): Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *J. Exp. Bot.* **51**, 1595-1616
- Hu, Y. und U. Schmidhalter (1997): Interactive effects of salinity and macronutrient level on wheat. 2. Composition. *J. Plant Nutr.* **20**, 1169-1182
- Hu, Y. und U. Schmidhalter (1998): Spatial distributions of organic ions and sugars contributing to osmotic adjustment in the elongating leaf-wheat under saline soil conditions. *Aust. J. Plant Physiol.* **25**, 591-597
- Hu, Y., K.H. Camp und U. Schmidhalter (2000): Kinetics and spatial distribution of leaf elongation of wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline soil conditions. *Int. J. Plant Sci.* **161**, 575-582
- Iyengar, E.R.R. und M.P. Reddy (1994): Crop response to salt stress: Seawater Application and prospects. In: Pessarakli, M.(Hrsg.): *Handbook of Plant and Crop Stress*, Marcel Dekker Inc., New York, 183-201
- Jackson, W.T. (1962): Use of carbowaxes (polyethylene glycols) as osmotic agents. *Plant Physiol.* **37**, 513-519
- Jacoby, B. (1994): Mechanisms involved in salt tolerance by plants. In: Pessarakli, M.(Hrsg.): *Handbook of Plant and Crop Stress*, Marcel Dekker Inc., New York, 97-123

- Jacoby, B. und J.B. Hanson (1985): Controls on $^{22}\text{Na}^+$ influx in corn roots. *Plant Physiol.* **77**, 930-934
- Johanson, F., M. Olbe, M. Sommarin und C. Larsson (1995): Brij 58, a polyethylene acyl ether, creates membrane vesicles of uniform sidedness. A new tool to obtain inside-out (cytoplasmic side-out) plasma membrane vesicles. *Plant J.* **7**, 165-173
- Kawasaki, T. und M. Moritsugu (1979): A characteristic symptom of calcium deficiency in maize and sorghum. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* **10**, 41-56
- Kawasaki, T., T. Akiba und M. Moritsugu (1983a): Effects of high concentrations of sodium chloride and polyethylene glycol on the growth and ion absorption in plants. I. Water culture experiments in a greenhouse. *Plant Soil* **75**, 75-85
- Kawasaki, T., T. Akiba und M. Moritsugu (1983b): Effects of high concentrations of sodium chloride and polyethylene glycol on the growth and ion absorption in plants. II. Multi-compartment transport box experiment with excised roots of barley. *Plant Soil* **75**, 87-93
- Kemmler, G. (1985): Einsatz von Kaliumsulfat als Spezialdünger in der Landwirtschaft. *Kali und Steinsalz*, H.(5), 167-169
- Kemp, D.R. (1980): The location and size of the extension zone of emerging wheat leaves. *New Phytol.* **84**, 729-737
- Kinzel, H. (1982): *Pflanzenökologie und Mineralstoffwechsel*. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer
- Koyro, H.-W. (1997): Ultrastructural and physiological changes in root cells of sorghum plants (*Sorghum bicolor* and *S. sudanensis* cv. Sweet Sioux) induced by NaCl. *J. Exp. Bot.* **48**, 693-706
- Kramer, D., A. Läuchli, A.R. Yeo und J. Gullasch (1977): Transfer cells in roots of *Phaseolus coccineus*: Ultrastructure and possible function in exclusion of sodium from the shoot. *Ann. Bot.* **41**, 1031-1040
- Kutschera, U. (1994): Tansley Review No. 66. The current status of the acid-growth hypothesis. *New Phytol.* **126**, 549-569
- LaHaye, P.A. und E. Epstein (1969): Salt toleration by plants: Enhancement with calcium. *Science* **166**, 395-396
- Läuchli, A. (1984): Salt exclusion: An adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. In: *Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement* (R.C. Staples and G.H. Toenniessen, Hrsg.). John Wiley and Sons, New York, S. 171-187

- Läuchli, A. (1986): Responses and adaptations of crops to salinity. *Acta Horticulturae* **190**, 243-246
- Läuchli, A. (1990): Calcium, salinity and the plasma membrane. In: R.T. Leonard and P.K. Hepler (ed.), *Calcium in Plant Growth and Development*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 26-35
- Läuchli, A. (1999): Salinity-Potassium interactions in crop plants. In: *Frontiers in Potassium Nutrition: New Perspectives on the Effects of Potassium on Physiology of Plants*. Oosterhuis D.M. und Berkowitz G.A. (Hrsg.), Potash & Phosphate Institute, Georgia USA / Potash & Phosphate Institute of Canada, Saskatoon, Canada, 71-76
- Läuchli, A. und E. Epstein (1970): Transport of potassium and rubidium in plant roots. The significance of calcium. *Plant Physiol.* **45**, 639-641
- Läuchli, A. und E. Epstein (1984): Mechanisms of salt tolerance in plants. *Calif. Agric.* **38**, 18-20
- Lawlor, D.W. (1970): Absorption of polyethylene glycols by plants and their effects on plant growth. *New Phytol.* **69**, 501-513
- Leigh, R.A. und R.G. Wyn Jones (1984): A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytol.* **97**, 1-13
- Leigh, R.A., M. Chater, R. Storey und A.E. Johnston (1986): Accumulation and subcellular distribution of cations in relation to the growth of potassium-deficient barley. *Plant Cell Environ.* **9**, 595-604
- Lessani, H. und H. Marschner (1978): Relation between salt tolerance and long distance transport of sodium and chloride in various crop species. *Aust. J. Plant Physiol.* **14**, 171-180
- Lewis, O.A.M., E.O. Leidi und S.H. Lips (1989): Effect of nitrogen source on growth response to salinity stress in maize and wheat. *New Phytol.* **111**, 155-160
- Lohaus, G., M. Hussmann, K. Penewiss, H. Schneider, J-J. Zhu und B. Sattelmacher (2000): Solute balance of a maize (*Zea mays*) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *J. Exp. Bot.* **51**, 1721-1732
- Lynch, J., G.R. Cramer und A. Läuchli (1987): Salinity reduces membrane-associated calcium in corn root protoplasts. *Plant Physiol.* **83**, 390-394
- Maas, E.V. (1984): Crop tolerance. *Calif. Agric.* **38**, 20-21

- Maas, E.V., G.J. Hoffman, G.D. Chaba, J.A. Poss und M.C. Shanon (1983): Salt sensitivity of corn at various growth stages. *Irrig. Sci.* **4**, 45-57
- Maas, E.V. und C.M. Grieve (1987): Sodium-induced calcium deficiency in salt-stressed corn. *Plant Cell Environ.* **10**, 559-564
- Maas, E.V. und S.R. Grattan (1999): Crop yields as affected by salinity. In *Agricultural Drainage*, Skaggs RW, van Schilfgaarde J. (eds). ASA-CSSA-SSSA: Madison, WI; 55-108
- Marin, J., A. Encabo, A. Briones, E.C. Garcia-Cohen und M.J. Alonso: Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: Calcium pumps. *Life Sci.* **64**, 279-303
- Marschner, H. (1986): *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London
- Marschner, H. (1995): *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2. Aufl., Academic Press, London
- Marschner, H. und H. Ossenberg-Neuhaus (1976): Langstreckentransport von Natrium in Bohnenpflanzen. *Z. Pflanzenern. Bodenk.* **2**, 129-142
- Matthuis, F.J.M. und A. Amtmann (1999): K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: The basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Ann. Bot.* **84**, 123-133
- McCree, K.J. (1986): Measuring of whole plant daily carbon balance. *Photosynthetica* **20**, 82-93
- Mengel, K. (1991): *Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze*. 7. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Jena
- Mengel, K. und E.A. Kirkby (2001): *Principles of Plant Nutrition*. 5. Aufl., Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London
- Mexal, J., J.T. Fisher, J. Osteryoung, C.C.P. Reid (1975): Oxygen availability in polyethylene glycol solutions and its implications in plant-water relations. *Plant Physiol.* **55**, 20-24
- Mladenova, Y.I. (1990): Influence of salt stress on primary metabolism of *Zea mays* L. seedlings of model genotypes. *Plant Soil* **123**, 217-222
- Money, N.P. (1989): Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols. Relationship between molecular weight and vapor pressure deficit. *Plant Physiol.* **91**, 766-769

- Moore, C.V. (1984): An economic analysis of Plant Improvement Strategies for saline conditions. In: Salinity Tolerance in Plants – Strategies for Crop Improvement (R.C. Staples and G.H. Toenniessen, Hrsg.). John Wiley and Sons, New York, S. 381-391
- Mühling, K.H. und A. Läuchli (2002): Effect of salt stress on growth and cation compartmentation in leaves of two plant species differing in salt tolerance. *J. Plant Physiol.* **159**, 137-146
- Munns, R. (1993): Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* **16**, 15-24
- Munns, R. (2002): Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* **25**, 239-250
- Munns, R. und A. Termaat (1986): Whole plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* **13**, 143-160
- Munns, R. und R.E. Sharp (1993): Involvement of abscisic acid in controlling plant growth in soils of low water potential. *Aust. J. Plant Physiol.* **20**, 425-437
- Munns, R., D.P. Schachtman und A.G. Condon (1995): The significance of a 2-phase growth-response to salinity in wheat and barley. *Aust. J. Plant Physiol.* **22**, 561-569
- Munns, R. und G.R. Cramer (1996): Is coordination of leaf and root growth mediated by abscisic acid? *Plant Soil* **185**, 33-49
- Munns, R., J.B. Passioura, J. Guo, O. Chazen und G.R. Cramer (2000): Water relations and leaf expansion: importance of time scale. *J. Exp. Bot.* **51**, 1495-1504
- Neumann, P.M. (1993): Rapid and reversible modifications of extension capacity of cell walls in elongating maize leaf tissues responding to root addition and removal of NaCl. *Plant Cell Environ.* **16**, 1107-1114
- Neumann, P. (1997): Salinity resistance and plant growth revisited. *Plant Cell Environ.* **20**, 1193-1198
- Oertli, J.J. (1968): Extracellular salt accumulation, a possible mechanism of salt injury in plants. *Agrochimica* **12**, 461-469
- Oertli, J.J. (1987): Measurement of the resistance of cell walls to collapse during moisture stress. Utah State University
- O'Neill, S.D. und R.M. Spanswick (1984): Effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of red beet and corn. *Plant Physiol.* **75**, 586-591

- Ordon, F. und W. Friedt (1998): Von Mendel zum Gentransfer: Grundlagen und aktuelle Methoden der Pflanzenzüchtung, Th. Mann Verlag, Gelsenkirchen
- Parmar, M.T. und R.P. Moore (1968): Carbowax 6000, mannitol, and sodium chloride for stimulating drought conditions in germination studies of corn (*Zea mays* L.) of strong and weak vigor. *Agron. J.* **60**, 192-195
- Pérez-Alfocea, F., M.T. Estañ, M. Caro und G. Guerrier (1993): Osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* under NaCl and polyethylene glycol 6000 iso-osmotic stresses. *Physiol. Plant.* **87**, 493-498
- Perlin, S.D. und R.M. Spanswick (1981): Characterization of ATPase activity associated with corn leaf plasma membranes. *Plant Physiol.* **68**, 521-526
- Peterson, T.A., R.H. Nieman und R.A. Clark (1987): Nucleotide metabolism in salt-stressed *Zea mays* L. root tips. I Adenine and uridine nucleotides. *Plant Physiol.* **85**, 978-983
- Peterson, C.A. und D.E. Enstone (1996): Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots. *Physiol. Plant.* **97**, 592-598
- Pfeiffer, W. und A. Hager (1993): A Ca²⁺-ATPase and a Mg²⁺/H⁺-antiporter are present on tonoplast membranes from roots of *Zea mays* L. *Planta* **191**, 377-385
- Plies-Balzer, E. (1993): Ertragsleistung, N₂-Fixierung und osmotische Anpassung an Wasserstreß bei *Vicia faba* L. Wissenschaftlicher Fachverlag, Gießen
- Poljakoff-Mayber, A. und H.R. Lerner (1994): Plants in saline environments. In: Pessarakli, M.(Hrsg.): Handbook of Plant and Crop Stress, Marcell Dekker Inc., New York, 65-96
- Rathert, G. (1983): Effects of high salinity stress on mineral and carbohydrate metabolism of two cotton varieties. *Plant Soil* **73**, 247-256
- Rausch, T., M. Kirsch, R. Löw, A. Lehr, R. Viereck und R. Zhigang (1996): Salt stress responses of higher plants: the role of proton pumps and Na⁺/K⁺-Antiporters. *J. Plant Physiol.* **148**, 425-433
- Rengel, Z. (1992): The role of calcium in salt toxicity. *Plant Cell Environ.* **15**, 625-632
- Sandelius, A.S. und D.J. Morré (1990): Plasma membrane isolation. In: The Plant Plasma Membran. Structure Function and Molecular Biology. (C. Larsson and I.M. Møller, Hrsg.) Springer, Berlin S. 44-75

- Sandstrom, R.P., A.H. deBoer, T.L. Lomax und R.E. Cleland (1987): Latency of plasma membrane H⁺-ATPase in vesicles isolated by aqueous phase partitioning – increased substrate accessibility or enzyme activation. *Plant Physiol.* **85**, 693-698
- Schachtman, D.P. und R. Munns (1992): Sodium accumulation in *Triticum* species differ in salt tolerance. *Aust. J. Plant Physiol.* **19**, 331-340
- Schierholt, A.S. (1995): Untersuchungen zum Vererbungsgang zweier Natrium-Exklusionsmechanismen bei Mais (*Zea mays* L.). Diplomarbeit aus dem Institut für Pflanzenernährung der Universität Hohenheim
- Schleiff, U. und A. Finck (1976): Untersuchungen zur Bedeutung des Ernährungszustandes von Kulturpflanzen für ihre Salztoleranz. *Z. Pflanzenern. Bodenk.* **138**, 281-292
- Schmidhalter, U., Z. Burucs und K.H. Camp (1998a): Sensitivity of root and leaf water status in maize (*Zea mays*) subjected to mild soil dryness. *Aust. J. Plant Physiol.* **25**, 307-316
- Schmidhalter, U., M. Evéquo, K.H. Camp und C. Studer (1998b): Sequence of drought response of maize seedling in drying soil. *Physiol. Plant.* **104**, 159-168
- Schroeder, J.I., J.M. Ward und W. Gassmann (1994): Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K⁺ channels in higher plants: biophysical implications for K⁺ uptake. *Annu. Rev. Biophys. Struct.* **23**, 441-471
- Schubert, S. (1990): Natriumexklusion von Maiswurzeln und ihre Bedeutung für die Salzresistenz der Pflanze. Habil. Fachber. Ernährungswiss. der Justus-Liebig-Universität, Gießen
- Schubert, S. (1999): Anpassung von Mais (*Zea mays* L.) an Bodensalinität: Strategien und Konzepte. In: Stoffumsatz im wurzelnahen Raum. Ökophysiologie des Wurzelraumes. Hrsg. W. Merbach, L. Wittenmayer und J. Augustin. B.G. Teubner Stuttgart, Leipzig S. 74-79
- Schubert, S. und A. Läuchli (1986): Na⁺ exclusion, H⁺ release, and growth of two different maize cultivars under NaCl salinity. *J. Plant Physiol.* **126**, 145-154
- Schubert, S. und A. Läuchli (1988): Metabolic dependence of Na⁺ efflux from roots of intact maize seedlings. *J. Plant Physiol.* **133**, 193-198
- Schubert, S. und A. Läuchli (1990): Sodium exclusion mechanisms at the root surface of two maize cultivars. *Plant Soil* **123**, 205-209

- Serrano, R. (1996): Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytology* **165**, 1-52
- Serrano, R. und R. Gaxiola (1994): Microbial models and salt stress tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **13**, 121-138
- Serrano, R., J.M. Mulet, G. Rios, J.A. Marquez, I.F. de Larrinoa, M.P. Leube, I. Mendizabal, A. Pascual-Ahuir, M. Proft, R. Ros und C. Montesinos (1999): A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J. Exp. Bot.* **50**, 1023-1036
- Shannon, M.C. (1984): Breeding, selection and the genetics of salt tolerance. In: *Salinity Tolerance in Plants – Strategies for Crop Improvement* (R.C. Staples and G.H. Toenniessen, Hrsg.) John Wiley and Sons, New York, S. 231-254
- Shannon, M.C. (1997): Genetics of salt tolerance in higher plants. In: Jaiwal, P.K.; Singh, R.P.; Gulati, A. (Hrsg.): *Strategies for Improving Salt Tolerance in Higher Plants*, Science Publishers Inc., Enfield, 265-289
- Shone, M.G.T., G.T. Clarkson und J. Sanderson (1969): The absorption and translocation of sodium by maize seedlings. *Planta* **86**, 301-314
- Short, D.C. und T.D. Colmer (1999): Salt tolerance in the halophyte *Halosarcia pergranulata* subsp. *pergranulata*. *Ann. Bot.* **83**, 207-213
- Sitte, P., H. Ziegler, F. Ehrenhofer, und A. Bresinsky (1998): *Strasburger-Lehrbuch der Botanik*, 34. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Smart, B.L., F. Vojdani, M. Maeshima und T.A. Wilkins (1998): Genes involved in osmoregulation during turgor-driven cell expansion of developing cotton fibers are differentially regulated. *Plant Physiol.* **116**, 1539-1549
- Steuter, A.A., A. Mozafar und J.R. Goodin (1981): Water potential of aqueous polyethylene glycol. *Plant Physiol.* **67**, 64-67
- Storey, R. und R.G. Wyn Jones (1978): Salt stress and comparative physiology in the Gramineae. I. Ion relations of two salt- and water-stressed barley cultivars, California Mariout and Arimar. *Aust. J. Plant Physiol.* **5**, 801-816
- Subbarao, G.V. und C. Johansen (1994): Strategies and scope for improving salinity tolerance in crop plants. In: Pessierakli, M. (Hrsg.): *Handbook of Plant and Crop Stress*, Marcell Dekker Inc., New York, 559-579
- Sze, H. (1985): H⁺-translocating ATPases. Advances using membrane vesicles. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**, 175-208

- Taiz, L. (1984): Plant cell expansion: Regulation of cell wall mechanical properties. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 585-657
- Tardieu, F., M. Reymond, P. Hamard, C. Granier und B. Muller (2000): Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves: a synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature. *J. Exp. Bot.* **51**, 1505-1514
- Toenniessen, G.H. (1984): Review of the world food situation and the role of salt tolerant plants. In: *Salinity Tolerance in Plants – Strategies for Crop Improvement* (R.C. Staples and G.H. Toenniessen, Hrsg.). John Wiley and Sons, New York, S. 399-415
- Verslues, P.E., E.S. Ober und R.E. Sharp (1998): Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. *Plant Physiol.* **111**, 1403-1412
- Wainwright, S.J. (1980): Plants in relation to salinity. In: *Advances in Botanical Research*, Vol. 8. Edit. H.W. Woolhouse. Acad. Press. S. 221-261
- White, J.P. und M.R. Broadley (2001): Chloride in Soils and its Uptake and Movement within the Plant: A Review *Ann. Bot.* **88**, 967-988
- Widell, S. und C. Larsson (1990): A critical evaluation of markers used in plasma membrane purification. In: *The Plant Plasma Membrane* (C. Larsson, I.M. Møller, eds.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 16-43
- Wolf, O., W.D. Jeschcke und W. Hartung (1990): Long distance transport of abscisic acid in NaCl-treated intact plants of *Lupinus albus*. *J. Exp. Bot.* **41**, 1133-1141
- Yadav, R., T.J. Flowers und A.R. Yeo (1996): The involvement of the transpirational bypass flow in sodium uptake by high- and low-sodium-transporting lines of rice developed through intravarietal selection. *Plant Cell Environ.* **19**, 329-336
- Yan, F., R. Feuerle, S. Schäffer, H. Fortmeier und S. Schubert (1998): Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH. *Plant Physiol.* **117**, 311-319
- Yan, F., Y. Zhu, C. Müller, C. Zörb und S. Schubert (2002): Adaptation of H⁺-pumping and plasma membrane H⁺ ATPase activity in proteoid roots of white lupine under phosphate deficiency. *Plant Physiol.* **129**, 50-63
- Yeo, A. (1998): Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.* **49**, 915-929

- Yeo, A.R., D. Kramer und A. Läuchli (1977): Ion distribution in salt-stressed mature *Zea mays* roots in relation to ultrastructure and retention of sodium. *J. Exp. Bot.* **28**, 17-29
- Yeo, A.R. und T.J. Flowers (1983): Varietal differences in the toxicity of sodium ions in rice leaves. *Physiol. Plant.* **59**, 189-195
- Yeo, A.R. und T.J. Flowers (1986): Salinity resistance in rice and a pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. *Aust. J. Plant Physiol.* **13**, 161-173
- Yeo, A.R., M.E. Yeo und T.J. Flowers (1987): The contribution of an apoplastic pathway to sodium uptake by rice roots in saline conditions. *J. Exp. Bot.* **38**, 1141-1153
- Yeo, A.R., K.S. Lee, P. Iazard, P.J. Boursier und T.J. Flowers (1991): Short- and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* **42**, 881-889
- Yoshida, S., T. Kawata, M. Uemura und T. Niki (1986): Properties of Plasma Membrane Isolated from Chilling-Sensitive Etiolated Seedlings of *Vigna radiata* L. *Plant Physiol.* **80**, 152-160
- Zhu, J.K. (2001): Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* **6**, 66-71
- Zörb, C., J. Wiese und S. Schubert (2001): Molecular insights into maize Na⁺/H⁺ antiport. In: Horst, W.J., et al. (eds.): *Plant Nutrition—Food Security and Sustainability of Agro-Ecosystems*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 58-59

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Sven Schubert für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas, für das mir entgegengebrachte Vertrauen, sowie die jederzeit gewährte Diskussionsbereitschaft, die mich in fachlicher als auch in persönlicher Hinsicht förderte.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Friedt danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferates und die wertvollen Empfehlungen.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Christian Zörb für seine Ratschläge und Anregungen, sowie die kritische Durchsicht während der Schreibphase dieser Arbeit. Ebenfalls ein ganz herzlicher Dank gebührt auch Dr. Feng Yan für seine stetige Bereitschaft, hilfreichen Ratschläge und jederzeit gewährte freundliche Unterstützung. Gedankt sei auch Herrn Dr. W. Koyro für die Hilfe bei der Präparation der Blattquerschnitte im Strahlencentrum.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für das freundliche Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit, insbesondere:

- Herrn Prof. Dr. D. Steffens und Herrn Dr. M. Qadir für ihre motivierende Unterstützung, Hilfsbereitschaft und netten Gespräche aller Art.
- Herrn Alffen und Herrn Wilming für die Hilfe bei den Versuchen, sowie hilfreichen praktischen Ideen, Frau Tripp und Frau Rödiger für ihre unermüdliche Hilfe und Geduld bei den Ernten.
- Herrn R. Pfanschilling und Frau A. Weber bei analytischen, technischen und sonstigen Problemen.
- Tina Volk und Yiyong Zhu für das Anlernen der Membranisolierung und photometrischen Messungen.
- Dr. Edgar Peiter, Dr. Heike Rogalla, Dr. Achim Wiese und Caroline Müller für die geduldige Beantwortung meiner Fragen.
- Cristina Slabu für die Gespräche, die uns beiderseitig beflügelten.
- Christina Plachta und Frau S. Beckermann für die stets freundliche Unterstützung aus dem Sekretariat.

Dem türkischen Erziehungsministerium (MEB) gilt mein Dank für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Ein Dankeschön ganz besonderer Art geht an Claudia, Andreas und Constanze für die jederzeit dargebrachte Unterstützung, Ermutigung und Ablenkung während meiner Durststrecke.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich während all der Jahre in Deutschland mit viel Geduld begleitet und unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ali Sümer
Geburtsdatum: 30.04.1970
Geburtsort: Göppingen / Baden-Württemberg
Familienstand: ledig

Schulbildung

1976 – 1980 Besuch der Steingarten Grundschule in Donzdorf
1981 – 1987 Gymnasium (Aydın Lisesi) in Aydın, Türkei
1988 Abitur

Studium und Berufsausbildung

1988 – 1992 Studium der Agrarwissenschaften im Fachbereich Bodenkunde und Pflanzenernährung an der Ege Universität in Izmir, Türkei
7 - 9/1991 Praktikum am Institut für Bodenkunde der Justus-Liebig-Universität, Gießen
1993 – 1996 Magisterarbeit im Fachbereich Pflanzenernährung an der Ege Universität, Izmir. Abschluß: Master of Science
1994 - 1995 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Bodenkunde und Pflanzenernährung der Ege Universität, Izmir
1995 - 1996 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Bodenkunde und Pflanzenernährung der Adnan Menderes Universität, Aydın
2 – 7/1996 Deutschkurs am Carl Duisberg Centrum (CDC) in Radolfzell am Bodensee
seit 9/1997 Beginn der Erstellung der vorliegenden Dissertation am Institut für Pflanzenernährung der Justus-Liebig-Universität, Gießen