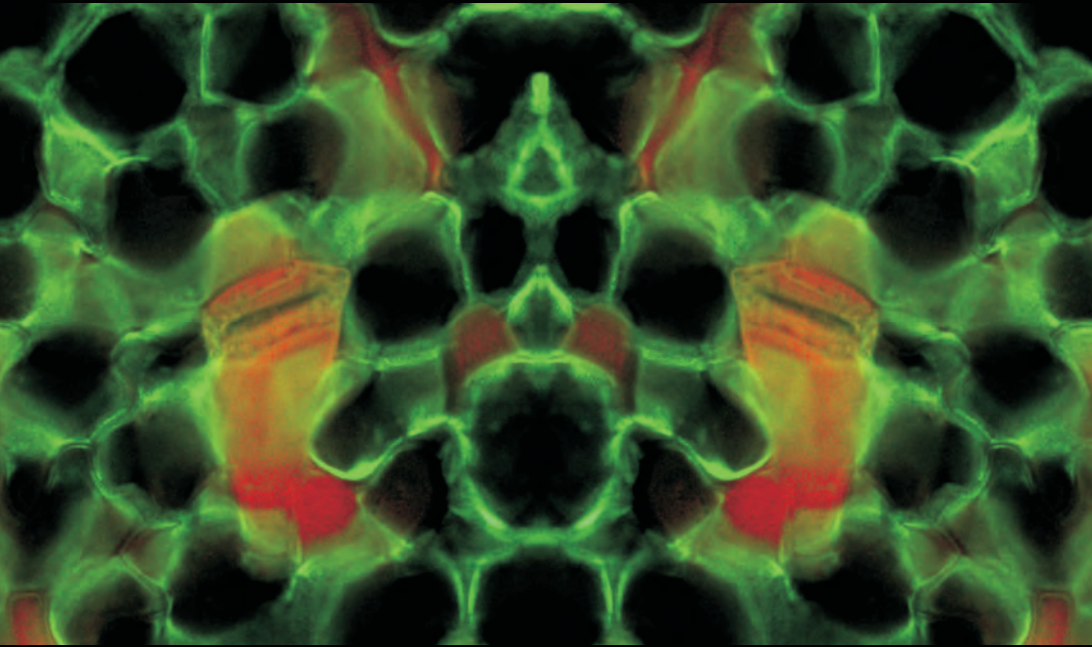


ZUSAMMENHANG VON WACHSTUMSPROZESSEN
UND APOPLASTISCHEM PH-WERT IN BLÄTTERN
VON *VICIA FABA* UNTER SALZSTRESS

THORSTEN KRANZ



DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Agrarwissenschaften
beim Fachbereich 09

- Agrarwissenschaften, Ökotropologie und Umweltmanagement -
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Pflanzenernährung

der Justus-Liebig-Universität Giessen

Prof. Dr. K. H. Mühling

**Zusammenhang von Wachstumsprozessen
und apoplastischem pH-Wert in Blättern
von *Vicia faba* unter Salzstress**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften

beim Fachbereich 09

- Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und Umweltmanagement -

der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Dipl.-Ing. agr. Thorsten Kranz

aus Marburg

Gießen, im Februar 2009

Tag der Disputation: 13.07.2009

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Herr Prof. Dr. S. Schubert
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. K. H. Mühling
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. K.-H. Kogel
Prüferin: Frau Prof. Dr. S. Schnell
Prüfer: Herr Prof. Dr. B. Honermeier

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Salzstress als weltweites Problem	1
1.2	Wachstumshemmungen unter Salzstress	2
1.3	Bedeutung des Apoplasten für das pflanzliche Wachstum	3
1.4	Problemstellung	4
1.5	Zielsetzung	7
2	Material und Methoden	8
2.1	Pflanzenanzucht.....	8
2.2	Erfassung von Wachstumsparametern.....	10
2.2.1	Frisch- und Trockenmasse.....	10
2.2.2	Blatt- und Sprosslänge.....	10
2.2.3	Blattfläche	11
2.3	Wachstumsbestimmung mit Hilfe der digitalen.....	11
	Bildsequenzverarbeitung	11
2.3.1	Messprinzip.....	11
2.3.2	Fixierung der Blätter in der optischen Ebene	12
2.3.3	Aufbau des Bildaufnahmesystems	13
2.3.4	Bildaufnahme und Auswertung	13
2.4	Kationenanalyse.....	14
2.4.1	Gewinnung von Zellsaft und apoplastischer Waschflüssigkeit	14
2.4.2	Kationenbestimmung in der Gesamtmasse von Blatt, Spross und Wurzel, sowie in der apoplastischen Waschflüssigkeit und Zellsaft	15
2.5	pH-Messung mit der bildverarbeitenden Fluoreszenz-mikroskopie	16
2.5.1	Messprinzip.....	16
2.5.2	Farbstoffbeladung der Blätter.....	16
2.5.3	Kalibrierung und pH-Messung im Blattapoplasten	19
2.6	pH-Messung im Blattapoplasten mit ionensensitiven	20
	Mikroelektroden.....	20
2.6.1	Messprinzip.....	20
2.6.2	Herstellung der Elektroden.....	21

2.6.3	Messplatzaufbau	22
2.6.4	Kalibrierung und Messung	22
2.7	Statistische Auswertung	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Wachstumsreduktion von <i>Vicia faba</i> unter Salzstress	24
3.1.1	Frisch- und Trockenmasse von Spross und Wurzel.....	24
3.1.2	Einfluss von Salzstress auf die Sprosslänge.....	25
3.1.3	Einfluss von Salzstress auf Blattlängenzuwachs und Blattfläche	26
3.2	Kationenverhältnisse von <i>Vicia faba</i> unter Salzstress	29
3.2.1	Ionenverhältnisse in Blatt, Spross und Wurzel.....	29
3.2.2	Ionenverhältnisse in der apoplastischen Waschflüssigkeit und im	31
	Zellsaft vom Blatt.....	31
3.3	Änderungen des pH-Wertes im Blattapoplasten von <i>Vicia faba</i> unter	
	Salzstress	33
3.3.1	Bildverarbeitende Fluoreszenzmikroskopie.....	33
3.3.2	Ionenselektive Mikroelektroden.....	37
3.4	Zusammenhang von Wachstumsprozessen und pH-Wert im	39
	Blattapoplasten	39
3.4.1	Zusammenhang von apoplastischem pH-Wert und	
	Wachstumsaktivität in Abhängigkeit der Blattregion.....	39
3.4.2	Einfluss der Tageszeit auf die relative Blattwachstumsrate und.....	40
	den pH-Wert im Blattapoplasten.....	40
3.4.3	Einfluss des Blattalters auf die relative Blattwachstumsrate und.....	42
	den pH-Wert im Blattapoplasten.....	42
4	Diskussion	44
4.1	Methodische Ansätze zur quantitativen Bestimmung des	44
	apoplastischen pH-Wertes in Blättern.....	44
4.1.1	Eignung der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie.....	44
4.1.2	Beurteilung der eingesetzten pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffe.....	48
4.1.3	Einschätzung der Eignung der pH-Messung im Blattapoplasten mit	
	Hilfe pH-sensitiver Mikroelektroden	49

4.2	Einfluss von Salzstress auf die subzellulären Ionenverhältnisse in Blättern von <i>Vicia faba</i>.....	51
4.2.1	Ionenverhältnisse im Gesamtblatt	51
4.2.2	Ionenverhältnisse im Apoplasten und im Symplasten.....	53
4.3	Beurteilung der Wachstumshemmungen von <i>Vicia faba</i> unter Salzstress	58
4.4	Einfluss von Salzstress auf den pH-Wert im Blattapoplasten.....	64
4.4.1	Bewertung der Ergebnisse des apoplastischen pH-Wertes	64
4.4.2	Änderung des pH-Wertes im Blattapoplasten von <i>Vicia faba</i> unter Salzstress.....	66
4.4.3	Gründe für die Alkalisierung im Blattapoplasten unter Salzstress	68
4.4.4	Signalübertragung bei Salzstress.....	70
4.5	Zusammenhang von Blattwachstum und pH-Wert im Blattapoplasten	74
4.5.1	Beurteilung der digitalen Bildsequenzverarbeitung zur Wachstumsbestimmung	74
4.5.2	Wachstumsmuster von <i>Vicia faba</i> im Tagesgang	75
4.5.3	Veränderung des apoplastischen pH-Wertes im Tagesgang	76
4.5.4	Zusammenhang von Blattwachstum und pH-Wert im Blattapoplasten	77
4.6	Ausblick	79
5	Zusammenfassung	80
6	Summary	82
7	Literatur.....	84
8	Anhang	101

1 Einleitung

1.1 Salzstress als weltweites Problem

Mindestens 20 % aller bewässerten Nutzflächen sind von der Problematik des Salzstress' betroffen (Flowers und Yeo, 1995; 2002; FAO, 2006). Es wird geschätzt, dass weltweit etwa ein Drittel der Nahrungsmittel auf bewässerten Nutzflächen produziert werden (Munns, 2002). Angesichts des aktuellen Weltbevölkerungswachstums ist davon auszugehen, dass der Anteil der bewässerten Flächen erhöht wird, um die Nahrungsmittelproduktion entsprechend zu sichern (Flowers, 2004). Aufgrund der Ausdehnung der landwirtschaftlichen Bewässerung und unzureichender Bewässerungstechniken (Tester und Davenport, 2003) ist mit einer Vergrößerung der salzbelasteten Nutzflächen zu rechnen (Flowers, 2004; Wang *et al.*, 2004). Salzbelastete Böden gibt es in mehr als 100 Ländern und keine Klimazone ist frei von Salinität. Ein besonderes Augenmerk sollte auf die ariden und semiariden Gebiete gerichtet werden, da dort die Bewässerung oft Grundlage für die landwirtschaftliche Pflanzenproduktion ist (Yeo, 1999; Rengasamy, 2006). Das dominierende Salz in salinen Böden ist meist NaCl (Flowers *et al.*, 1977). Eine erhöhte Natriumsättigung führt zur Alkalisierung der Böden, die zur Verschlämmung und Dichtlagerung neigen, was die Durchwurzelbarkeit und Nährstoffaufnahme verschlechtert (Schachtschabel *et al.*, 1998). Viele Forschungsarbeiten befassen sich mit der Aufgabe, Kulturpflanzen ertragreich auf Böden mit höheren Salzkonzentrationen anzubauen. Eine Verbesserung der Bewässerungsmaßnahmen ist zwingend notwendig, da die Grenzen für die Keimung und das Auflaufen von Saatgut in der Regel bei 15-20 mS/cm liegen (Larcher, 2001). Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Nahrungsmittelproduktion trotz Salinität wäre die Entwicklung von salzresistenten Kulturpflanzen, da die meisten Nutzpflanzen nicht salzresistent sind (Flowers, 2004).

1.2 Wachstumshemmungen unter Salzstress

Die Reaktion von Pflanzen auf Salzstress sind sehr vielseitig (Xiong und Ishitani, 2006). Unter Salzstress wird ebenso wie unter Trockenstress die Wachstumsrate von Pflanzen vermindert und der pflanzliche Stoffwechsel erfährt entscheidende Veränderungen (Munns, 2002). Besonders wird das Wachstum vom Spross unter salinen Bedingungen gehemmt (Cordovilla *et al.*, 1994; Munns, 2002). Auch bei der Wurzel wurden Wachstumsinderungen unter Salzeinwirkung nachgewiesen, aber die Wurzel ist im Vergleich zum Spross eher in der Lage das Überangebot an Salzen durch Ausscheidung in den Boden oder Transport in den Spross zu überwinden, um so eine Wachstumsdepression langfristig zu verhindern bzw. zu reduzieren (Rodriguez *et al.*, 1997; Cicek und Cakirlar, 2002; Munns, 2002). Somit lässt sich die besondere Empfindlichkeit des Sprosses gegenüber Salzstress erklären. Die Biomasseproduktion von Pflanzen ist bei den meisten Pflanzen eng mit der gesamten Blattfläche verbunden (Van der Werf, 1996). Die Forschung über den Einfluss von äußeren Faktoren auf Blattwachstumsprozesse ist ein wichtiger Schritt, um mit neuen Züchtungsstrategien die landwirtschaftlichen Erträge zu sichern und zu verbessern (Matsubara *et al.*, 2006). Das Pflanzenwachstum unter Salzstress lässt sich nach Munns (1993) in zwei Phasen unterteilen. In der ersten Phase von Salzstress wird das pflanzliche Wachstum durch die osmotische Wirkung des Salzes beeinträchtigt. Die erste Phase kann mehrere Wochen andauern. Durch einen erhöhten Salzanteil im Boden ist das Wasser in salinen Böden osmotisch stark gebunden und somit schlecht pflanzenverfügbar (Larcher, 2001). Die Folgen der Wachstumshemmung in der ersten Phase von Salzstress sind daher identisch mit denen unter Trockenstress (Munns, 2002). Viele Pflanzen reichern daher osmotisch aktive Substanzen im Spross an, um dem Außenmedium osmotisch gebundenes Wasser zu entziehen (Morgan, 1984; Hasegawa *et al.*, 2000). In der von Munns (1993) beschriebenen zweiten Phase des Salzstress wird die Wachstumsreduktion mit einer Ionentoxizität von Natrium- und Chloridionen erklärt (Greenway und Munns, 1980; Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001). Es kommt hierbei zur Anreicherungen dieser Ionen im Spross. Natrium ist dabei als Hauptursache der ionenspezifischen Toxizität in der zweiten Salzstressphase zu nennen (Amtmann und Sanders, 1999;

Tester und Davenport, 2003). Nach dem Auftreten spezifischer Salzstresssymptome wie Chlorosen und Nekrosen an älteren Blättern (Mengel, 1991) kommt es schließlich zum Absterben der Blätter (Greenway und Munns, 1980; Yeo, 1998).

1.3 Bedeutung des Apoplasten für das pflanzliche Wachstum

Der Apoplast beinhaltet den gesamten Bereich der Zellwände einschließlich des luft- und wassergefüllten Interzellularraumes und des Xylems. Der Apoplast besteht somit aus einem zusammenhängenden Raum außerhalb des Plasmalemmas der Zellen (Mohr und Schopfer, 1992; Canny, 1995). Der Apoplast hat eine wichtige Bedeutung für die physiologischen Vorgänge in der Pflanze (Grignon und Sentenac, 1991; Sakurai, 1998). Der Apoplast dient als Nährstoffdepot und über ihn wird der Stoffaustausch mit der Atmosphäre ermöglicht. Zudem wird über den Apoplasten der Wasser- und Nährstofftransport durchgeführt. Des Weiteren werden die Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktionen, sowie die Weiterleitung interzellulärer Signale, über den Apoplasten geregelt (Sattelmacher, 2000). Die über die Plasmalemma-H⁺-ATPase durchgeführte Protonenabgabe an den Apoplasten ist die treibende Kraft für die Nährstoffaufnahme. Das so am Plasmalemma erzeugte elektrochemische Potenzial erlaubt unter anderem Kationen dem elektrochemischen Gradienten passiv zu folgen, während Anionen zusammen mit Protonen im Cotransport das Plasmalemma passieren (Mohr und Schopfer, 1992; Sze *et al.*, 1999).

Eine besondere Bedeutung für pflanzliche Wachstumsprozesse sollte der Zellwand zugeschrieben werden, da diese bei fast allen wachstumsgebundenen Prozessen mit eingebunden ist (Sakurai, 1998). Bei wachsenden Blättern von dikotylen Pflanzen besteht die Trockenmasse der Zellwand zu etwa 30% aus Cellulose, 30% Hemicellulose, 35% Pektin und 1-5% aus Strukturproteinen. Da die Gesamtmasse der Zellwand aus etwa 75% aus Wasser besteht, ist sie mit einem sehr dichten Gel zu vergleichen (Cosgrove, 1997). Ihre physikalischen Eigenschaften hängen von der strukturellen Anordnung der Cellulosefibrillen ab (Chesson *et al.*, 1997). Die Wachstumsregulation der Zellwand im Apoplasten wird nach Sakurai (1998) in vier Phasen unterteilt:

1. Auxin-induzierte Wachstumsstimulation durch Abbau von Polysacchariden
2. Gibberellin-induziertes Wachstum durch Synthese von Zellwandpolysacchariden
3. Richtungsanordnung der Mikrofibrillen
4. Einstellung des Wachstums und Bildung einer Vernetzung aus Phenylpropanoiden, Zellwandproteinen, Polysacchariden und Cellulose

Wachstum wird dabei letztlich durch ein Zusammenspiel vom wachstumswirksamen Turgor, dem internen Druck der pflanzlichen Zelle, und der Dehnbarkeit (Extensibilität) der Zellwände ermöglicht (Lockhart, 1965; Cosgrove, 1986).

1.4 Problemstellung

Ein langfristiges Ziel in der Forschung ist die Entwicklung salzresistenter Pflanzen, um Kulturpflanzen auch auf Böden mit höheren Salzkonzentrationen ertragreich anbauen zu können. Für diesen Prozess muss man die genauen Ursachen der Ertragsreduktion bei salzsensitiven Pflanzen durch Salzstress kennen. Die physiologischen Mechanismen der Hemmung des Blattwachstums unter Salzstress sind allerdings noch nicht aufgeklärt (Cramer *et al.*, 2001). Wie bereits erwähnt, hängt pflanzliches Wachstum vom Zellturgor und der Extensibilität der Zellwände ab (Lockhart, 1965; Cosgrove, 1986). Ein verringerter Turgor ist unter salinen Bedingungen nicht der Grund für die Verminderung der Zellstreckung, denn meist tritt bei Pflanzen unter Salinität ein gleicher oder sogar höherer Turgordruck im Vergleich zu nicht salinen Bedingungen auf (Schubert, 1990; Yang *et al.*, 1990; Pritchard *et al.*, 1991; Munoz *et al.*, 1996; Cramer *et al.*, 1998). Gleiches wurde für Trockenstress berichtet (Passioura, 1988; Gowing *et al.*, 1990; Puliga *et al.*, 1996). Folglich wäre zu vermuten, dass durch Salzstress eine Veränderung der Zellwandextensibilität hervorgerufen wird, wodurch das Wachstum vermindert würde.

Der pH-Wert ist ein wichtiger Faktor, der das Wachstum beeinflusst (Schopfer, 1989). Besonders durch die **Säure-Wachstums-Hypothese** kommt zum Ausdruck, dass Zellstreckung durch eine Ansäuerung der Zellwände ermöglicht wird (Hager *et al.*, 1971; Edwards und Scott, 1974; Rayle und Cleland, 1992; Hager, 2003). Es konnte vielfach gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang von Wachstumsraten

von Blättern mit der Ansäuerung des Apoplasten gibt (Van Volkenburgh und Boyer, 1985; Peters *et al.*, 1998; Stahlberg und Van Volkenburgh, 1999). Die Abnahme des pH-Wertes im Apoplasten wird vor allem durch die Protonenabgabe durch die Plasmalemma-H⁺-ATPase verursacht (Taiz, 1984; Kutschera, 1994). Anhand von *in vitro*-Untersuchungen mit isolierten Plasmalemma-*inside-out*-Vesikeln aus Blättern von Mais konnte gezeigt werden, dass die hydrolytische Aktivität der Plasmalemma-H⁺-ATPase unter Salzstress unverändert war, während die Pumpaktivität durch Salzstress gehemmt wurde (Zörb *et al.*, 2005). Der von der Plasmalemma-H⁺-ATPase erzeugte Protonengradient müsste demnach unter Salzstress geringer sein. Es stellt sich daher die Frage, ob der apoplastische pH-Wert im Blatt durch Salzstress erhöht und dadurch das Blattwachstum aufgrund zu geringer Zellwandextensibilität gehemmt wird.

Auch in der Literatur wird ein pH-Anstieg im Apoplasten als Folge von abiotischem Stress beschrieben (Van Volkenburgh und Boyer, 1985; Hartung *et al.*, 1988; Gollan *et al.*, 1992; Wilkinson und Davies, 1997; Felle *et al.*, 2005; Wilkinson und Davies, 2008). Die Ergebnisse bezüglich des apoplastischen pH-Wertes von Pflanzen, speziell unter Salzstress, sind jedoch widersprüchlich. Neves-Piestun und Bernstein (2001) konnten in wachsenden Blattsegmenten von salzempfindlichen Mais beispielsweise keine Verminderung der Ansäuerung im Außenmedium durch Salzstress beobachten. Sie folgerten, dass das unter salinen Bedingungen gehemmte Blattwachstum nicht durch eine verminderte Pumpaktivität der Plasmalemma-H⁺-ATPase hervorgerufen wird. Gao (2004) nutzte transgene Pflanzen, welche pH-Indikatoren in den gewünschten Pflanzengewebe exprimieren können. In Kombination mit ratiometrischer Fluoreszenzmikroskopie sind mit dieser Technik nicht-invasive pH-Messungen im Cytosol und im Apoplasten von Pflanzen möglich. Es konnte gezeigt werden, dass der apoplastische pH-Wert im Wurzelapoplasten von *Arabidopsis thaliana* nach Zugabe von 100 mM NaCl von ca. 6,4 auf etwa 6,7 erhöht wurde, während der pH-Wert im Cytosol keine nennenswerten Änderungen erfuhr. Auch mit Hilfe von pH-sensitiven Mikroelektroden konnte an wachsenden Blättern von Gerste ein pH-Anstieg um fast eine halbe pH-Einheit im Apoplasten nach Salzeinwirkung von 50 mM NaCl an der Wurzel gezeigt werden, der schon nach etwa 20 Minuten eintrat (Felle *et al.*, 2005). Es sei hierbei hinzuzufügen, dass es sich bei Gerste um eine salzresistente Pflanzen

handelt (Brady, 2002; Felle *et al.*, 2005). Gegensätzlich dazu konnte eine apoplastische Ansäuerung in Wurzelepidermiszellen von salzempfindlichem Mais unter Einfluss von Salzstress dargestellt werden (Zidan *et al.*, 1990). Die in diesen Arbeiten angewandten Methoden sind je nach Fragestellung nur bedingt geeignet und die Ergebnisse zu den Änderungen des apoplastischen pH-Wertes von Pflanzen unter Salzstress sind widersprüchlich. Viele Arbeiten zu diesem Thema befassen sich oft mit den Auswirkungen von Salzstress ohne sukzessive Anpassung der Pflanze an saline Bedingungen oder es wurden zu hohe NaCl-Konzentrationen eingesetzt, die zu sekundären Effekten führten. Weiterhin sei zu erwähnen, dass einige der pH-Messungen am Wurzelapoplasten stattgefunden haben. Für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist allerdings der Blattapoplast von Interesse, da beim Spross im Gegensatz zu den Wurzeln eine besondere Empfindlichkeit gegenüber Salzstress nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 1.2). Die pH-Messungen im Blattapoplasten von Felle *et al.* (2005) an salzresistenter Gerste und die von Neves-Piestun und Bernstein (2001) an salzempfindlichem Mais liefern unterschiedliche Ergebnisse. Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Auswirkung von Salzstress auf den apoplastischen pH-Wert von salzempfindlichen *Vicia faba* mit *in vivo*-Methoden zu untersuchen. Dazu wurde zum einen die bildverarbeitende Fluoreszenzmikroskopie mithilfe verschiedener pH-sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt und zum anderen wurden die pH-Werte im Blattapoplasten mithilfe pH-sensitiver Mikroelektroden bestimmt. Um mögliche sekundäre Effekte zu vermeiden, sollen die Pflanzen schrittweise an den Salzstress angepasst werden und nicht mit einer zu hohen oder zu langen Salzstressintensität behandelt werden.

Im Zusammenhang mit der oben bereits erwähnten Säure-Wachstums-Hypothese wird in der Literatur die Verknüpfung von Wachstumsaktivität vom Blatt und dessen apoplastischem pH-Wert bestätigt (Hager *et al.*, 1971; Edwards und Scott, 1974; Rayle und Cleland, 1992; Hager, 2003). Allerdings handelt es sich dabei nicht um *in vivo*-Messungen. Daher können die Verhältnisse im lebenden Blatt nicht richtig wiedergespiegelt werden (Hager, 2003). Darum soll eine Kombination aus zwei *in vivo*-Methoden (DISP-Methode und Ratiometrische Fluoreszenzmikroskopie) mehr Aufklärung über den Zusammenhang von Blattwachstumsrate und dem pH-Wert im Blattapoplasten von *Vicia faba* bringen.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist eine systematische Untersuchung der Wachstumshemmung von Blättern der Ackerbohnenpflanzen, die sich in der ersten Phase von Salzstress befinden. Die Pflanzen sollen dazu schrittweise an den Salzstress (100 mM NaCl) angepasst werden, um physiologisch sinnvolle Experimente durchführen zu können. Die Untersuchungen sollen darüber Aufschluss geben, ob der apoplastische pH-Wert in Blättern von salzempfindlichen *Vicia faba*-Pflanzen unter Salzstress ansteigt. Hierzu sollen *in vivo*-Untersuchungen mit Hilfe bildverarbeitender Fluoreszenzmikroskopie und mit pH-sensitiven Mikroelektroden durchgeführt werden. Weiterhin soll der Zusammenhang von Blattwachstumsrate und dem pH-Wert im Blattapoplasten von *Vicia faba* aufgeklärt werden. Aus diesem Grunde wurde eine Kombination aus zwei *in vivo*-Methoden (DISP-Methode und ratiometrische Fluoreszenzmikroskopie) eingesetzt. Somit können die Verhältnisse im lebenden Blatt richtig wiedergespiegelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenanzucht

Ackerbohnsamen (*Vicia faba*, minor cv. Scirocco, Saaten-Union GmbH Isernhagen) wurden zwölf Stunden in 0,5 mM CaSO₄-Lösung unter ständiger Luftzufuhr bei Raumtemperatur vorgequollen. Anschließend wurden die Samen in Quarzsand ausgesät, welcher mit einer 1,0 mM CaSO₄-Lösung angefeuchtet war. Die Keimung erfolgte sieben Tage im Dunkeln im Pflanzenwuchsschrank BioLine VB 1514 (Vötsch Industrietechnik, Balingen) unter den gleichen kontrollierten Bedingungen, unter denen auch die Pflanzenanzucht stattfand: 14/10 Stunden Licht/Dunkel, 20/15°C Tag-/Nacht-Temperatur, 50/60% Tag-/Nacht-Luftfeuchtigkeit. Die Lichtintensität betrug 800-1000 μmol^{2/s} in Pflanzhöhe (Leuchtstofflampen: 28 x Osram L30W/830 Lumilux und 6 x Osram L30W/77 Fluora). Nach sieben Tagen Keimung wurden die Keimlinge homogener Größe in 5-Liter-Wasserkulturgefäße mit einer 1/4-konzentrierten Nährlösung (Tab. 1, S. 9) überführt. Die Stängel der Keimlinge wurden mit 1,5 cm breiten Schaumstoffstreifen umwickelt und anschließend in den Löchern der Gefäßdeckel befestigt. Pro Gefäß wurden drei Pflanzen eingesetzt. Nach jeweils 2 Tagen wurde die Nährlösung zunächst gegen eine 1/2-konzentrierte und dann gegen vollkonzentrierte Nährlösung ausgetauscht. Der pH-Wert der Nährlösung lag zwischen 6,5 und 6,8. Die Nährlösung wurde mittels einer Aquarienpumpe ständig belüftet und jeden dritten Tag gewechselt. Für sämtliche Pflanzenanzuchten wurde entionisiertes Wasser verwendet. Die Zusammensetzung der Nährlösung wurde leicht verändert nach Peiter (2002) angesetzt. Die CaSO₄-Lösung wurde durch Ca(NO₃)₂ ersetzt, um die Pflanzen mit mineralischem Stickstoff zu ernähren. Demnach wurde hier auch auf das Cobaltchlorid verzichtet. Der Nährlösung wurde zusätzlich 1 mM NaCl hinzugefügt, um mögliche positive Effekte durch Natrium bei der Salzbehandlung gegenüber der Kontrollvariante zu vermeiden.

Tab. 1: Zusammensetzung der Nährlösung zur Anzucht von *Vicia faba*

Nährsalz	Konz. (mM)	Nährsalz	Konz. (µM)
K ₂ SO ₄	1,0	FeEDTA	60
K ₂ HPO ₄	0,1	MnSO ₄ * H ₂ O	2,0
KH ₂ PO ₄	0,1	CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,2
KCl	0,2	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5	H ₃ BO ₃	10
Ca(NO ₃) * 4 H ₂ O	2,0	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O	0,05
NaCl	1,0	NiSO ₄ * 6 H ₂ O	0,01

Salzstress kann unter Laborbedingungen einfach und präzise induziert werden (Zhu, 2002). Die Salzbehandlung begann nach sechs Tagen Wachstum auf vollkonzentrierter Nährlösung als jeweils das zweitälteste Blatt komplett aufgefaltet war. Die Behandlung wurde schrittweise (täglich 25 mM NaCl) bis zur vollen Konzentration von 100 mM NaCl eingeleitet. Bei den Versuchen mit den verschiedenen Salzstressintensitäten von 1, 25, 50, 75, 100 und 125 mM NaCl wurde entsprechend verfahren. Als Erntezeitpunkt wurde der 30. Tag festgelegt. Die gestressten Varianten (100 mM NaCl) wuchsen zu diesem Zeitpunkt neun Tage auf voller Behandlung und zeigten noch keine ionentoxisch verursachten Schadsymptome an den Blättern. Am Tag der Ernte war das sechste Blatt der Kontrollvariante und das fünfte Blatt der gestressten Variante zwar schon aufgefaltet, aber das Blattwachstum war zu diesem Zeitpunkt noch aktiv. Soweit nicht anders beschrieben, umfasste jede Variante vier Wiederholungen.

Ackerbohnen eigneten sich für die in dieser Arbeit angewandten Methoden besonders gut, weil sie kaum Blatthaare besitzen, die die Fokussierung während des Mikroskopiervorgangs stören könnten. Weiterhin existieren schon Erfahrungen bezüglich der Eignung von *Vicia faba* für die eingesetzten Methoden Fluoreszenzmikroskopie (Mühling *et al.*, 1995), Infiltrations-Zentrifugationsmethode (Lohaus *et al.*, 2001) und Mikroelektroden-technik (Felle und Hanstein, 2002). Ackerbohnen besitzen zudem eine hohe stomatare Leitfähigkeit und ein großes

apoplastisches Volumen (Lohaus *et al.*, 2001), was die Infiltrationsvorgänge erleichtert.

2.2 Erfassung von Wachstumsparametern

2.2.1 Frisch- und Trockenmasse

Die Bestimmung der Frisch- und Trockenmasse von Spross und Wurzel wurde bei allen Varianten (1, 25, 50, 75, 100 und 125 mM NaCl) durchgeführt. Der Spross wurde dabei unmittelbar über dem Deckelrand des Gefäßes mit einer Schere abgeschnitten. Die Wurzel wurde unterhalb der Schaumstoffstreifen und des Samens (soweit noch vorhanden) abgeschnitten und mit Zellstoffpapier getrocknet. Anschließend wurde die Frischmasse ermittelt. Die Bestimmung der Trockenmasse erfolgte nach einer Lagerung von fünf Tagen bei 80 °C im Trockenschrank.

2.2.2 Blatt- und Sprosslänge

Die Bestimmung von Blatt- und Sprosslängen sowie deren Zuwachsraten erfolgten ebenfalls bei den Varianten aller Stressintensitäten (1, 25, 50, 75, 100 und 125 mM NaCl). Die eben genannten Parameter wurden mit einem Lineal erfasst. Die Blattlängen und deren Zuwachsraten wurden jeweils an den Blattstufen 4, 5 und 6 ermittelt (Blattstufe 4 steht dabei beispielsweise für das viertälteste Blatt). Bei den Varianten mit 75, 100 und 125 mM NaCl in der Nährlösung war Blattstufe 6 größtenteils noch nicht aufgefaltet. Hier wurde die Länge des noch zusammen gefalteten Blattes gemessen. Die Sprosslänge wurde ebenfalls mit dem Lineal vermessen. Dabei wurde jeweils die Länge vom Deckelrand bis zum Vegetationskegel als Sprosslänge definiert. Die Blattlänge wurde von der Spreitenspitze bis zum Spreitengrund definiert. Messungen für die Zuwachsraten von Blatt- und Sprosslänge erfolgten täglich zwischen 14.00 und 16.00 Uhr. Die täglichen Messungen begannen drei Tage vor dem eigentlichen Erntetermin und endeten sechs Tage später. Somit konnten Wachstumsaktivitäten während des Erntezeitpunktes erfasst werden.

2.2.3 Blattfläche

Die Blattflächen wurden mit dem Area Meter (ADC BioScientific Ltd., Herts, England) gemessen. Für die Messungen mussten die jeweiligen Blätter mit einer Schere abgeschnitten und in das Gerät eingespannt werden, um die Blattfläche mit dem Scanner zu erfassen. Gemessen wurden alle bereits aufgefalteten Blätter. Auch die maximale Blattlänge und –breite wurde jeweils erfasst. Hierbei wurden nur Kontrollvarianten (1 mM NaCl) und die Salzbehandlungen mit 100 mM NaCl gemessen.

2.3 Wachstumsbestimmung mit Hilfe der digitalen

Bildsequenzverarbeitung

2.3.1 Messprinzip

Mit Hilfe der sogenannten DISP-Methode (Digital Image Sequence Processing) ist es möglich, die relative Wuchsrates von dikotylen Blättern zu ermitteln (Walter, 2001). Die wachsende Zone eines Blattes vergrößert sich ständig. Die Anwendung eines absoluten Längenmaßstabes (z.B.: Blattbasis und –spitze) wäre somit ungenau und könnte zu Fehlinterpretationen führen. Es könnte beispielsweise vorkommen, dass man Wachstumsaktivitäten im Bereich der Blattspitze vermutet, obwohl diese lediglich von einer aktiven Wachstumszone im Bereich der Blattbasis vorgeschoben wird. Die DISP-Methode beruht darauf, dass in regelmäßigen Zeitabständen mit einer Kamera Bilder von einem wachsenden Blatt aufgenommen werden. Beleuchtet werden die Blätter mit Licht des nahen Infrarot-Bereichs (940 nm). Infrarotes Licht hat den Vorteil, dass es das Pflanzenwachstum nicht beeinträchtigt (Schmundt *et al.*, 1998) und die Aufnahmen auch nachts durchgeführt werden können. Außerdem wird der für die Messung nötige Ader-Intercostalfeldkontrast im Infraroten deutlicher, da sichtbares Licht im Wesentlichen an der Cuticula reflektiert wird, während Infrarotlicht zu einem großen Teil an den Luft-Zell-Übergängen im Schwammparenchym reflektiert wird (Walter, 2001). Bei der Auswertung wurden Wuchsraten für jede Stelle des Blattes, sowie für jeden Zeitpunkt, berechnet. Für diese Berechnung wurden kleine räumliche und zeitliche Nachbarschaftsregionen betrachtet. Einzelne punktuelle Wuchsraten konnten somit räumlich und zeitlich gemittelt werden. Die

punktueller Berechnung von Wachsraten erfolgte mit Hilfe der Strukturtenormethode (Bigün und Granlund, 1987; Haußecker und Spies, 1999).

2.3.2 Fixierung der Blätter in der optischen Ebene

Die Ermittlung der Blattwachstumsrate fand im Klimaschrank unter den im Kapitel 2.1 beschriebenen Bedingungen statt. Für die Messungen wurde jeweils das jüngste aufgefaltete Blatt festgelegt, da hier sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Behandlungsvarianten eine vergleichbare Wachstumsaktivität vorliegt (siehe Kapitel 4.3, S. 58). Da aufwärts oder abwärts gerichtete Bewegungen des zu untersuchenden Blattes als Wachsen oder Schrumpfen interpretiert werden könnte, musste das Blatt in einer optischen Ebene fixiert werden (Abb. 1). Das Blatt wurde an jedem der fünf Fixierungspunkte mit einem kleinen Streifen Gewebeklebeband verstärkt. Der Blattstiel wurde mit Parafilm an einer Querverstrebung auf der Ringkonstruktion befestigt, welche wiederum am Laborstativ befestigt wurde. Für Blätter von *Vicia faba* erwiesen sich Zugmassen von 12 g am geeignetsten. Sie bestanden aus wassergefüllten Kunststoffbehältern und wurden mit Hilfe von Nylonfäden und gekürzten Haarklammern an den Blattfixierungspunkten befestigt und über die Ringkonstruktion geführt. Während des kompletten Messvorganges war dafür Sorge zu tragen, dass die zu messenden Blätter nicht durch jüngere Blätter oder von Blättern anderer Pflanzen überdeckt wurden. Damit die Aufnahme nicht gestört werden konnte, wurden potentiell störende Blätter ebenfalls fixiert.

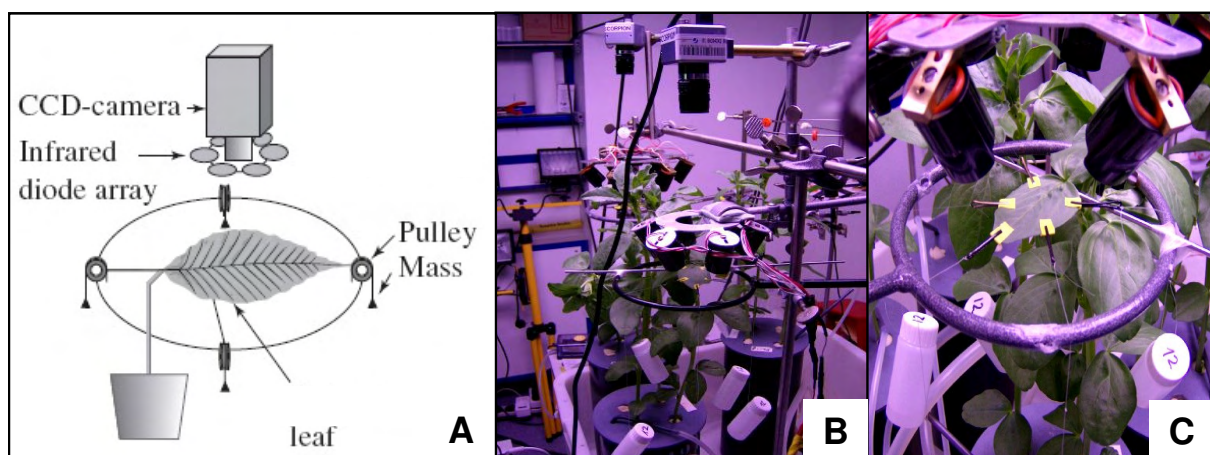


Abb. 1: Schema des DISP-Aufbaus (A, verändert nach Walter und Schurr, 2005). Die optische Achse einer Kamera weist senkrecht auf das Objekt. Eine Fixierung des Blattes soll sicherstellen, dass das Objekt sich nicht zur Kamera hin oder von ihr wegbewegt. Das Blatt wird mit Infrarotlicht beleuchtet. DISP-Aufbau (B) und Blattfixierung mit fünf Fixierungspunkten (C) bei Aufnahmen von *Vicia faba*.

2.3.3 Aufbau des Bildaufnahmesystems

Die Bildaufnahmen erfolgten mit einer Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (Scorpion IEEE1394, 1280*960 Pixel, Point Grey, Vancouver, Canada) mit entsprechenden Filtersätzen. Um eine geeignete Objektdistanz herzustellen, wurde die Kamera mit einem 25-mm-Objektiv (Pentax, Hamburg) und einem 5-mm-Zwischenring versehen. Die Beleuchtungseinheit bestand aus sechs separat in ihrem Abstrahlungswinkel verstellbaren, mit je 15 Dioden ausgestatteten, Infrarot-Beleuchtungssystemen (Fa. Conrad Electronic, Hirschau). Sie wurden etwa 3 cm über dem Messblatt am Laborstativ befestigt (Abb. 1, S. 12). Die Kameras wurden ebenfalls am Laborstativ befestigt. Ihr Abstand zum Messblatt betrug etwa 20 cm. Der CCD-Chip (Charge-Coupled Device) der Kamera wurde parallel zur Blattebene positioniert.

2.3.4 Bildaufnahme und Auswertung

Sämtliche in diesem Abschnitt genannten Programme wurden von Andrés Chavarria (ICG-3 Phytosphäre, Forschungszentrum Jülich) programmiert. Die Kamera wurde mit dem Rechner verbunden. Mit Hilfe der Livebildanzeige „AufnahmeFire“ wurde die Positionierung, Schärfe und Helligkeit des Bildes optimiert. Alle drei Minuten wurde ein Grauwert-Bild (640*480 Pixel; 256 Grauwerte) des Blattes aufgenommen. Mit zwei Kameras wurden jeweils zwei verschiedenen Pflanzen gemessen. Die Aufnahmen liefen jeweils sieben Tage durchgehend. Vor der Auswertung einer Sequenz wurde eine Begutachtung der Aufnahme auf eventuelle Störstellen durchgeführt. Zur Betrachtung der Bildserien wurde die Software „Scroll“ verwendet. Die Auswertung wurde mit den Programmen „Auswertung“ und „Grow Flow“ durchgeführt. Der Versuch bestand aus fünf Wiederholungen je Variante (1 mM NaCl und 100 mM NaCl). Gestörte Aufnahmesequenzen wurden aus der Auswertung entfernt. Die Wuchsraten wurden in RGR (Relative Growth Rate, %/h) ausgegeben. In dieser Arbeit ist damit stets die Wuchsrate des kompletten Blattes gemeint.

2.4 Kationenanalyse

2.4.1 Gewinnung von Zellsaft und apoplastischer Waschflüssigkeit

Die Apoplastische Waschflüssigkeit (AWF) wurde mit Hilfe der Infiltrations-Zentrifugations-Technik (Klement, 1965; Husted und Schjoerring, 1995) aus den Blättern extrahiert. Jeweils vier zu untersuchende Blätter wurden nach dem Wiegen, wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben, gleichzeitig mit entionisiertem Wasser infiltriert. Nach der Infiltration wurden die Blätter vorsichtig trocken getupft und erneut gewogen. Wie bereits von Mühling und Sattelmacher (1995) beschrieben, wurden die Blätter mit der Blattoberfläche nach außen und mit der Blattspitze nach unten in einem Plastiktrichter mit einem Durchmesser von 80 mm eingesetzt. Fixiert wurden die Blätter mit einem weiteren, kleineren Plastiktrichter mit einem Durchmesser von 65 mm (Abb. 2, S. 15). Die AWF wurde in verkürzten Falcon-Tubes (50 ml) aufgefangen. Jeweils 8 Blätter wurden gleichzeitig mit einer Heraeus Sepatech, Megafuge 1,0 (Kendro-Heraeus, Berlin) zentrifugiert (5 min., 90 g, Raumtemperatur). Zur Gewinnung des Zellsafts (ZS), der größtenteils aus dem Inhalt des Cytosols und der Vakuole besteht, wurde das zentrifugierte Blattmaterial kurz in flüssigen Stickstoff gehalten, um den Zellverband zu zerstören. Das Blattmaterial wurde anschließend in offene 20 ml-Plastikspritzen überführt und erneut zentrifugiert (5 min., 806 g, Raumtemperatur). Die Probenflüssigkeiten wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Die Kationenanalyse erfolgte mittels Atom-Absorptions-Spektrometrie.

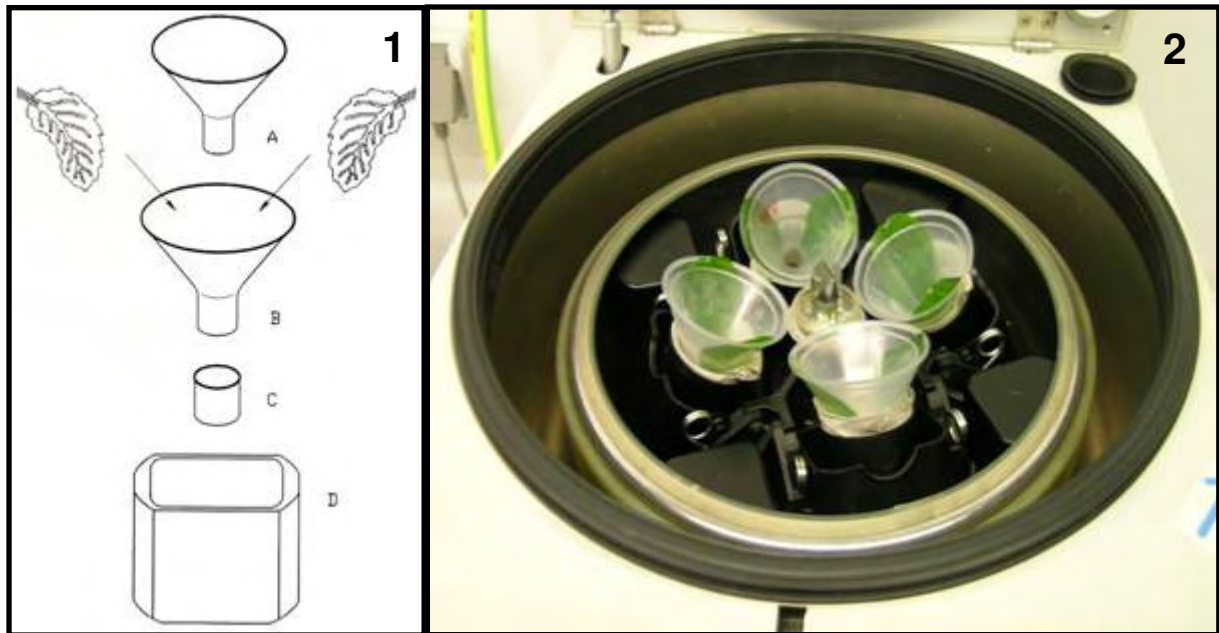


Abb. 2: Schematischer Aufbau der Zentrifugation von apoplastischer Waschflüssigkeit aus intakten Blättern (1, aus Mühling und Sattelmacher, 1995) A. Plastiktrichter ($\varnothing = 65$ mm), B. Plastiktrichter ($\varnothing = 80$ mm), C: verkürztes Falcon-Tube als Auffanggefäß, D: Zentrifugenbecher. Beladene Zentrifuge mit Blättern von *Vicia faba* (2).

2.4.2 Kationenbestimmung in der Gesamtmasse von Blatt, Spross und Wurzel, sowie in der apoplastischen Waschflüssigkeit und Zellsaft

Die Kationenbestimmung erfolgte durch Flammenemission am Atom-Absorptions-Spektrometer (AAS) SpectrAA 220 FS der Firma Varian (Darmstadt). Die Kationen K^+ , Na^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} wurden in 0,25 M Salpetersäure mit 2 %iger Cäsiumchlorid-Lanthanchlorid-Pufferlösung ($10 \text{ g L}^{-1} \text{ CsCl}$, $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ La}$) gemessen, um Messstörungen durch chemische Interferenzen zu vermeiden. Die Kalibrierung erfolgte mit Hilfe eines Vier-Elemente-Standards. Die Bestimmung der Kationen in Spross, Blatt und Wurzel erfolgte nach Trockenaufschluss. Es wurden jeweils die jüngsten aufgefalteten Blätter für die Messungen ausgewählt. Die apoplastische Waschflüssigkeit (1:20) und der Zellsaft (1:500) wurden zur Bestimmung der Kationenkonzentration unter Zugabe von Salpetersäure (0,25 M HNO_3) entsprechend mit entionisiertem Wasser verdünnt. Die ermittelten Kationenkonzentrationen des Apoplasten von *Vicia faba* mussten wie in der Literatur beschrieben um den Verdünnungsfaktor 9 korrigiert werden (Coester, 2000; Lohaus *et al.*, 2001). Dieser Faktor ergab sich aus der Verdünnung des größtenteils luftgefüllten Interzellularraums, welcher durch das Infiltrationsmedium gefüllt wurde.

2.5 pH-Messung mit der bildverarbeitenden Fluoreszenzmikroskopie

2.5.1 Messprinzip

Mit Hilfe der bildverarbeitenden Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich in lebenden Organismen Ionenkonzentrationen zu messen (Bright *et al.*, 1989). Es werden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, die ihr Fluoreszenzspektrum ändern, wenn sie eine Bindung mit einem Ion eingehen. Die Farbstoffe haben durch die Bindung der jeweils zu bestimmenden Ionen veränderte Absorptionsmaxima. Allerdings wird die Fluoreszenzintensität nicht nur durch die Konzentration des zu bestimmenden Ions beeinflusst, sondern auch durch die Konzentration des Farbstoffs selbst. Aus diesem Grund wird in vielen Fällen auch das so genannte Ratio Imaging angewandt. Es handelt sich hierbei um ein Quotientenverfahren, bei dem Fehlerursachen wie die inhomogene Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffs im Blattgewebe eliminiert wird (Rink *et al.*, 1982; Deitmer und Schild, 2000). Hierzu wird bei zwei Wellenlängen angeregt und es kommen spezielle zur Doppelanregung geeignete Farbstoffe (Double-Excitation-Dyes) zum Einsatz. Eine Anregungswellenlänge wird dabei so gewählt, dass sie möglichst im Anregungsmaximum des Fluoreszenzfarbstoffs nach der Bindung mit einem Ion liegt. Bei der anderen Wellenlänge sollte sich die Fluoreszenzintensität bei einer Bindung des Farbstoffs mit einem Ion weniger empfindlich, nicht oder gar entgegengesetzt verändern (Bright *et al.*, 1987). Der Quotient der ionenabhängigen durch die ionenunabhängige Wellenlänge wird als "Ratio" bezeichnet und ist eng mit der vorliegenden Ionenkonzentration korreliert. Die von der CCD-Kamera emittierte Fluoreszenz kann nach Berechnung der jeweiligen Fluoreszenz-Ratios mit einem bildverarbeitenden System als „Pseudocolour“-Bild dargestellt werden. Es ist nach erfolgter Kalibrierung möglich, die zeitliche Änderung der Konzentration freier Ionen wie auch die räumliche Verteilung der Ionen im Blatt darzustellen.

2.5.2 Farbstoffbeladung der Blätter

Die Fluoreszenzfarbstoffe gelangten per Vakuuminfiltration in den Blattapoplasten (Mühling *et al.*, 1995). Dabei wurde jeweils ein einzelnes Blatt ohne Petiole in eine

60-mL-Einwegspritze eingelegt, welche anschließend mit dem Farbstoff soweit befüllt wurde, dass das Blatt ausreichend bedeckt war (Abb. 3 A, S. 17). Durch vorsichtiges Einführen des Kolbens wurde die Luft aus der Spritze gedrückt. Anschließend wurde die Spritze mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen. Durch Ziehen des Kolbens wurde ein leichter Unterdruck erzeugt. Die im Blattapoplasten vorhandene Luft konnte so sichtbar durch die Stomata entweichen. Der Kolben wurde langsam zurückgeführt, so dass der Farbstoff durch die Stomata in den Apoplasten gelangen konnte. Die Infiltration bewirkte eine deutliche Dunkelfärbung des Blattes, was die visuelle Kontrolle einer vollständig erfolgten Infiltration ermöglichte (Abb. 3 C). Die Blätter wurden anschließend mit entionisiertem Wasser leicht abgespült und vorsichtig getrocknet.

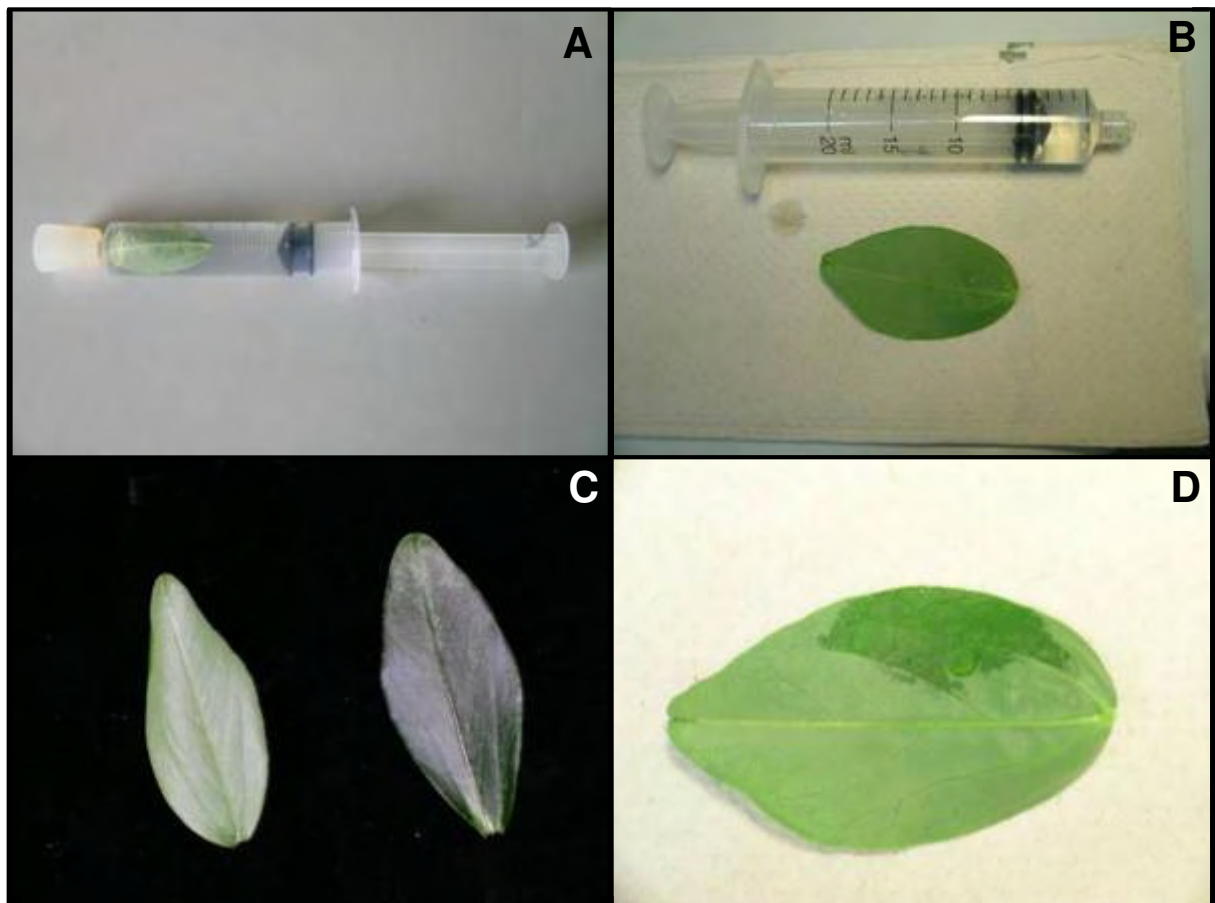


Abb. 3: Gefüllte 60-mL-Spritze zur kompletten Vakuuminfiltration von Blättern von *Vicia faba* (A). Gefüllte 20-mL-Spritze zur partiellen Infiltration (B). Blattoberseite vor (links) und nach (rechts) der Vakuuminfiltration (C). Blattrückseite nach einer partiellen Infiltration (D).

Um eine quantitative Aussage über den pH-Wert in einzelnen Blattabschnitten treffen zu können, wurde in dieser Arbeit eine weitere Methode zur Farbstoffbeladung des Interzellularraums angewandt. Hierzu wurde der Farbstoff über die stumpfe

Austrittsöffnung einer 20-mL-Spritze, welche mit leichtem Druck auf die Blattunterseite gedrückt wurde, über die Spaltöffnungen infiltriert (Abb. 3 B). Das Blatt wurde dazu mit der Unterseite nach oben auf Zellstoffpapier gelegt. Auch hier war eine deutliche Dunkelfärbung des infiltrierten Blattbereichs zu erkennen (Abb. 3 D). Diese Infiltrationsmethode hat den Vorteil, dass nur ein gewisser Teil des Interzellularraumes mit Farbstoff infiltriert wird und somit eine eventuelle Durchmischung der interzellularen Flüssigkeit über das ganze Blatt vermieden werden kann.

Zum Mikroskopieren wurde jeweils ein Blattsegment (ca. 1 cm x 1 cm) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dieses Segment wurde aus dem unteren Drittel der Blattspreite mittig zwischen Blattrand und Blattmittelrippe entnommen. Die Messung erfolgte am Mikroskop mit einer 200-fachen Vergrößerung. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die alle für Messungen in einem pH-Bereich von 4,0 bis 7,0 geeignet sind (Tab. 2).

Tab. 2: Verwendete pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe

Bezeichnung	Abkürzung	Konzentration	pK-Wert	Hersteller
Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran	FITC	50 µM	6,2	Sigma-Aldrich
Fluorescein-Tetramethyl-Rhodamin-Dextran	FTMR	20 µM	6,4	Invitrogen
Oregon Green Dextran 488	OG	20 µM	4,7	Invitrogen

2.5.3 Kalibrierung und pH-Messung im Blattapoplasten

Die *in vivo*-Kalibrierung des pH-Wertes im Apoplasten von intakten Blättern von *Vicia faba* erfolgte mit einem starken Puffer (MES-Puffer, 100 mM). Die unterschiedlich definierten pH-Werte wurden mit NaOH im Bereich zwischen 4,5 und 7,0 eingestellt. Zusätzlich wurde der jeweilige Fluoreszenzfarbstoff in der gleichen Konzentration wie in der darauf folgenden Messung zugegeben (Tab. 2). Diese Kalibrierlösungen gelangten ebenfalls per Vakuum-Infiltration in den Blattapoplasten. Durch Messen dieser Blätter erhielt man letztendlich die entsprechenden Eichkurven (Abb. 19).

Nach der Kalibrierung erfolgte die Messung am Inversmikroskop Leica DM IRB (Leica, Wetzlar). Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einem Lichtstrahl aus der HBO-Quecksilberdampf-Bogenlampe (Osram, Augsburg) über ein Filterrad (Ludl Electronic Products, New York, USA) bei 490 und 440 nm angeregt. Das emittierte Licht wurde über einen Bandpassfilter (525-575 nm) durch die CCD-Kamera (CoolSNAP, Photometrics, Tucson, USA) erfasst. Die Belichtungszeit betrug jeweils 100 ms. Die Ratio-Daten wurden gebildet, indem die gemittelten Fluoreszenzintensitäten nach einer Belichtung mit 490 nm (pH-abhängig) durch die gemittelten Fluoreszenzintensitäten nach einer Belichtung von 440 nm (pH-unabhängig) geteilt wurden. Mit Hilfe des bildverarbeitenden Softwarepakets Meta Imaging Series (Visitron, Puchheim) wurden Pseudocolour-Bilder für beide Wellenlängen erstellt und miteinander verrechnet. Daraus resultierten die Ratiobilder, deren Daten gemittelt oder auch speziell für markierte Regionen im Blattgewebe dargestellt werden konnten. Diese Daten wurden mit Hilfe der jeweiligen Kalibriergeraden pH-Werten zugeordnet und mit Microsoft Excel ausgewertet. Eine biologische Wiederholung entspricht dem Mittelwert aus vier Messpunkten eines Blattes.

2.6 pH-Messung im Blattapoplasten mit ionensensitiven

Mikroelektroden

2.6.1 Messprinzip

Eine weitere Möglichkeit zur Messung des pH-Wertes in Blattapoplasten von *Vicia faba* ist die Anwendung ionenselektiver Mikroelektroden (Felle und Hanstein, 2002). Sie erlaubt eine potentiometrische Messung von Ionenaktivitäten in wässrigen Lösungen, welche in diesem Fall der Flüssigkeitsfilm im Blattapoplasten darstellt. Die Mikroelektroden werden durch die Stomata des intakten Blattes eingeführt und es wird ein elektrischer Kontakt hergestellt. Da es sich hierbei um eine Differenzmessung handelt, ist der Einsatz einer zweiten sogenannten Referenzelektrode notwendig. Die Referenzelektrode wird nur mit Elektrolytlösung gefüllt und ist ioneninsektiv. Der Sinn dieser zweiten Elektrode liegt darin, dass Elektroden generell immer Spannungen messen. Da auch die ionenselektive Elektrode diese unspezifische Spannung misst, kommt es dabei zusammen mit dem spezifischen Signal für die Ionenkonzentration zur Messung einer Mischspannung. Wenn man nun die aufgenommene Spannung der Referenzelektrode von der Spannung der Ionenselektiven Elektrode über den Differenzverstärker subtrahiert, erhält man die Nettospannung. Diese Nettospannung korreliert mit der Ionenkonzentration im Apoplasten. So kann ausgeschlossen werden, dass nicht physiologisch bedingte Spannungsänderungen den Messvorgang beeinflussen.

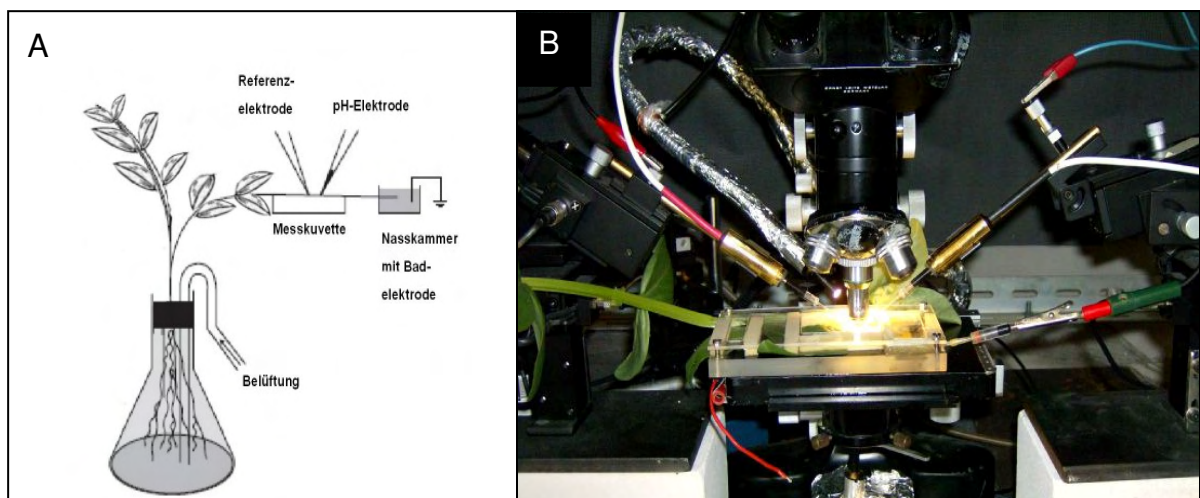


Abb. 4: Schematischer Aufbau des Systems zur Messung des apoplastischen pH mittels ionenselektiver Mikroelektroden (A) verändert aus Felle (2006). Messung an *Vicia faba* (B) mit 3 Elektroden (von links nach rechts: pH-insensitive Referenzelektrode, pH-sensitive Messelektrode, Badelektrode).

2.6.2 Herstellung der Elektroden

Die Mikroelektroden wurden speziell für extrazelluläre Messungen hergestellt, damit Verletzungen, die durch Berührung des Gewebes entstehen können, vermieden werden. Die für die Referenzelektroden notwendigen Glasmikropipetten werden aus Glaskapillaren mit einem inneren Filament hergestellt (Felle und Bertl, 1986). Durch eine Heizwendel wird das Glas erhitzt und weich gemacht, während eine Ziehvorrichtung gleichzeitig die offene und stumpfe Spitze zieht (ca. 2,0 μM Durchmesser). Die Spitze wurde hitze-polier, um Verletzungen durch Berührung des Gewebes bei den extrazellulären Messungen zu verhindern. Um bei der Messung ein Heraustreten der Elektrolytlösung aus der Spitze zu vermeiden, wurde die Spitze vorher mit Agar (1 M KCl, 1 % w/v Agar Agar) befüllt. Die Glaspipette wurde schließlich mit einer Elektrolytlösung (0,5 M KCl, 100 mM MES / TRIS, pH 6) aufgefüllt, um eine Elektrolytbrücke zur eigentlichen Elektrode im Mess-System herzustellen. Es handelte sich hierbei um eine reversible Elektrode (Ag/AgCl-Microelectrode Holder Half-Cells, World Precision Instruments, Sarasota, USA). Sie vermittelte zwischen Elektronenwanderung in der Flüssigkeit (Elektrolytlösung in der Glaspipette) und dem Metall (Draht, der die elektrische Verbindung zu einem Verstärker herstellt). Der Strom konnte hier in beide Richtungen ohne Störspannungen fließen.

Die ionenselektiven Mikroelektroden werden ebenso hergestellt wie die Referenzelektroden. Die Kapillare wird hierfür allerdings vor der Befüllung mit einer 0,2 %igen Tributhylsilan-Chloroform-Lösung silanisiert, um eine hydrophobe Innenfläche zu erhalten. Der ebenfalls hydrophobe ionenselektive Sensor (Hydrogen ionophore II - Cocktail A Selektophore, Fluka) hat dadurch eine bessere Haftung in der Kapillarenspitze. Der ionenselektive Sensor ist eine flüssige Membran mit mobilen Ionenaustauschern. Er gelangt nach einiger Zeit automatisch in Kapillarspitze, nachdem die Kapillare aufrecht in die Sensorlösung gestellt wurde. Der Sensor wurde mit einem Gemisch aus Tetrahydrofuran (40 mg/mL) und Polyvinylchlorid (30 : 70, v/v) versetzt. Das Gemisch ging nach Verdunstung des Lösungsmittels Tetrahydrofuran in eine gelartige Form über, was verhindern sollte,

dass die Sensorlösung aus der Kapillarspitze ausläuft. Anschließend wird die Kapillare mit Hilfe einer selbst hergestellten Füllpipette mit der oben erwähnten Elektrolytlösung aufgefüllt. Die Befüllung der Spitze mit Agar Agar ist hier nicht notwendig. Die Mikroelektroden wurden im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

2.6.3 Messplatzaufbau

Die Spannungen der ionenselektiven Mikroelektrode und der Referenzelektrode wurden mit dem Elektrometer (Duo 773, World Precision Instruments, Sarasota, USA) erfasst. Der Analogschreiber (W+W Recorder Model 314, Kontron Elektronik GmbH, München) zeichnete den Spannungsverlauf über die Zeit von Referenzelektrode, Ionenselektiver Mikroelektrode sowie deren Differenz auf. Der eigentliche Messplatz befand sich zur Abschirmung vor Störungen von außen in einem Faraday-Käfig. Mit Hilfe von zwei Mikromanipulatoren (Märzhäuser, Wetzlar) konnten die beiden Elektroden in drei Raumebenen verschoben werden. Das zu untersuchende Blatt wurde jeweils mit der Unterseite nach oben auf eine Messkuvette aus Plexiglas eingespannt und mit Klebeband sowie eines mit Schaumstoff versehenen Plexiglasdeckels fixiert (Abb. 4, S. 20). Die Messkuvette bestand aus einer Nass- und einer Trockenkammer. Die Blattspitze befand sich dabei in der Nasskammer, welche mit Elektrolytlösung (1 mM KCl) gefüllt wurde. In der Nasskammer wurde zusätzlich die sogenannte „Badelektrode“ getaucht, die den Stromkreis schloss. Die Nasskammer wurde mit Parafilm bedeckt, um Verdunstungsverluste zu minimieren. Die Blattfläche wurde in der Trockenkammer fixiert. Die beiden Mikroelektroden wurden mit Hilfe der Mikromanipulatoren unter dem Mikroskop (250-fache Vergrößerung) in geöffnete Stomata eingeführt.

2.6.4 Kalibrierung und Messung

Zum Kalibrieren wurden MES/TRIS-Lösungen (10 mM, pH-Wert von 4,5,6 und 7) versetzt mit KCl (1 mM) hergestellt. Alle Elektroden (Ionenselektive Mikroelektrode, Referenzelektrode und „Bad-Elektrode“) wurden jeweils in der Eichlösung belassen, bis die Elektrode ein stationäres Potenzial aufwies, welches sich über 3-5 Minuten nicht mehr verändert hatte. Die Spannungswerte wurden mit dem Schreiber aufgetragen und es konnte die Steigung (mV/pH) bestimmt werden. Mit Hilfe dieser Steigung konnte jeder Spannungswert der folgenden Messung einem pH-Wert

zugeordnet werden. Direkt nach der Kalibrierung wurden die Mikroelektroden mit Hilfe der Mikromanipulatoren in die Stomata eingeführt. Die eigentliche Messung begann frühestens eine Stunde später, als sich im Spannungsverlauf ein konstanter Wert ablesen ließ. Messungen ohne eine solche Konstanz wurden entweder neu angesetzt oder verworfen. Insgesamt wurden jeweils acht Wiederholungen gemessen. Um ein erfolgreiches Einbringen der beiden Mikroelektroden in den stomatären Raum zu kontrollieren, wurde überprüft, ob direkt nach dem Ausschalten des Lichtes der pH-Wert steigt und anschließend beim Anschalten wieder sinkt (Hanstein und Felle, 1999). Die pH-sensitive Mikroelektrode wurde nach jeder Messung nachgeeicht, um sicherzugehen, dass sie nicht während der Messung zu Schaden gekommen ist.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse wurde nach Köhler *et al.* (2002) durchgeführt.

Der Mittelwertvergleich zweier unabhängiger Stichproben wurde mit dem t-Test durchgeführt. Sternchen symbolisieren einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrollvariante (P = 5%). Der Standardfehler (mittlerer Fehler des Mittelwertes, $s_{\bar{x}}$) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

s = Standardabweichung

n = Stichprobenumfang

Berechnung und Prüfung des Maßkorrelationskoeffizienten erfolgten ebenfalls nach Köhler *et al.* (2002).

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumsreduktion von *Vicia faba* unter Salzstress

3.1.1 Frisch- und Trockenmasse von Spross und Wurzel

Die Sprossfrischmasse war bei den Versuchspflanzen ab einer NaCl-Konzentration von 75 mM in der Nährlösung und die Wurzelfrischmasse ab einer NaCl-Konzentration von 100 mM signifikant gegenüber der Kontrollvariante (1 mM NaCl) vermindert (Abb. 5).

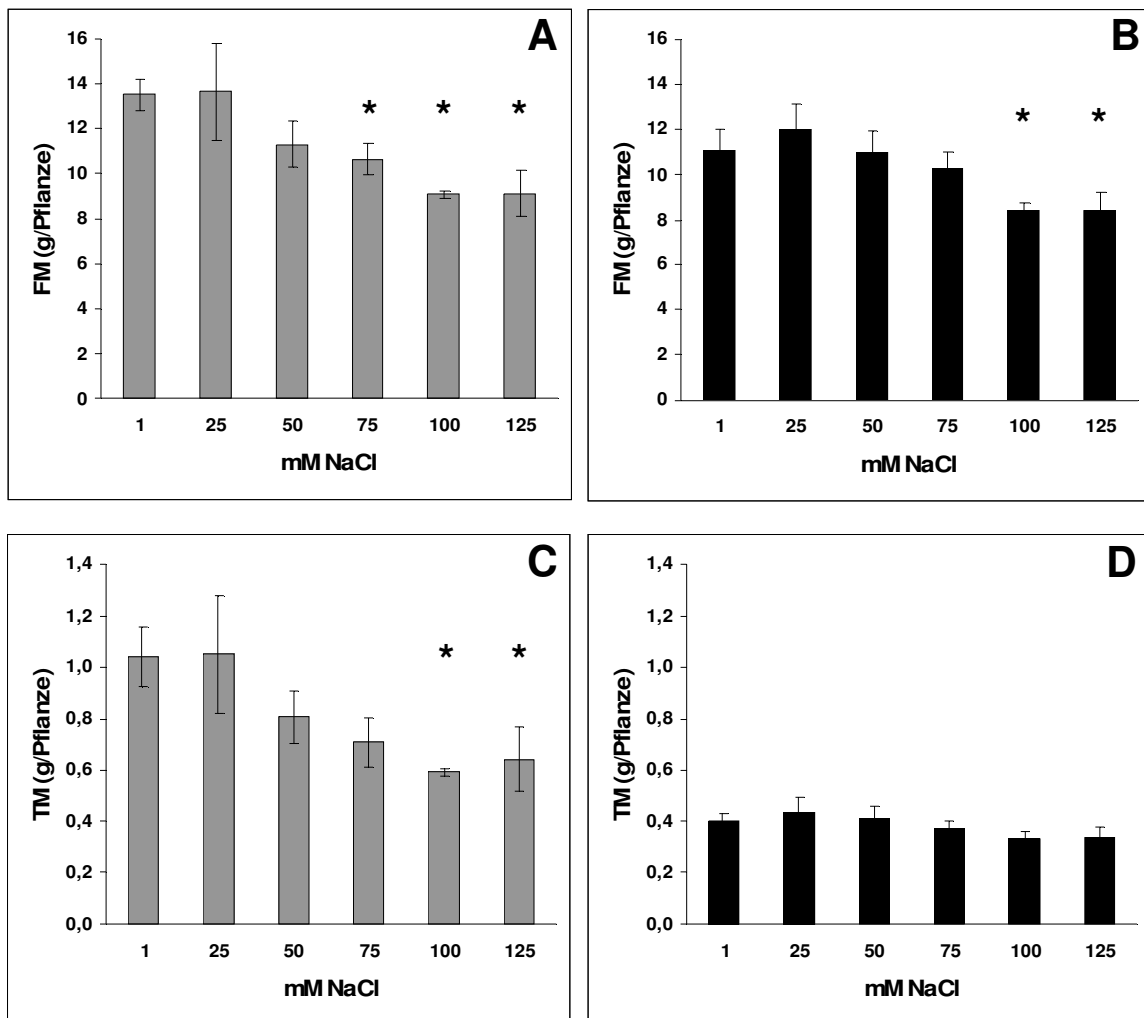


Abb. 5: Frischmasse von Spross (A) und Wurzel (B) und Trockenmasse von Spross (C) und Wurzel (D) in Abhängigkeit der Salzkonzentration in der Nährlösung. Dargestellt sind Mittelwerte aus vier Wiederholungen bei drei Pflanzen pro Gefäß. Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied ($P = 5\%$) zur jeweiligen Kontrollvariante (1 mM NaCl). Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an.

Während beim Spross auch die Trockenmasse ab einer NaCl-Konzentration von 100 mM in der Nährlösung signifikant im Vergleich zur Kontrollvariante reduziert war, gab es bei der Wurzel Trockenmasse keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrollvariante.

3.1.2 Einfluss von Salzstress auf die Sprosslänge

Deckungsgleich mit der Reduktion der Sprossfrischmasse war bei den Sprosslängen der Pflanzen zum Erntezeitpunkt eine signifikante Längenreduktion ab einer Konzentration von 75 mM NaCl zu verzeichnen (Abb. 7 A). Abbildung 6 zeigt repräsentativ Pflanzen aller in diesem Versuch angelegten Varianten zum Erntezeitpunkt. Beim Sprosslängenzuwachs in der Erntewoche in einer Zeitspanne von drei Tagen vor bis drei Tage nach der Ernte bestand innerhalb der verschiedenen Behandlungsstufen ebenfalls ab einer NaCl-Konzentration von 75 mM ein signifikanter Rückgang in Bezug zur Kontrollvariante (Abb. 7 B).

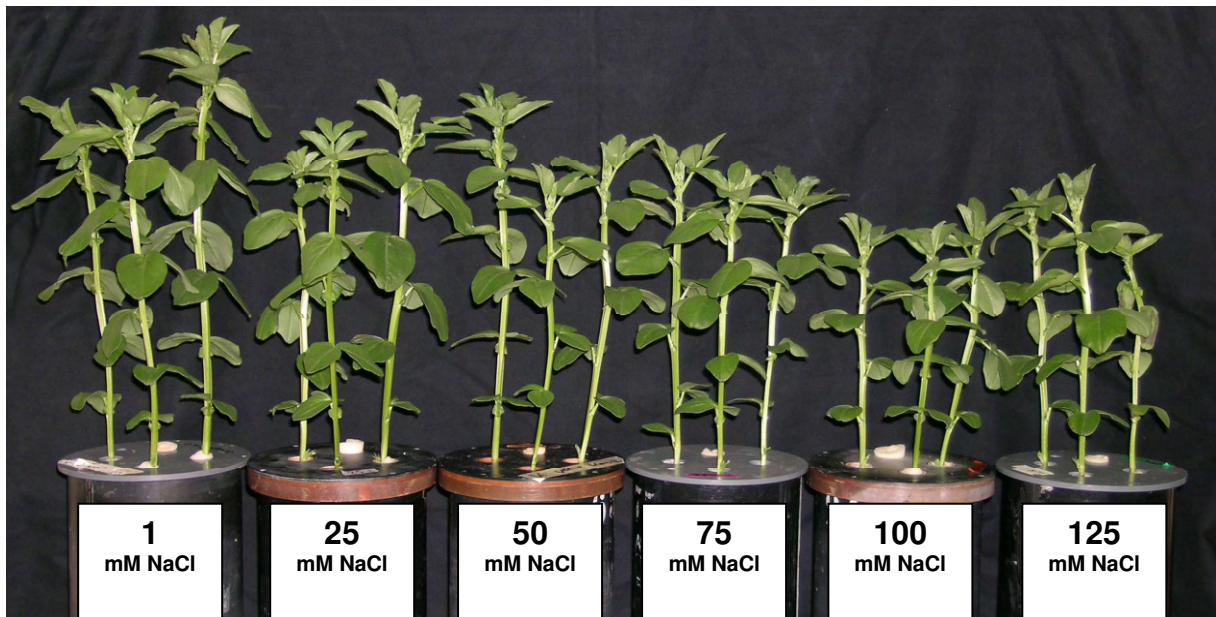


Abb. 6: Pflanzenanzucht in 5-Liter-Wasserkulturgefäßen. Von links nach rechts sind Pflanzen der Kontrollvariante (1 mM NaCl) und der verschiedenen Behandlungsvarianten (25, 50, 75, 100 und 125 mM NaCl) zum Zeitpunkt der Ernte zu sehen.

Ergebnisse

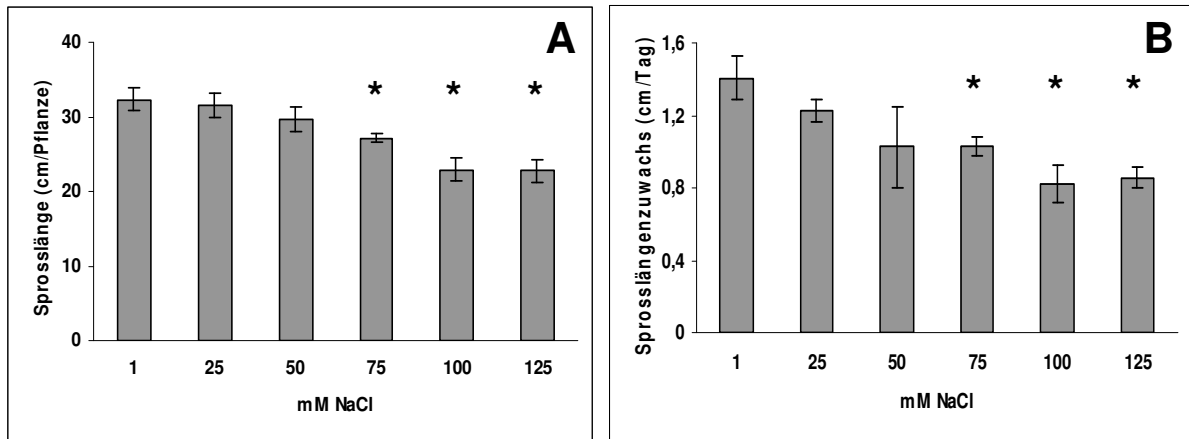


Abb. 7: Darstellung der mittleren Sprosslänge während des Erntezeitpunktes (A) und des mittleren täglichen Zuwachses der Sprosslänge in der Erntewoche (B) von Pflanzen der Kontrollvariante (1 mM NaCl) und den verschiedenen Behandlungsvarianten (25 – 125 mM NaCl). Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an (n = 4). Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollvariante (P = 5%).

3.1.3 Einfluss von Salzstress auf Blattlängenzuwachs und Blattfläche

Um zu überprüfen, welche Blattpaare zum Zeitpunkt der Ernte noch wachsen, wurden im Zeitraum von drei Tagen vor bis drei Tage nach dem potenziellen Erntetermin die Blattlängen mit einem Lineal gemessen (Länge zwischen Blattbasis und Blattspitze). Abbildung 8 zeigt den jeweiligen Blattlängenzuwachs im genannten Zeitraum. Bei allen Varianten weist das sechste Blatt die höchste Zuwachsrate auf. Es handelt sich hierbei jeweils um das jüngste der erfassten Blätter. Ab einer Behandlungsintensität von 50 mM NaCl waren zum Erntezeitpunkt noch nicht alle sechstjüngsten Blätter aufgefaltet. Dennoch wurde auch in diesen Fällen die Länge von Blattbasis bis Blattspitze erfasst.

Ergebnisse

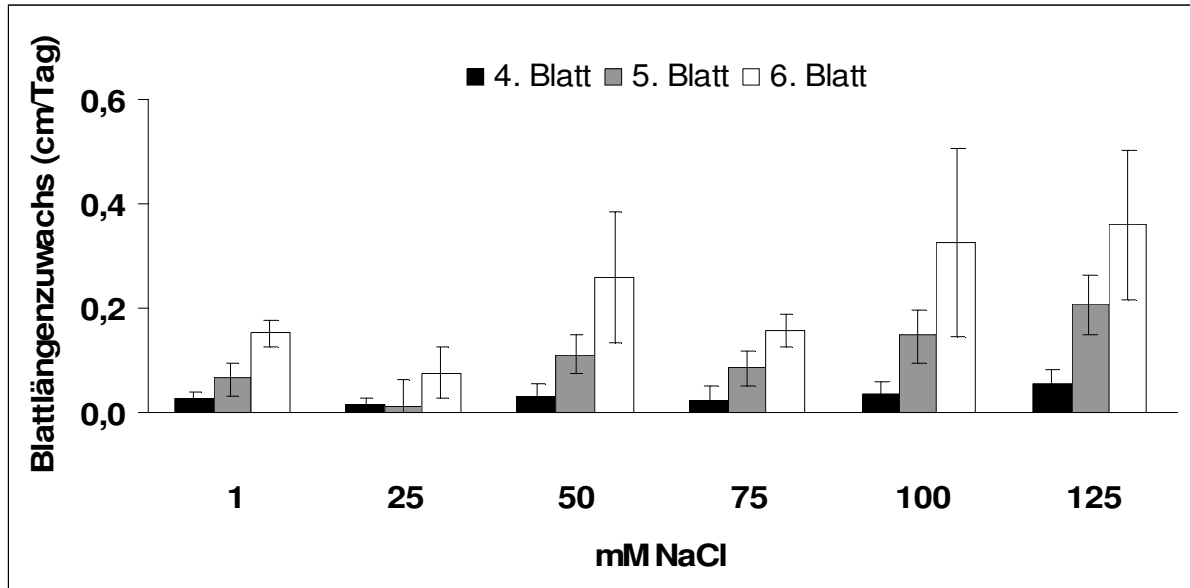


Abb. 8: Blattlängenzuwachs von Pflanzen der Kontrollvariante (1 mM NaCl) und den verschiedenen Behandlungsvarianten (25 – 125 mM NaCl) in der Erntewoche. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte des viert-, fünft- und sechsteltesten Blattes. Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an (n = 4). Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollvariante (P = 5%).

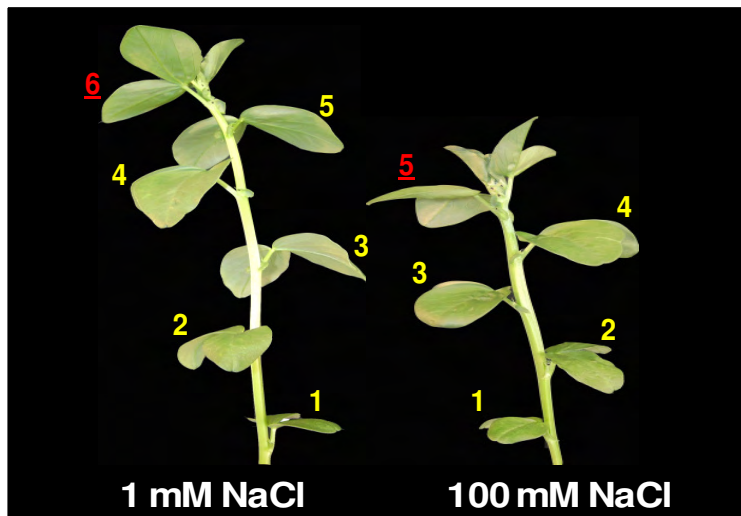


Abb. 9:

Repräsentative Darstellung der Pflanzenentwicklungsstufe der Kontrollvariante (1 mM NaCl) und der Behandlungsvariante (100 mM NaCl) zum Erntezeitpunkt. 1 steht dabei für das älteste Blattpaar, während die höheren Ziffern die entsprechend jüngeren Blatt-paare kennzeichnen. Rote Zahlen markieren das jeweils jüngste, aufgefaltete Blattpaar, welches für die weiteren Messungen ausgewählt wurde.

Bereits neun Tage nach Einstellen der vollen Behandlungskonzentration von 100 mM NaCl konnte bei gestressten Pflanzen ein gestauchtes Sprosswachstum beobachtet werden. Pflanzen unter Salzstress hatten ein Blattpaar weniger ausgebildet als die Kontrollvarianten zum gleichen Zeitpunkt (Abb. 9).

Ergebnisse

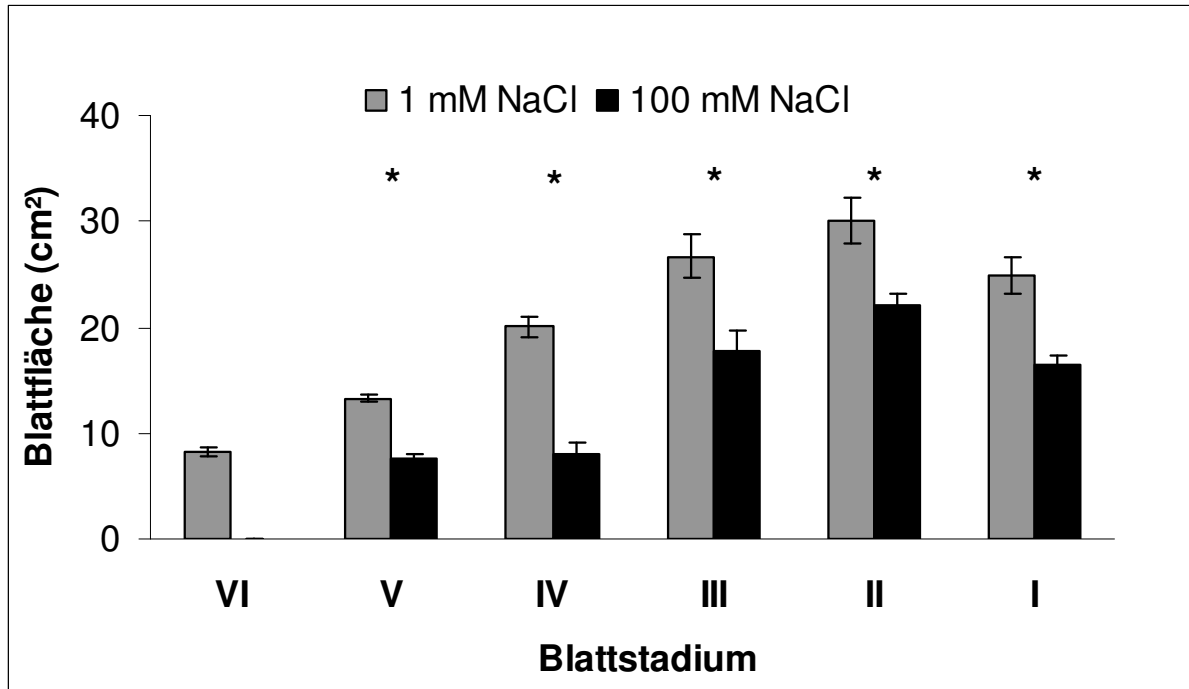


Abb. 10: Blattflächen der unterschiedlichen Blattstadien der Kontrollvariante (1 mM NaCl) und der Behandlungsvariante (100 mM NaCl). Die einzelnen Blattstadien sind hier nach ihrem Alter sortiert, wobei I für das jüngste aufgefaltete Blatt steht, während höhere Ziffern die entsprechend älteren Blattstadien markieren. Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an ($n = 4$). Sternchen stellen jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlungsvariante (100 mM NaCl) und Kontrollvariante (1 mM NaCl) innerhalb des jeweiligen Blattstadiums dar ($P = 5\%$).

Abbildung 10 zeigt die Blattflächenmittelwerte von Kontroll- und Behandlungspflanzen sortiert nach Blattalter. Im Vergleich zu den Kontrollvarianten sind die Blattflächen der jeweiligen gleichaltrigen Blattpaare der Behandlungsvarianten verringert und es besteht jeweils ein signifikanter Unterschied (nicht abgebildet). Bei Blattstadium VI ist kein Wert für die Behandlungsvariante dargestellt, weil diese wie oben erwähnt zum Erntezeitpunkt ein Blattpaar weniger entwickelt hat.

Die relative Wachstumsrate von den jeweils jüngsten aufgefalteten Blättern der Kontroll- und Behandlungsvariante werden in Abbildung 11 dargestellt. Es handelt sich hier jeweils um die Mittelwerte der Lichtphase (7.00 bis 21.00 Uhr) und der Dunkelphase (21.00 bis 7.00 Uhr) der Messdaten aus 5 Versuchsdurchgängen. Die relative Blattwachstumsrate ist insgesamt in der Dunkelphase höher als in der Lichtphase. Unter Salzstress ist die für diesen Zeitraum erfasste Blattwachstumsrate in der Lichtphase signifikant reduziert, während sie in der Dunkelphase nicht signifikant unter Einfluss von Salzstress verändert wird.

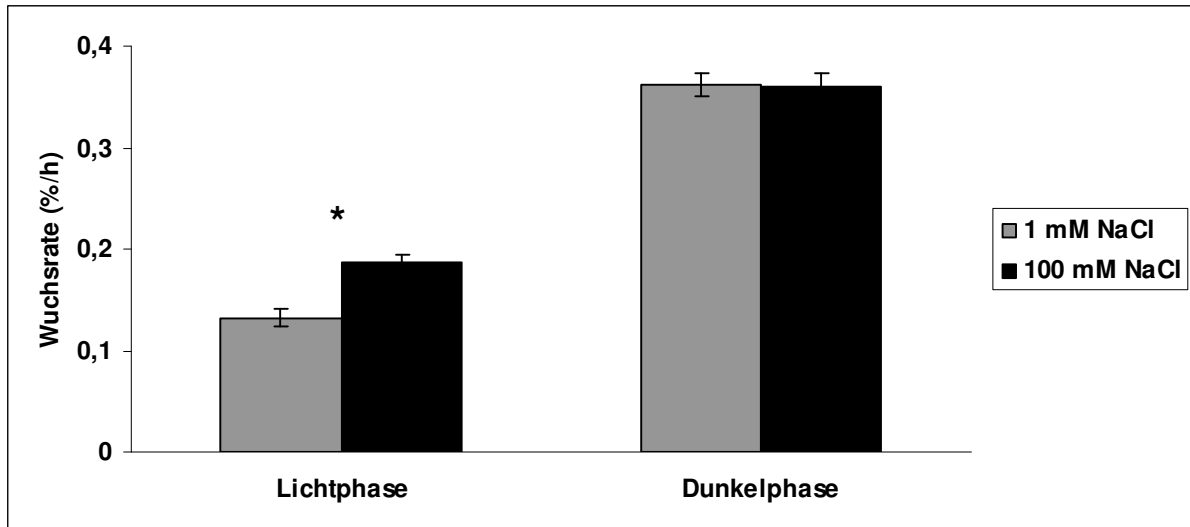


Abb. 11: Mittlere relative Wachstumsrate jeweils vom jüngsten aufgefalteten Blatt der Kontrollvariante (1 mM NaCl) und der Behandlungsvariante (100 mM NaCl) von *Vicia faba*, gemessen mit der digitalen Bildsequenzverarbeitung „DISP“. Messwerte wurden im Zeitabstand von drei Minuten erfasst und jeweils für die Lichtphase (Dauer jeweils 14 Std.) und die Dunkelphase (Dauer jeweils 10 Std.) gemittelt. Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an (n = 5). Das Sternchen zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrollvariante (P = 5 %).

3.2 Kationenverhältnisse von *Vicia faba* unter Salzstress

3.2.1 Ionenverhältnisse in Blatt, Spross und Wurzel

Um Aussagen über den Einfluss von Salzstress auf die Kationenkonzentration in verschiedenen Pflanzenorganen machen zu können, wurden die Konzentrationen von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium nach Trockenaufschluss am Atomabsorptionsspektrometer gemessen. Eine Behandlung mit 100 mM NaCl führte zu Veränderungen der Ionenkonzentration in Blatt, Spross und Wurzel (Abb. 12-14). Bis auf die Magnesiumkonzentration in der Wurzel besteht bei den jeweiligen Mittelwerten ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll- und Behandlungsvarianten. Die Konzentration von Natrium in Blatt, Spross und Wurzel ist bei den gestressten Varianten signifikant erhöht, während die Konzentration der anderen drei gemessenen Kationen signifikant vermindert ist.

Ergebnisse

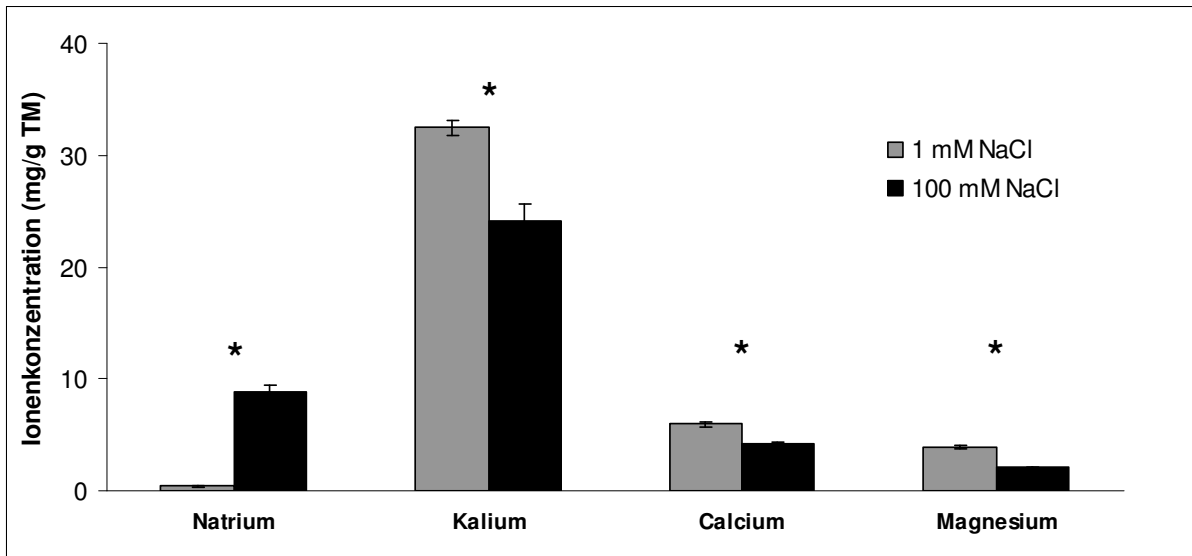


Abb. 12: Konzentration von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium im Blatt (nach Trockenaufschluss und AAS-Analyse). Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an (n = 5). Sternchen stellen jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlungsvariante (100 mM NaCl) und der zugehörigen Kontrollvariante (1 mM NaCl) dar (P = 5%).

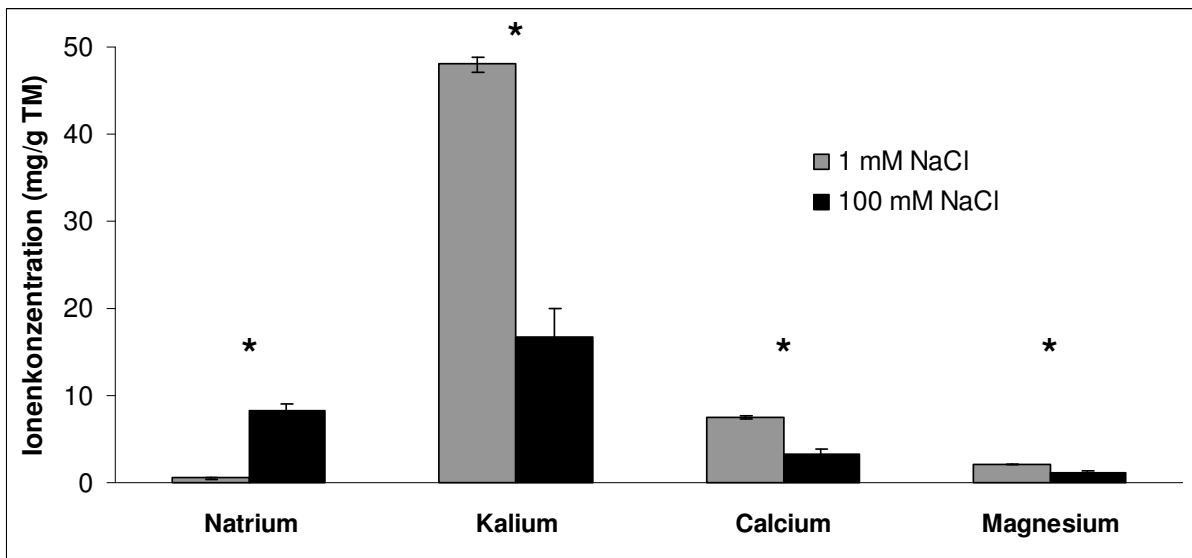


Abb. 13: Konzentration von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium im Spross (mit Blättern) nach Trockenaufschluss und AAS-Analyse. Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an (n = 5). Sternchen stellen jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlungsvariante (100 mM NaCl) und der zugehörigen Kontrollvariante (1 mM NaCl) dar (P = 5%).

Ergebnisse

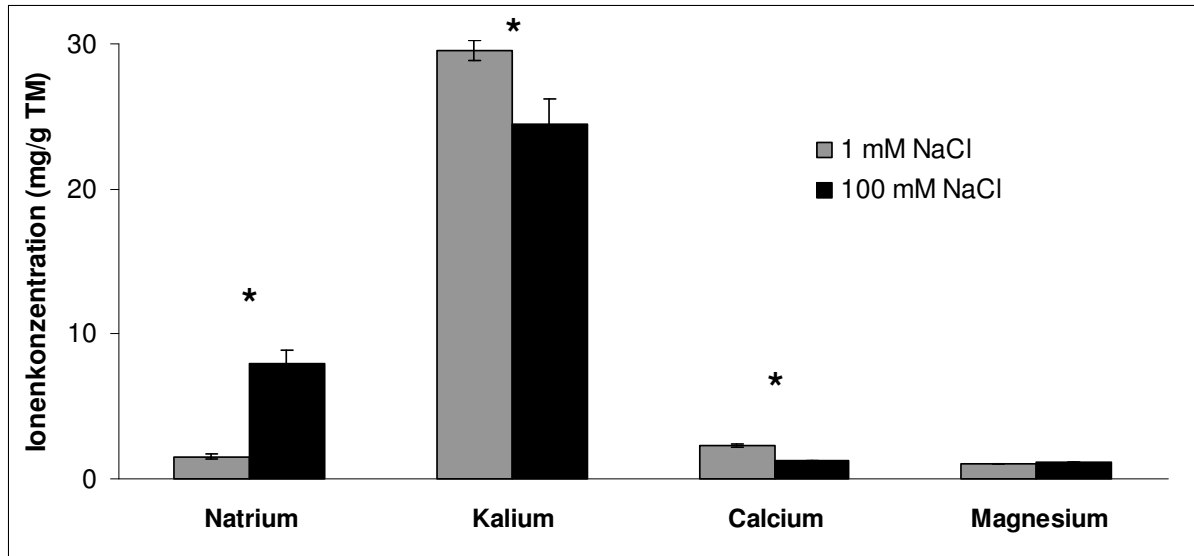


Abb. 14: Konzentration von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium in der Wurzel nach Trockenaufschluss und AAS-Analyse. Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an ($n = 5$). Sternchen stellen jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlungsvariante (100 mM NaCl) und der zugehörigen Kontrollvariante (1 mM NaCl) dar ($P = 5\%$).

3.2.2 Ionenverhältnisse in der apoplastischen Waschflüssigkeit und im

Zellsaft vom Blatt

Die apoplastischen Waschflüssigkeit wurde mit Hilfe der Infiltrations-Zentrifugations-Technik aus den Blättern extrahiert und die Ionenkonzentration mittels Atomabsorptionsspektrometrie ermittelt.

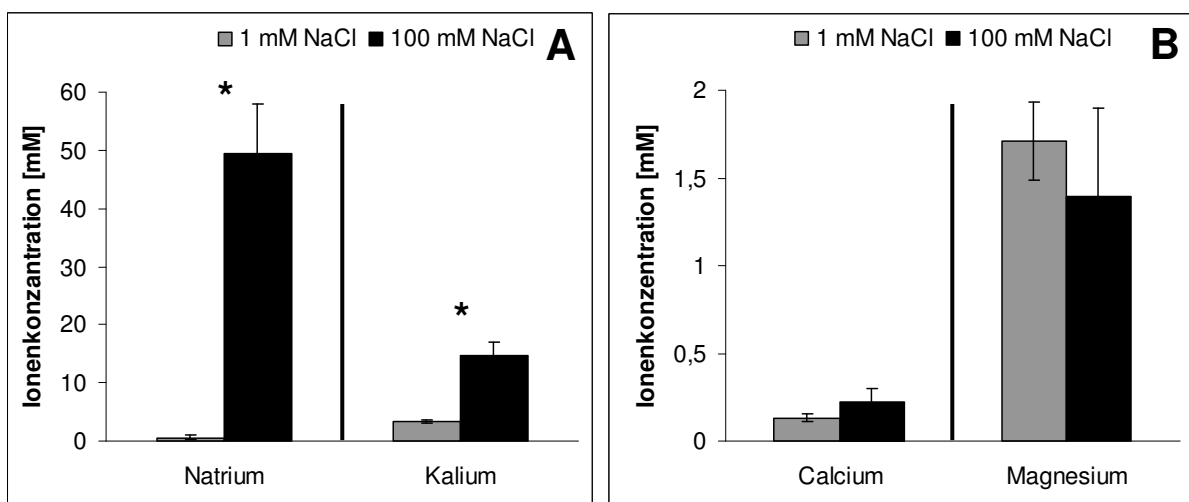


Abb. 15: Ionenkonzentration von Natrium und Kalium (A) und Calcium und Magnesium (B) in der apoplastischen Waschflüssigkeit aus dem Blatt. Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an ($n = 8$). Sternchen stellen jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlungsvariante (100 mM NaCl) und der zugehörigen Kontrollvariante (1 mM NaCl) dar ($P = 5\%$).

Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Natrium- als auch die Kaliumkonzentration in der apoplastischen Waschflüssigkeit in Blättern von Pflanzen unter Salzstress signifikant erhöht waren. Die Konzentrationen an Calcium und Magnesium hingegen wurden unter Salzstress nicht signifikant verändert (Abb. 15). Im Zellsaft wurde die Natriumkonzentration durch Salzstress signifikant erhöht, während die Konzentration der anderen drei gemessenen Kationen signifikant vermindert wurden (Abb. 16).

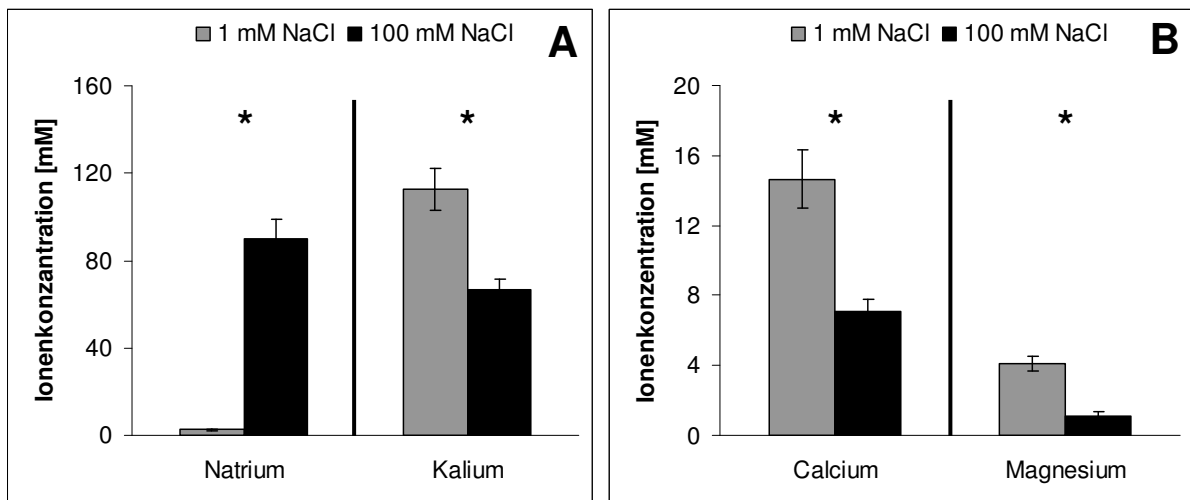


Abb. 16: Ionenkonzentration von Natrium und Kalium (A) und Calcium und Magnesium (B) im Zellsaft aus dem Blatt. Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an (n = 8). Sternchen stellen jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlungsvariante (100 mM NaCl) und der zugehörigen Kontrollvariante (1 mM NaCl) dar (P = 5%).

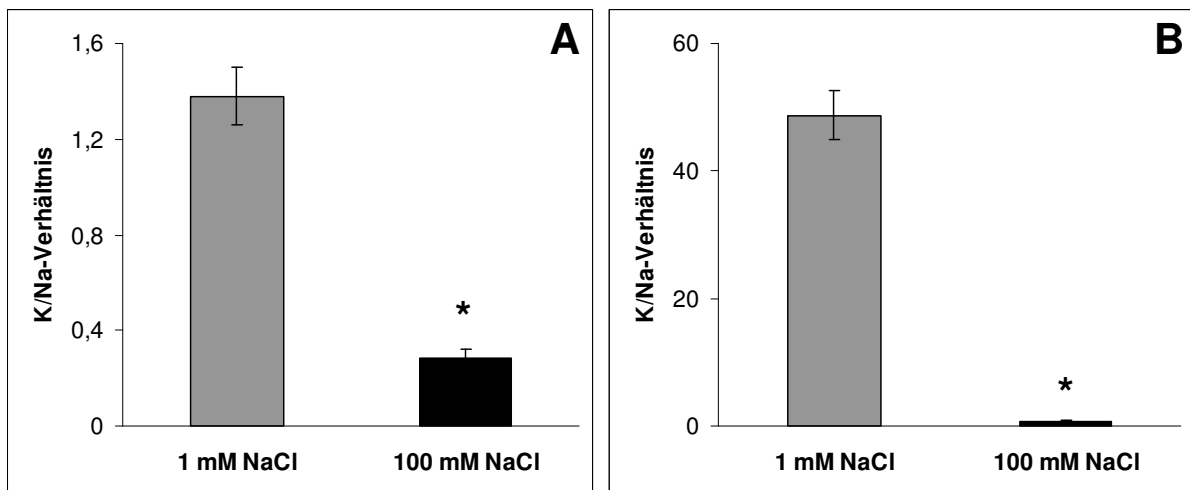


Abb. 17: Darstellung des K/Na-Verhältnisses in der apoplastischen Waschflüssigkeit (A) und im Zellsaft (B) im Blatt. Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an (n = 8). Sternchen stellen einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrollvariante dar (P = 5%).

Das Verhältnis von Kalium zu Natrium wurde durch eine Behandlung von 100 mM NaCl sowohl in der apoplastischen Waschflüssigkeit als auch im Zellsaft signifikant im Vergleich zur Kontrollvariante vermindert (Abb. 17).

3.3 Änderungen des pH-Wertes im Blattapoplasten von *Vicia faba* unter Salzstress

3.3.1 Bildverarbeitende Fluoreszenzmikroskopie

Die Messungen der mit der Eichlösung infiltrierten Blätter ergaben Falschfarbenbilder (Abb. 20) und die zugehörigen linearen Eichkurven (Abb. 19). Die Falschfarbenbilder der Kalibrierungen für alle drei eingesetzten Farbstoffe wurden visuell überprüft. Anhand der Falschfarbenbilder für die Kalibrierung mit allen eingesetzten Farbstoffen Oregon Green Dextran 488 (Abb. 20), Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran und Fluorescein-Tetramethyl-Rhodamin-Dextran (nicht abgebildet) war bei einer Anregung von 490 nm zu erkennen, dass die Farben sich mit steigendem pH-Wert vom grün-blauen Bereich zum gelb-roten Bereich veränderten. Bei der anderen für das Ratio-Verfahren eingesetzten Anregungswellenlänge von 440 nm blieben die Farbbereiche der Falschfarbenbilder trotz steigender pH-Werte bei allen drei eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen konstant (nicht abgebildet). Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass alle drei Farbstoffe bei einer Anregung von 490 nm auf eine pH-Änderung im Blattapoplasten mit einer Änderung ihrer Fluoreszenzintensität reagieren, während jene bei einer Anregung von 440 nm trotz pH-Änderung konstant blieb. Somit wurde die Ratio-Eignung aller drei eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe bestätigt.

Ergebnisse

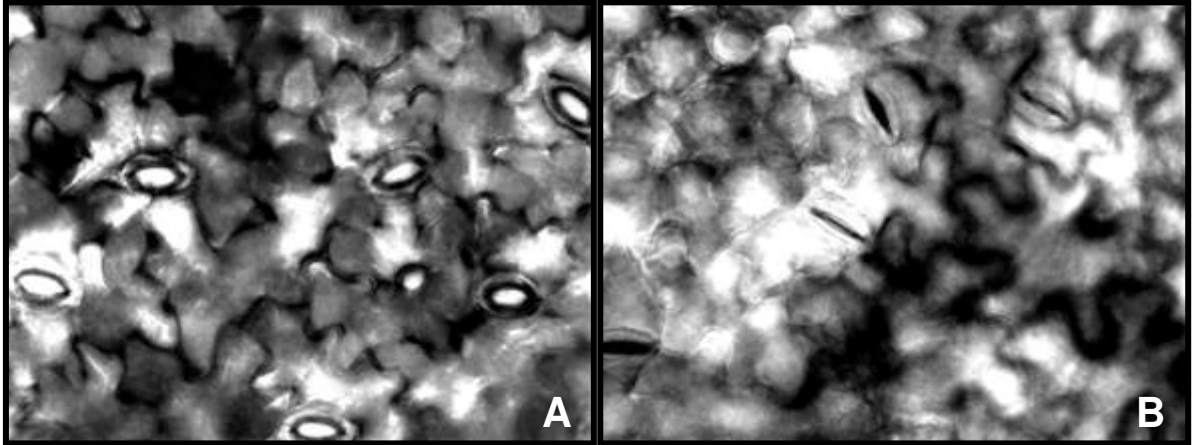


Abb. 18: Lichtmikroskopische Ausschnitte aus dem Blatt (adaxial) von *Vicia faba* (200-fach vergrößert). Die Spaltöffnungen sind unmittelbar nach dem Abschneiden des Blattes geöffnet (A). Infiltration des Blattes bewirkt eine sofortige Schließung der Spaltöffnungen (B).

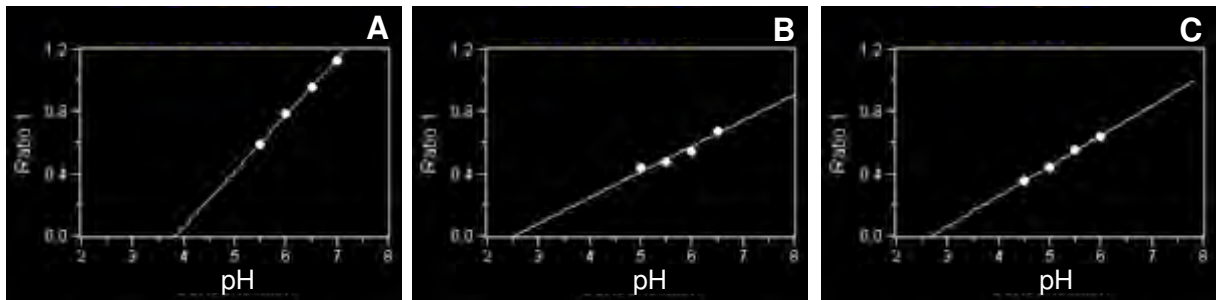


Abb. 19: *In vivo*-Kalibriergeraden für die Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran (A), FTMR-Dextran (B) und Oregon Green (C) nach Anregung bei 490 und 440 nm. Die Graphen zeigen die berechneten Ratio-Werte in Abhängigkeit der pH-Werte der infiltrierten Puffer-Farbstoffgemische.

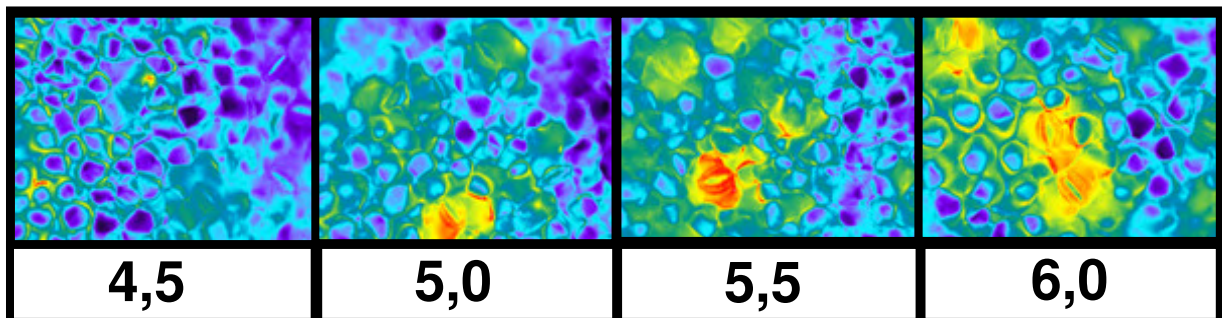


Abb. 20: Beispiel für eine Falschfarbendarstellung der zur *in vivo*-Kalibrierung eingesetzten Blattabschnitte bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm. Die Oregon-Green-Fluoreszenzintensität wurde bei einer Emission von 550 nm erfasst. Der Blattapoplast von *Vicia faba* wurde zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green (20 μ M) und MES-Puffer (100 mM) mit Hilfe der kompletten Vakuuminfiltrationsmethode infiltriert und pH-Werte im Bereich von 4,5 bis 6,0 eingestellt.

Ergebnisse

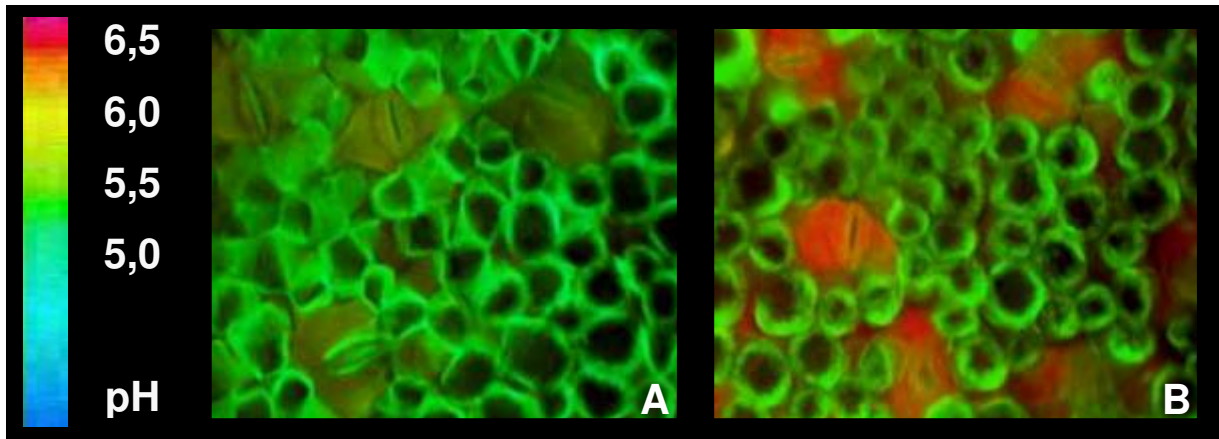


Abb. 21: Ratio-Bild (490/440 nm) von intakten Blättern von Pflanzen ohne Salzstress (A) und Pflanzen mit Salzstress (B) dargestellt in Falschfarben. Die Tetramethyl-Rhodamin-Fluoreszenzintensität wurde bei einer Emission von 550 nm erfasst. Auf der linken Seite der Abbildung ist die Farbskala mit den ermittelten pH-Werten aus der in-vivo-Kalibrierung.

	A	B	Blattgewebe abzüglich des stomatären Raums (A-B)
	Kompletter Blattausschnitt	Stomatärer Raum	
1 mM NaCl	5,3	5,6	5,2
100 mM NaCl	5,7 *	6,4 *	5,6 *

Abb. 22: Darstellung der mittleren pH-Werte in Abhängigkeit der Art des Gewebes im Blatt. In diesem Fall wurde der Farbstoff Tetramethyl-Rhodamin-Dextran (20 μ M) für die Ratio-Messungen eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 12 Wiederholungen. Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied ($P = 5\%$) zwischen der Behandlungsvariante (100 mM NaCl) und der jeweiligen Kontrollvariante (1 mM NaCl).

Die Ergebnisse aus den Messungen mit der bildverarbeitenden Fluoreszenzmikroskopie stellten einen signifikanten pH-Anstieg im Blattapoplasten von *Vicia faba* unter Salzstress (100 mM NaCl) dar (Abb. 23 und 23). Bereits durch eine visuelle Kontrolle der errechneten Ratio-Bilder in Falschfarben konnte ein farblicher Unterschied zwischen gestressten und nicht gestressten Pflanzen festgestellt werden (Abb. 21). Vor allem im Bereich um die Stomata herum war eine deutliche Rotfärbung zu erkennen. Die Auswertungen der kompletten Bildausschnitte ergaben nach Vakuumfiltration aller drei eingesetzten Farbstoffe einen signifikanten pH-Anstieg unter Salzstress bei *Vicia faba* (Abb. 23 und 23 A). Auch nach einer partiellen Infiltration mit Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran konnte dieser signifikante

pH-Anstieg ähnlich wie im Fall der Farbstoffinfiltration des kompletten Blattes festgestellt werden (Abb. 24 B).

Die in Abbildungen 23 und 24 demonstrierten pH-Werte wurden mit der Ratio-Imaging-Technik aus den gemittelten Daten eines kompletten Blattausschnittes ermittelt. Um herauszufinden, ob dieser pH-Unterschied unter Salzstress nur vom Effekt des stomatären Raumes ausgeht, der wie in Abbildung 21 B dargestellt deutlich rot gefärbt ist, wurden mit der Bildverarbeitungssoftware Meta Imaging System (Visitron, Puchheim) spezielle Regionen zur pH-Ermittlung markiert und miteinander verglichen. Die Untersuchungen zeigten, dass der signifikante pH-Anstieg des kompletten Blattausschnittes sowohl innerhalb des stomatären Raumes als auch in den Blattbereichen ohne Spaltöffnungen bestätigt werden konnte (Abb. 22). Um einen pH-unabhängigen Effekt auf die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen pH-Messungen im Blattapoplasten ausschließen zu können, wurden Blätter von gestressten und nicht gestressten Pflanzen anstelle der Fluoreszenzfarbstoffe mit entionisiertem Wasser infiltriert. Die Falschfarbenbilder und die zugehörigen Fluoreszenzintensitäten zeigten keine Unterschiede (nicht abgebildet) zwischen Blättern von gestressten und nicht gestressten Pflanzen. Ein möglicher Effekt von unter Salzstress veränderten Zellwandeigenschaften auf die Autofluoreszenz während der Messungen kann somit ausgeschlossen werden.

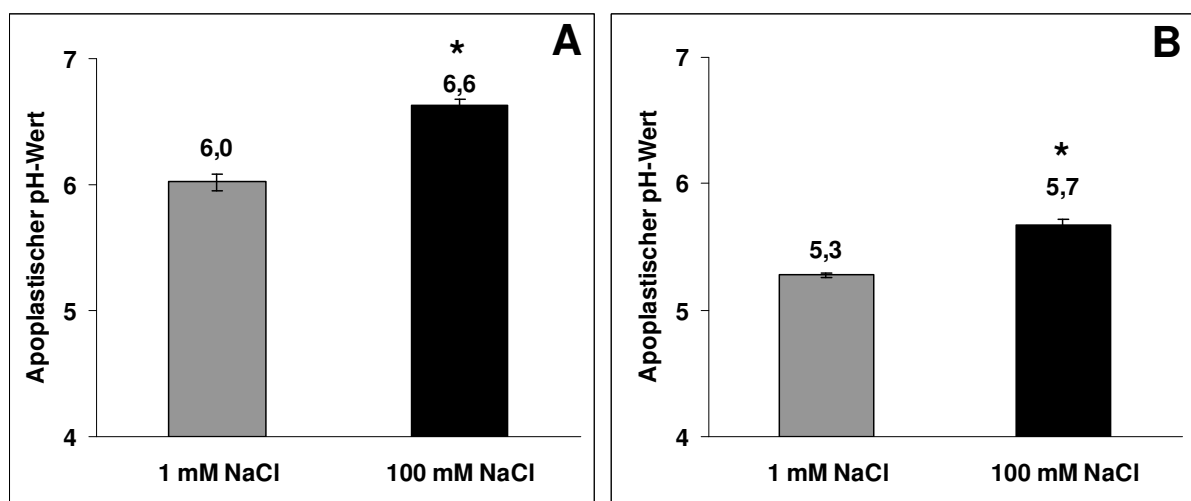


Abb. 23: Mit Ratio-Imaging ermittelter pH-Wert im Blattapoplasten von *Vicia faba* nach Vakuum-Infiltration mit Oregon-Green-Dextran (A) und Tetramethyl-Rhodamin-Dextran (B). Dargestellt sind Mittelwerte aus 12 Wiederholungen. Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied ($P = 5\%$) zwischen der Behandlungsvariante (100 mM NaCl) und der jeweiligen Kontrollvariante (1 mM NaCl). Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an.

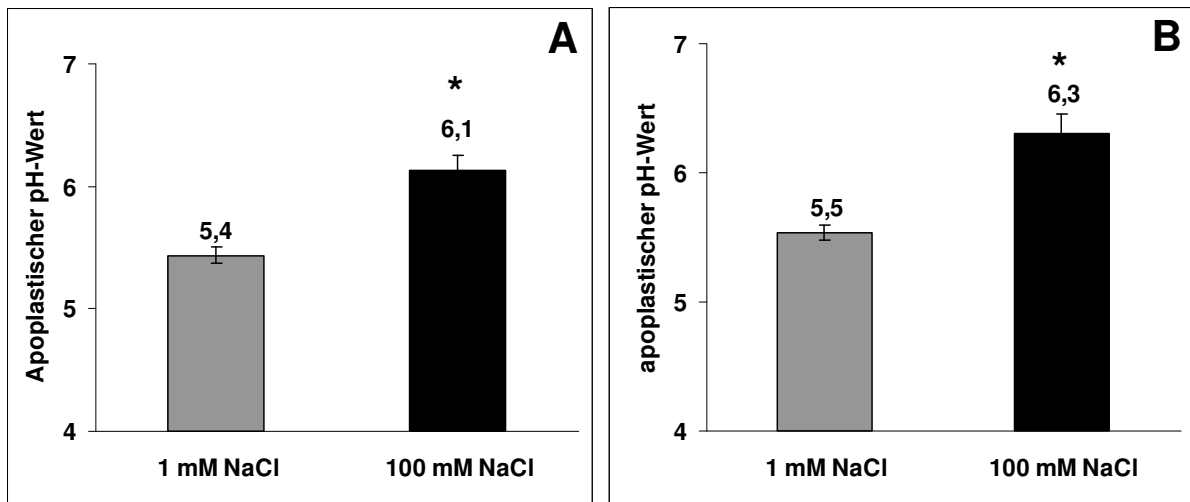


Abb. 24: Mit Ratio-Imaging ermittelter pH-Wert im Blattapoplasten von *Vicia faba* nach Vakuum-Infiltration mit Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran (A) und partieller Infiltration mit dem gleichen Farbstoff (B). Dargestellt sind Mittelwerte aus 12 Wiederholungen. Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied ($P = 5\%$) zwischen der Behandlungsvariante (100 mM NaCl) und der jeweiligen Kontrollvariante (1 mM NaCl). Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an.

3.3.2 Ionenselektive Mikroelektroden

Wie von Felle und Hanstein (2002) dargestellt, konnte in dieser Arbeit mit Hilfe von ionenselektiven Mikroelektroden bei abgeschnittenen Blättern von *Vicia faba* schon wenige Minuten nach Zugabe von 20 mM NaCl im Petiolenbad eine kurzfristige pH-Erhöhung von etwa 0,3 pH-Einheiten nachgewiesen werden (nicht abgebildet). Da sich diese Arbeit allerdings mit den langfristigen Folgen von Salzstress an der Wurzel beschäftigt, wurden Pflanzen wie in Kapitel 2.1 beschrieben angezogen und die Messung mit den pH-sensitiven Mikroelektroden wurde bei den Behandlungsvarianten nach neun Tagen voller Behandlung (100 mM NaCl) durchgeführt. Die Messungen zeigten einen signifikanten Anstieg des pH-Wertes im Blattapoplasten im stomatären Raum von *Vicia faba* unter Salzstress (Abb. 25).

Ergebnisse

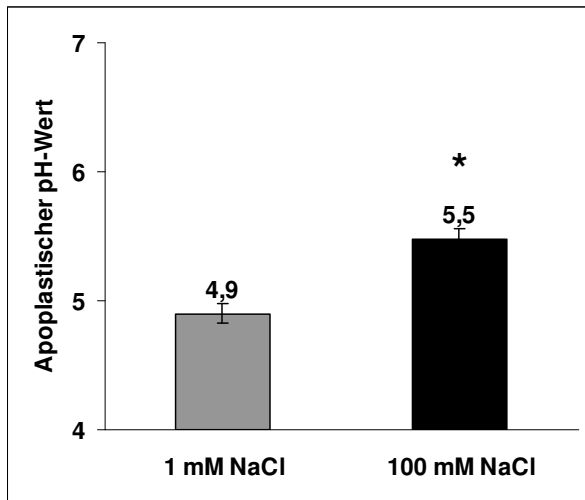


Abb. 25: pH-Wert im Blattapoplasten von *Vicia faba*. Die pH-Werte wurden mit pH-sensitiven Mikroelektroden aus den Spannungs-verhältnissen im stomatären Raum kontinuierlich gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus acht Wiederholungen. Das Sternchen zeigt einen signifikanten Unterschied ($P = 5\%$) zwischen der Behandlungsvariante (100 mM NaCl) und der Kontrollvariante (1 mM NaCl). Die Fehlerbalken stellen den jeweiligen Standardfehler dar.

Zur Kontrolle wurde die Reaktion des apoplastischen pH-Wertes auf einen Lichtwechsel aufgezeichnet (nicht abgebildet). Ein kurzfristiger pH-Anstieg nach dem Ausschalten des Lichtes und ein Abfall des pH-Wertes nach Lichteinschaltung zeigten, dass die Elektroden den Flüssigkeitsfilm im Blattapoplasten erreicht hatten und somit eine richtige Platzierung für die anschließende Messung sichergestellt war.

3.4 Zusammenhang von Wachstumsprozessen und pH-Wert im Blattapoplasten

3.4.1 Zusammenhang von apoplastischem pH-Wert und Wachstumsaktivität in Abhängigkeit der Blattregion

Die farbcodierten Wuchsverteilungsbilder zeigten einen deutlichen Basis-Spitze-Gradienten (Abb. 26). Die höchste Wachsrates war in der Blattbasis zu beobachten, während im Bereich der Blattspitze kaum noch Wachstumsaktivitäten nachgewiesen werden konnten.

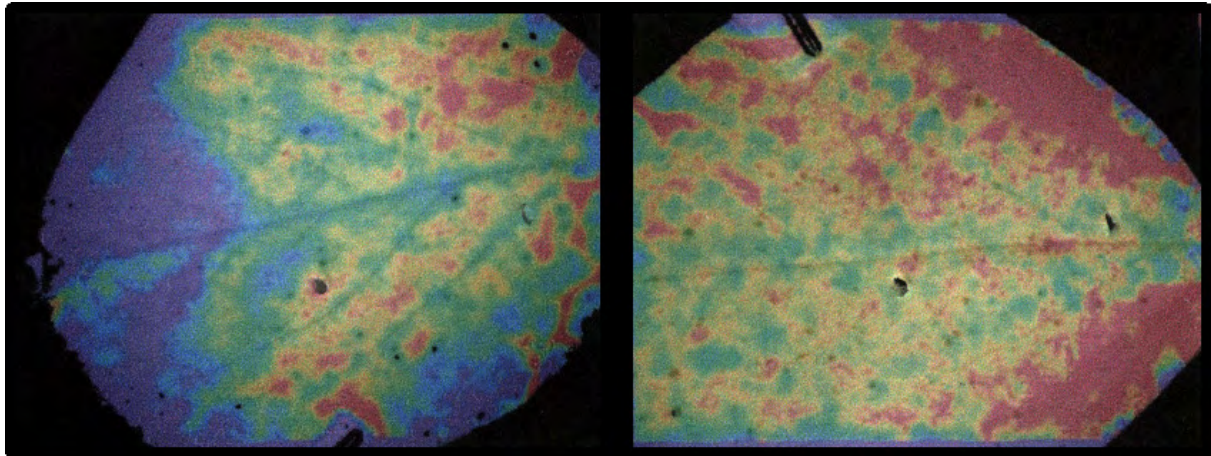


Abb. 26: Farbcodierte Wuchsratesverteilung am Beispiel von zwei Blättern von *Vicia faba* gemessen über drei Tage. Rottfärbung zeigt eine hohe Wachsrates (ca. 3 %/h), während eine Blaufärbung auf einen Wachsrates etwa gegen Null hinweist. Die Blattspitze befindet sich jeweils links.

Um zu untersuchen, ob auch der pH-Wert im Blattapoplasten einen Basis-Spitze-Gradienten bei *Vicia faba* aufweist, wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit der partiellen Infiltration des Fluoreszenzfarbstoffs Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran durchgeführt. Diese Farbstoffbeladungsmethode zeigte vergleichbare Ergebnisse wie die ursprüngliche Vakuuminfiltration eines kompletten Blattes (Abb. 24). Die partielle Infiltration, welche besonders gut für eine solche Messung von bestimmten Blattabschnitten geeignet ist, wurde somit eingesetzt, um einzelne Blattregionen unabhängig voneinander mit dem Fluoreszenzfarbstoff zu infiltrieren. Regionen aus Blattspitze, Blattmittelteil und Blattbasis wurden mit dieser Methode infiltriert und anschließend mit bildverarbeitender Fluoreszenzmikroskopie

gemessen. Allerdings konnte kein signifikanter pH-Unterschied im Blattapoplasten aus den genannten Blattabschnitten gefunden werden (nicht abgebildet).

3.4.2 Einfluss der Tageszeit auf die relative Blattwachstumsrate und den pH-Wert im Blattapoplasten

Bei *Vicia faba* war unter Standardbedingungen bei einer Messung über das komplette Blatt ein reproduzierbarer Wachstums-Tagesgang zu erkennen (Abb. 27). Das Wachstumsmaximum war am Tag-Nacht-Übergang zu beobachten und betrug bei der dargestellten Messung etwa 0,8 %/h. Das Minimum des Wachstums lag bei etwa drei Stunden nach Anschalten des Lichtes. Die Wuchsrate des wachsenden Blattes lag zu diesem Zeitpunkt etwa bei Null. Insgesamt war in der Dunkelphase (21.00 – 7.00 Uhr) eine deutlich erhöhte Wuchsrate gegenüber der Lichtphase (7.00 – 21.00 Uhr) zu beobachten. Unter Stressbedingungen (100 mM NaCl) konnte ein nahezu identischer Wachstums-Tagesgang beobachtet werden (Abb. 27). Während für die gemittelten Wachstumsraten in der Dunkelphase keine signifikanten Wachstumsunterschiede zwischen den gestressten und den nicht gestressten Pflanzen beobachtet werden konnten, bestand in der Lichtphase ein signifikanter Unterschied (Abb. 11, S. 29). Messungen mit der bildverarbeitenden Fluoreszenzmikroskopie „Ratio Imaging“ über 24 Stunden (im Zeitabstand von zwei Stunden) sollten Auskunft über den Tagesgang des pH-Wertes im Blattapoplasten von *Vicia faba* geben. Auch in diesem Fall war ein reproduzierbarer Verlauf im Tagesgang zu erkennen (Abb. 28). Der apoplastische pH-Wert des jüngsten aufgefalteten Blattes von *Vicia faba* unter Standardbedingungen lag in der Lichtphase (7.00 – 21.00 Uhr) zwischen 5,3 und 5,4. In der Dunkelphase sank der pH-Wert auf etwa 5,2 ab. Der niedrigste pH-Wert wurde in der Mitte der Dunkelphase erreicht und betrug 5,17.

Ergebnisse

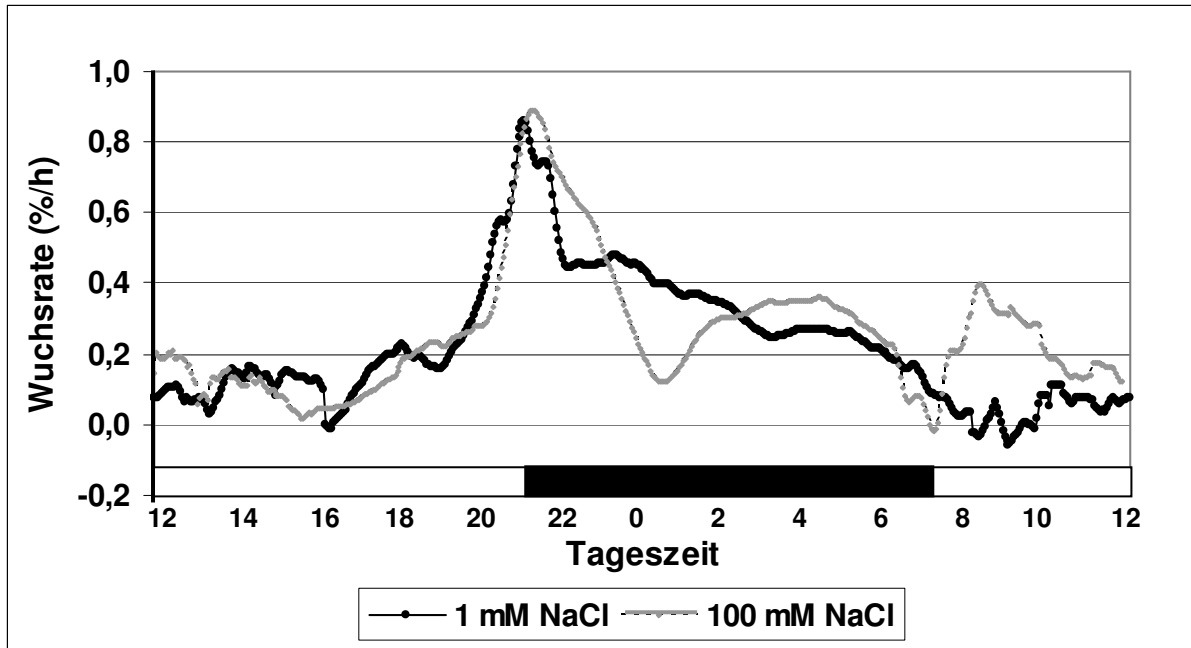


Abb. 27: Wachstums-Tagesgang vom jüngsten aufgefalteten Blatt von *Vicia faba*, gemessen mit der digitalen Bildsequenzverarbeitung „DISP“. Dargestellt sind Mittelwerte über den gesamten Bildbereich aus fünf Wiederholungen jeweils für die Kontrollvariante (1 mM NaCl, schwarz) und die Behandlungsvariante (100 mM NaCl, grau). Messwerte wurden im Zeitabstand von drei Minuten erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf Wiederholungen.

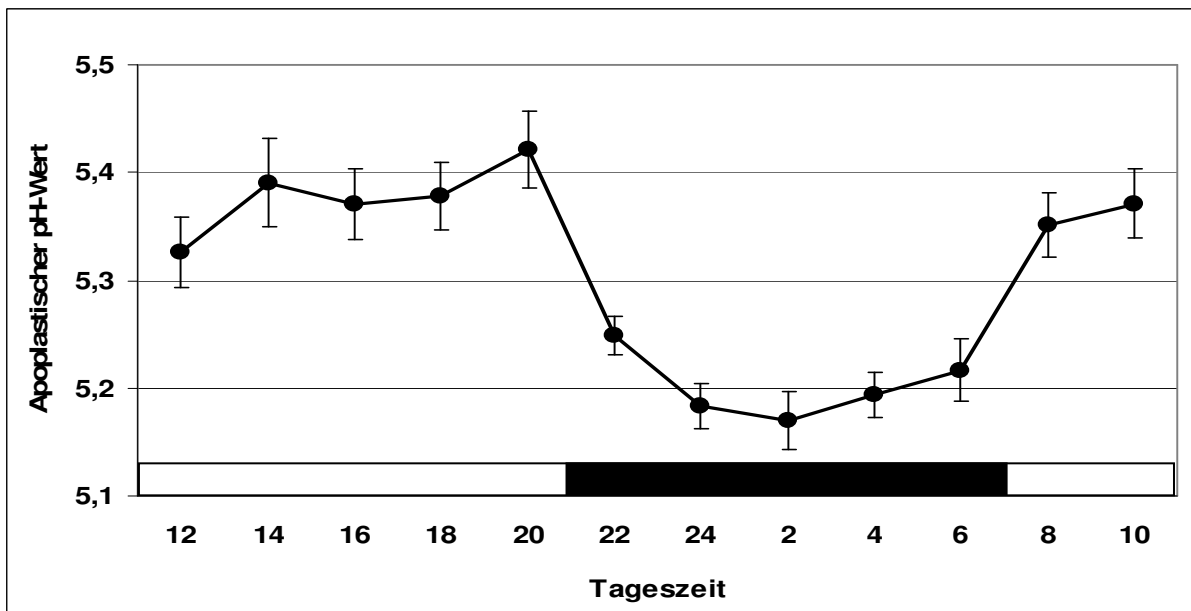


Abb. 28: Tagesgang des pH-Wertes im Blattapoplasten von *Vicia faba* (jüngstes aufgefaltetes Blatt), ermittelt mit der bildverarbeitenden Fluoreszenzmikroskopie „Ratio Imaging“ mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethyl-Rhodamine-Dextran. Dargestellt sind Mittelwerte aus acht Wiederholungen. Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar.

3.4.3 Einfluss des Blattalters auf die relative Blattwachstumsrate und den pH-Wert im Blattapoplasten

Der apoplastische pH-Wert wurde in allen Blattstadien, die zum Erntezeitpunkt messbar waren, mit bildverarbeitender Fluoreszenzmikroskopie nach Vakuumfiltration mit Tetramethyl-Rhodamin-Dextran (20 μM) gemessen und in Abbildung 29 dargestellt. Unter Blattstadium VII war das älteste Blatt zu verstehen, während Blattstadium I das jüngste zu messende Blatt bezeichnete. Dieses Blatt war zum Erntezeitpunkt zugleich das siebtälteste Blatt und es war größtenteils noch nicht aufgefaltet. Blattstadium II bezeichnete das jüngste aufgefaltete Blatt, welches für die meisten Messungen berücksichtigt wurde.

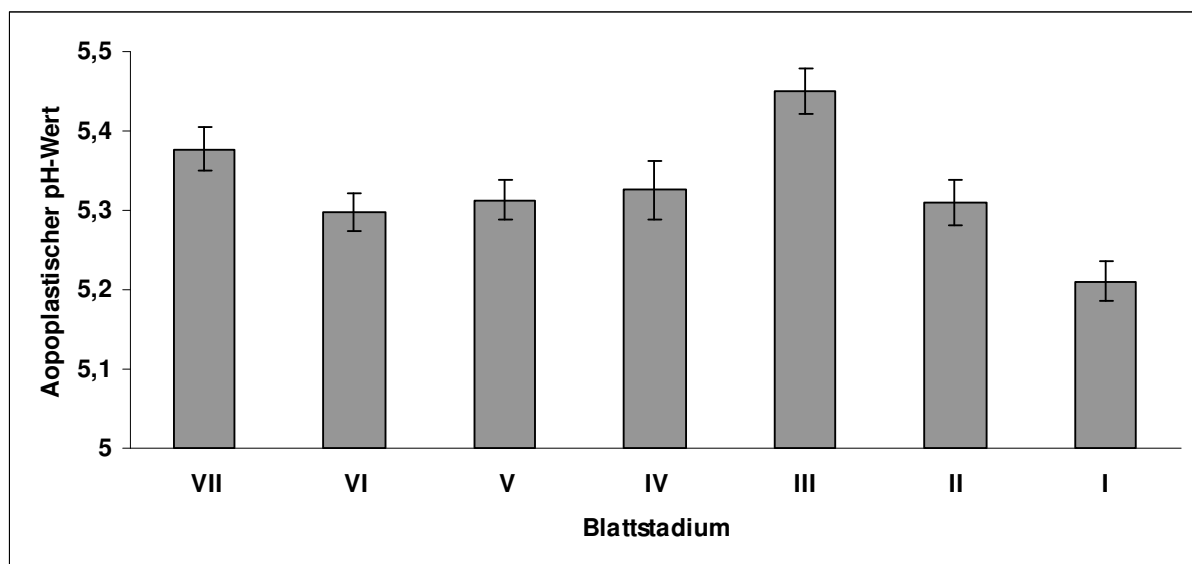


Abb. 29: Darstellung des apoplastischen pH-Wertes in Abhängigkeit des Blattalters gemessen mit bildverarbeitender Fluoreszenzmikroskopie nach Vakuumfiltration mit Tetramethyl-Rhodamin-Dextran (20 μM). I steht für das jüngste (siebtälteste) Blatt, während höhere Ziffern die entsprechend älteren Blattstadien markieren. Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an (n = 4).

In Abbildung 8 war zu erkennen, dass beim viertältesten Blatt (hier Blattstadium IV) kaum noch Wachstumsaktivitäten zum Erntezeitpunkt nachzuweisen sind. Ältere Blattstadien wiesen zu diesem Zeitpunkt noch geringere Wachstumsaktivitäten vor. Bei den Blättern mit zumindest noch moderaten Blattlängenzuwachsraten handelte es sich also um die jungen Blattstadien I bis III. Bei diesen Blättern war mit jüngerem Blattalter auch ein sinkender pH-Wert im Apoplasten zu erkennen. Ältere Blattstadien

Ergebnisse

wurden bei dieser Betrachtung aufgrund ihrer geringen bzw. fehlenden Wachstumsaktivität nicht berücksichtigt.

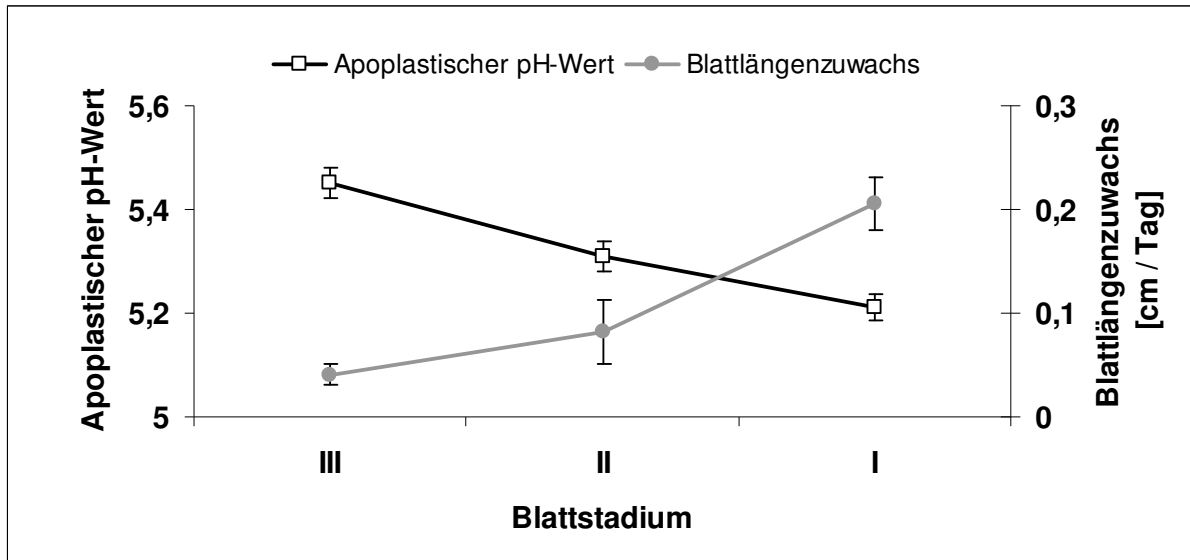


Abb. 30: Darstellung des Zusammenhangs zwischen apoplastischen pH-Wert und Blattlängenzuwachs in Abhängigkeit des Blattalters. I steht für das jüngste (siebtälteste) Blatt, während höhere Ziffern die entsprechend älteren Blattstadien markieren. Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an (n = 4).

Um die Daten vom apoplastischen pH-Wert in Abhängigkeit vom Blattalter aus Abbildung 29 und die Daten vom Blattlängenzuwachs von unterschiedlich alten Blättern in der Erntewoche von den unter Standardbedingungen aufgewachsenen Pflanzen aus Abbildung 8 zu vergleichen, wurden die entsprechenden Daten in Abbildung 30 zusammengefasst. Während bei den jüngsten noch wachsenden Blättern die Blattlängenzuwachsrates mit jüngerem Alter anstieg, fiel parallel in anderen Messungen auch der pH-Wert im Blattapoplasten dieser Blattauswahl mit jüngerem Alter ab. Es bestand daher eine negative Korrelation zwischen Blattlängenzuwachs und apoplastischem pH-Wert in Abhängigkeit vom Blattalter der gemessenen Blätter (Pearson: $r = -0,901$, Bestimmtheitsmaß: $B = 0,812$).

4 Diskussion

4.1 Methodische Ansätze zur quantitativen Bestimmung des apoplastischen pH-Wertes in Blättern

4.1.1 Eignung der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie

Der apoplastische Raum von intakten Blättern ist durch das Vorhandensein der Kutikula methodisch schwer zugänglich. Es gibt einige Methoden zur Ermittlung des pH-Wertes im Gewebe, von denen allerdings die meisten zur Messung an tierischen Zellen oder für Messungen im pflanzlichem Cytosol beziehungsweise in der Vakuole entwickelt wurden (Kurkdjian und Guern, 1989). Mit Hilfe ionensensitiver Fluoreszenzfarbstoffe ist eine quantitative Messung der freien Protonen im Apoplasten von lebenden Blättern möglich. Durch das Ratio-Verfahren wurde dabei die Fehlerquelle einer sehr wahrscheinlich vorkommenden inhomogenen Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes im Blattgewebe aufgehoben (Bright *et al.*, 1989). Schnelle zeitliche Änderungen und räumliche Verteilungen von Ionen im Apoplasten können mit dieser Technik *in vivo* erfasst werden (Hoffmann *et al.*, 1992; Hoffmann und Kosegarten, 1995; Mühling *et al.*, 1995; Mühling und Läuchli, 2000; 2001). Auch simultane Messungen (z.B. von pH und K-Konzentration im Blattapoplasten) sind möglich (Mühling und Läuchli, 2000). In vielen Arbeiten mit pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen wurde die Kalibrierung *in vitro* durchgeführt (Canny, 1987; Edwards *et al.*, 1988; Hoffmann *et al.*, 1992). Es ist davon auszugehen, dass die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Farbstoffe nicht nur von der Ionenkonzentration, sondern zum Teil auch von anderen Ionen und Molekülen abhängig ist (Plieth, 1995). Um diese Artefakte zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit eine *in vivo*-Kalibrierung von pH-Werten im Blattapoplasten von *Vicia faba* nach Mühling *et al.* (1995) durchgeführt. Hierbei wurden die lebenden Blätter mit dem jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff im Gemisch mit einem starken pH-Puffer (100 mM MES) mit unterschiedlich definierten pH-Werten infiltriert. Mit allen drei Farbstoffen ließ sich eine lineare Eichgerade der Ratio-Werte (490/440 nm) erzeugen, die für die Kalibrierung der pH-Werte angewandt wurde (Abb. 19, S. 34).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Eichgerade nach *in vivo*-Kalibrierung mit FITC-Dextran ebenso linear verlief wie die nach einer *in vitro*-Kalibrierung (Mühling *et al.*, 1995).

Bei der Anwendung der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie gibt es einige Dinge zu beachten, um Fehlinterpretationen der Ergebnisse zu vermeiden. Anhand der Abbildungen 23 und 24 (S. 36) lässt sich erkennen, dass der mit den verschiedenen Farbstoffen gemessene absolute pH-Wert im Blattapoplasten von *Vicia faba* unter gleichen Bedingungen verschieden hoch ist. Das ist damit zu erklären, dass die verschiedenen Farbstoffe verschiedene Affinitäten zu dem zu messenden Ion aufweisen (Bright *et al.*, 1987; Tsien, 1989). Es ist weiterhin denkbar, dass die drei eingesetzten Farbstoffe eine unterschiedliche Photostabilität aufweisen. Je geringer die Photostabilität desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es zur photochemischen Zersetzung des Farbstoffs kommt, was einer Abnahme der Farbstoffkonzentration gleichkommt (Bright *et al.*, 1987; , 1989). Da es bei den Messungen für diese Arbeit aber nie zu langen bzw. häufigen Belichtungen kam, ist diese Fehlerquelle zu vernachlässigen. Auch eine Auswaschung des Farbstoffs aus dem Blattgewebe heraus (Leaching) sollte bei diesem kurzen Zeitraum zwischen Beladung und Messung kaum eine Rolle spielen. Eine weitere mögliche Ursache für Fehlinterpretationen der Ergebnisse könnte die unterschiedliche Querempfindlichkeit der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe sein. Das bedeutet, dass die Fluoreszenzintensitäten geringfügig von anderen Ionen als der zu messenden Ionen beeinflusst werden. So kann es beispielsweise je nach Eignung zur spezifischen Ionenbindung eines Fluoreszenzfarbstoffes zu einer Konkurrenz von verschiedenen Ionen an den Bindungsstellen des Farbstoffes geben (Mühling, 1998). Die Fluoreszenz der Farbstoffe kann somit von anderen Ionen leicht erhöht oder vermindert („gequencht“) werden (Plieth, 1995).

Das Abschneiden der Blätter von der Pflanze dürfte für die Messungen in dieser Arbeit nicht zu abweichenden Ergebnissen führen, da die Farbstoffbeladung und die anschließende Messung innerhalb weniger Minuten nach dem Abschneiden erfolgt. Ein Austrocknen der Blätter der prinzipiell trockenstressempfindlichen Ackerbohne kann aufgrund der erfolgten Infiltration ausgeschlossen werden. In der Literatur wird beschrieben, dass das Abschneiden der Blätter keine Auswirkungen auf die

Wachstumsänderung unter Salzstress hat (Neves-Piestun und Bernstein, 2001). Demnach dürfte das Abschneiden der Blätter in dieser Arbeit auch keine störenden Effekte hervorgerufen haben.

Nebenwirkungen auf die Zellphysiologie durch die Vakuuminfiltration mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen können nicht ausgeschlossen werden. Dies gilt vor allem für Messungen mit einer langen Verweildauer des Farbstoffes im Blatt. In dieser Arbeit wurden die Messungen allerdings direkt nach der Farbstoffinfiltration durchgeführt, so dass es sich nur um eine kurze Verweildauer von maximal fünf Minuten handelte. Mit einem Eindringen der relativ großen Dextranverbindungen in den Symplasten ist in diesem Fall nicht zu rechnen (Hoffmann *et al.*, 1992; Hoffmann und Kosegarten, 1995). Die α -1,6-glycosidischen Bindungen der verwendeten Dextrane können von den meisten Organismen nicht verstoffwechselt werden (Haugland, 1996). Der Infiltrationsvorgang, der für die Infiltrations-Zentrifugationsmethode und für die Farbstoffbeladung für die Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt wurde, bringt einige Risiken mit sich, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Für die Darstellung der Dynamik des apoplastischen pH-Wertes eines Objektes als Reaktion auf verschiedene (induzierte) Umwelteinflüsse über einen Zeitraum von mehreren Stunden ist eine Methode einschließlich einer Infiltrationsbeladung nur bedingt geeignet, weil die Nebenwirkungen der Infiltration und die anschließend eintretende Resorption des infiltrierten Flüssigkeitsvolumens zusätzliche Effekte bewirken. Für *Vicia faba* konnte gezeigt werden, dass der apoplastische pH-Wert durch einen Infiltrationsprozess um etwa 1,5 pH-Einheiten erhöht wurde und erst nach etwa zwei Stunden wieder den ursprünglichen Wert erreichte (Felle und Hanstein, 2002). Mühling (1998) verwies auf einen deutlichen pH-Anstieg nach Infiltration des Apoplasten im Vergleich zu nicht infiltrierten Blättern. Es gibt mehrere mögliche Gründe für diese pH-Erhöhung als Folge des Infiltrationsvorganges. Durch den induzierten Sauerstoffmangel im Blattapoplasten könnten die Zellen mit einer Ansäuerung des Cytosols und einer Deaktivierung der Plasmalemma- H^+ -ATPase reagieren, so dass der apoplastische pH-Wert ähnlich wie nach einer künstlichen Deaktivierung dieser Protonenpumpe ansteigt (Mühling, 1998; Felle und Hanstein, 2002). Allerdings wurde gezeigt, dass die Atmung bei verschiedenen Pflanzen trotz Vakuuminfiltration nicht beeinträchtigt wurde (MacDonald, 1975). Nicht zu vernachlässigen wäre auch der durch die Infiltration

erzeugte mechanische Stress (Felle und Hanstein, 2002). Aufgrund der einfließenden Flüssigkeit wirken Adhäsivkräfte auf Zellwand und Plasmalemma, was diverse Kanäle öffnen könnte, welche wiederum Ionen und organische Säuren ausscheiden könnten (Grignon und Sentenac, 1991; Felle und Hanstein, 2002). Auch die Verdünnung der im apoplastischen Flüssigkeitsfilm vorhandenen Ionen kann einen steigernden Effekt auf den pH-Wert haben (Mühling, 1998). Ein weiterer Hinweis auf Nebenwirkungen durch die Infiltration ist, dass die Reaktion des apoplastischen pH-Wertes auf einen Lichtwechsel geringer als bei nicht infiltrierten Blättern ist (Mühling, 1998; Felle und Hanstein, 2002). Bei der Infiltration für die hier angewandte Fluoreszenzmikroskopie sei dabei aber zu beachten, dass dieser Vorgang auch schon bei der Kalibrierung stattgefunden hat und der genannte Infiltrationseffekt auf den pH-Wert somit für die anschließenden Messungen schon berücksichtigt wird. Ein weiterer Nachteil ist die Verdünnung der apoplastischen Ionenkonzentration aufgrund der Infiltration. Dieser Fehler wird mit einem pflanzenspezifischen Verdünnungsfaktor ausgeglichen, der sich auf das jeweilige apoplastische Volumen bezieht (Coester, 2000; Lohaus *et al.*, 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Stomata nach einer Infiltration geschlossen sind (Abb. 18, S. 34). Eine Stomataschließung ist mit einer Konzentrationsänderung von Protonen im Apoplasten gekoppelt (Edwards *et al.*, 1988) und eine Fehlinterpretation wäre somit denkbar. Außerdem wurde gezeigt, dass der apoplastische pH-Wert im Bereich von geschlossenen Stomata höher ist als bei geöffneten Stomata (Bowling und Edwards, 1984; Edwards *et al.*, 1988). Letztendlich sei zu sagen, dass der Infiltrationsvorgang in dieser Arbeit auch schon bei der *in vivo*-Kalibrierung durchgeführt wurde, was potenzielle Fehlerquellen für Messungen nach diesem Prozess entsprechend verringert.

Es gibt Alternativen zur Infiltrationsbeladung des Fluoreszenzfarbstoffes. Eine Beladungsmethode ohne einen Infiltrationsvorgang wäre beispielsweise die Beladung des Blattes über den Blattstiel. Der Farbstoff wird dazu aufgrund des Transpirationssoges zusammen mit einem „Nährstoffcocktail“ über einen abgeschnittenen Blattstiel aufgenommen (Hoffmann *et al.*, 1992). Hierbei sei allerdings zu berücksichtigen, dass der Fluoreszenzfarbstoff lange im Blattgewebe verweilt, bevor es zur Messung kommt, was wiederum die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Nebenwirkungen erhöht. Eine weitere Beladungsmöglichkeit wäre die

Infusionsmethode mit Hilfe von Druckgefäßen (Heckenberger *et al.*, 1996). Hierbei könnte zum Beispiel ein Fluoreszenzfarbstoff über eine Mittelrippe eines abgeschnittenen Blattes zugefüttert werden und dann auch in andere Pflanzenteile gelangen. Somit wäre es möglich, Messungen des Blattapoplasten von nicht abgeschnittenen Blättern durchzuführen (Mühling, 1998). Die von Gao *et al.* (2004) angewandte Methode ist eine weitere Möglichkeit zur quantitativen, fluoreszenzmikroskopischen Ionenmessung ohne einen Infiltrationsvorgang. Hierbei werden transgene Pflanzen eingesetzt, welche die pH-Indikatoren selbst exprimieren können. Diese Methode ist allerdings sehr zeitintensiv, da zunächst transgene Pflanzen erzeugt werden müssen.

4.1.2 Beurteilung der eingesetzten pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffe

Viele kommerziell erhältliche Fluoreszenzfarbstoffe sind zur Messung von Ionenkonzentrationen im Cytoplasma erstellt worden und meist für einen pH-Bereich von über 7 abgestimmt (Tsien, 1989). Tabelle 2 zeigt die drei pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffe, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, um den apoplastischen pH-Wert in lebenden Blättern von *Vicia faba* zu messen. Sie sind für Messungen im Milieu von einem pH-Wert unter 7 einsetzbar. Alle drei Farbstoffe sind für *in vivo*-Messungen im Blattapoplasten geeignet, weil es sich um Dextranverbindungen mit großem Molekulargewicht (10 kDa) handelt und sie daher über einen relativ langen Zeitraum im Apoplasten verweilen (Hoffmann *et al.*, 1992; Hoffmann und Kosegarten, 1995). Eine Aufnahme der Farbstoffe in den Symplasten kann somit für den Zeitraum der Messungen ausgeschlossen werden, da die Messungen jeweils spätestens 15 Minuten nach der Farbstoffinfiltration erfolgten. Zeitlich bedingte Effekte der Farbstoffinfiltration des Blattgewebes wurden für einen Zeitraum von bis zu 30 Minuten nach der Vakuuminfiltration überprüft und es konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (nicht abgebildet). Alle drei Farbstoffe sind für das vorhandene System geeignet, was die Anregungswellenlängen und die Emissionsmaxima betrifft. Der weit verbreitete Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran (FITC) hat seinen isobestischen Punkt bei 427 nm (Plieth, 1995) und ist als Ratio-Farbstoff im pflanzlichen Apoplasten innerhalb eines pH-Bereichs von 5,0 bis 7,0 geeignet (Oparka, 1991; Hoffmann und Kosegarten, 1995; Mühling *et al.*, 1995; Fricker *et al.*, 2001; Hawes und Satiat-Jeunemaitre, 2001).

Fluorescein-Tetramethyl-Rhodamin-Dextran (FTMR) ist ein weiterer in dieser Arbeit verwendeter Fluoreszenzfarbstoff, der für Messungen im pflanzlichen Gewebe für einen pH-Bereich von 5,0 bis 8,0 eingesetzt werden kann. Dieser Farbstoff weist keinen isobestischen Punkt auf, ist aber dennoch für ratiometrische Fluoreszenzmessungen geeignet. Das ist damit zu begründen, dass er aus der pH-sensitiven Komponente Fluorescein und der pH-insensitiven Komponente Rhodamin zusammengesetzt ist (Van Weert *et al.*, 1995; Chen und Arriaga, 2006; Fuglsang *et al.*, 2007). Der dritte in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green Dextran 488 weist eine besonders hohe Photostabilität auf und mögliches Photobleaching wird so vermieden (Vergne *et al.*, 1998). Auch hier handelt es sich um einen für ratiometrische Messungen geeigneten Fluoreszenzfarbstoff, der in einem sauren pH-Bereich bis zu 3,5 eingesetzt werden kann (Fasano *et al.*, 2001; Fricker *et al.*, 2001; Hawes und Satiat-Jeunemaitre, 2001; Rober-Kleber *et al.*, 2003).

4.1.3 Einschätzung der Eignung der pH-Messung im Blattapoplasten mit Hilfe pH-sensitiver Mikroelektroden

Die mit der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie ermittelten pH-Werte nach Vakuuminfiltration sollten aufgrund des Infiltrationsvorgangs und der unterschiedlichen Eignung der Farbstoffe in jedem Fall nur relativ betrachtet werden. Aufgrund der möglichen Störeinflüsse kann man davon ausgehen, dass die hier ermittelten Werte nicht den absoluten pH-Wert im Blattapoplasten wiedergeben. Aus diesem Grunde wurde der apoplastische pH-Wert im Blatt von *Vicia faba* mit einer weiteren Methode, der Mikroelektrodentchnik, gemessen. Im Gegensatz zu vielen anderen Methoden zur pH-Ermittlung im Apoplasten handelt es sich hierbei um eine nicht invasive Methode (Hanstein und Felle, 1999). Bei dieser Technik ist keine Infiltration notwendig, was viele der bereits erwähnten Fehlermöglichkeiten ausschließt. Da es sich hierbei um eine Differentialmessung handelt, können mögliche Fehlerquellen durch den Einsatz einer zweiten Elektrode verhindert werden. Es gibt bei diesen Messungen nur sehr wenig „Hintergrundrauschen“ und es besteht eine sehr gute Reproduzierbarkeit (Yu *et al.*, 2000). Die Blätter müssen bei der Anwendung dieser Methode nicht zwangsläufig abgeschnitten werden. Bei der Fluoreszenzmikroskopie wäre eine Messung an nicht abgeschnittenen Blättern lediglich an Blättern denkbar, die mit der partiellen Infiltrationsmethode mit einem

Fluoreszenzfarbstoff beladen werden. Die meisten Beladungstechniken erfordern allerdings das Abschneiden des Blattes. Mit Hilfe der Mikroelektroden ist es möglich eine Dynamik von Ionen im Zeitverlauf zu erfassen (Peters und Felle, 1991). Dies ist zwar mit der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie auch möglich (Mühling und Läubli, 2000), aber in diesem Fall müsste man auch die Nebenwirkungen des Farbstoffes, der in dem Fall ja länger im Blattgewebe verweilen müsste, in Kauf nehmen. Obwohl es sich hierbei um eine nicht invasive Methode handelt (Hanstein und Felle, 1999), können beim Einführen der Elektroden in die Spaltöffnungen Irritationen am Blattgewebe und somit Beeinflussung der gemessenen Spannung nicht ausgeschlossen werden. Diese potenzielle Fehlerquelle wird durch die Anwendung der hitzepolierten und somit stumpfen Elektroden minimiert. Dennoch kann der gemessene pH-Wert durch diese mechanische Störung verändert werden. Daher werden die Messungen erst durchgeführt, sobald sich ein konstantes Signal eingependelt hat (Felle, 1998). Mit pH-sensitiven Mikroelektroden kann man nur an einem Punkt der Zelle messen und eine Änderung der Elektrodenpositionierung während der Messung ist nur schlecht möglich. Die Messungen können hierbei nur im stomatären Raum stattfinden und können jeweils nur punktuell stattfinden. Es gibt große Unterschiede zwischen den pH-Werten von verschiedenen Geweben und Zelltypen (Grignon und Sentenac, 1991). Für die Betrachtung von pH-Gradienten innerhalb eines Blattes wäre daher eher eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zu empfehlen, bei der man allerdings den Infiltrationsvorgang bei der Vakuuminfiltrationsbeladung oder die lange Aufenthaltszeit des Farbstoffes im Gewebe im Falle der Beladung über die Petiole mit Hilfe der Transpiration hinnehmen muss. Eine weitere Alternative wäre die Anwendung von vibrierenden ionensensitiven Mikroelektroden, welche nicht nur an einem Punkt messen (Jones *et al.*, 1995; Shabala und Newman, 1999; Shabala, 2000). Die Anwendung von Mikroelektroden erfordert lange Vorbereitungszeiten, viel Übung und Erfahrung (Gilroy *et al.*, 1993). Die Mikroelektroden sind käuflich nicht zu erwerben und müssen daher unter großem Zeitaufwand selbst hergestellt werden (Yu *et al.*, 2000).

Es lässt sich zusammenfassen, dass die bekannten Methoden zur Messung des pH-Wertes im Blattapoplasten je nach Fragestellung unterschiedlich geeignet sind (Yu *et al.*, 2000). Beide in dieser Arbeit angewandten Methoden erbrachten pH-Werte für den Blattapoplasten, die mit denen aus der Literatur übereinstimmen (Hanstein und

Felle, 1999). Wichtig ist dabei, dass man sich den jeweiligen Gefahren zur Fehlinterpretation der Ergebnisse bewusst ist. Eine Kombination verschiedener *in vivo*-Methoden, wie sie in dieser Arbeit angewandt wurde, ist zu empfehlen, weil mögliche Fehlerquellen somit vermindert werden.

4.2 Einfluss von Salzstress auf die subzellulären Ionenverhältnisse in Blättern von *Vicia faba*

4.2.1 Ionenverhältnisse im Gesamtblatt

Pflanzen unter Salzstress weisen eine gehemmte Ionenaufnahme über die Wurzel auf und es findet somit eine Verschiebung der Ionenverhältnisse statt (Greenway und Munns, 1980; Grattan und Grieve, 1999; Essa, 2002). Da die gestressten Pflanzen (100 mM NaCl) in dieser Arbeit zum Erntezeitpunkt und mindestens sieben Tage nach dem potenziellen Erntezeitpunkt noch keinerlei Schadsymptome an den Blättern aufwiesen, kann man davon ausgehen, dass sie sich zum Erntezeitpunkt noch in der ersten Phase des Salzstress befinden. Dies konnte für diese Behandlungsdauer und -intensität bei *Vicia faba* bestätigt werden (Slabu, 2005). Jedoch ist klar zu erkennen, dass es zum Erntezeitpunkt bereits zu Verschiebungen der Ionenverhältnisse in Wurzel, Spross und Blatt gekommen ist (12-14, S. 30 f.). Zum Zeitpunkt der Ernte ist für die Pflanzen in dieser Arbeit demnach ein allmählicher Übergang in die zweite Phase von Salzstress nicht auszuschließen.

NATRIUM

Die Natriumkonzentration war unter Salzstress in Wurzel, Spross und Blatt signifikant erhöht, während die Konzentrationen der anderen drei gemessenen Kationen Kalium, Calcium und Magnesium jeweils signifikant vermindert waren (mit Ausnahme der Magnesiumkonzentration in der Wurzel). Für die natrophobe *Phaseolus*-Bohne wurde vom Marschner und Ossenberg-Neuhaus (1976) demonstriert, dass die Natriumverlagerung in den Spross gehemmt war. In dieser Arbeit sind die Natriumkonzentrationen in Wurzel, Spross und Blatt von *Faba*-Bohnen allerdings etwa gleich hoch (Abb. 12-14, S. 30 f.). Zumindest im Falle der Sorte Scirocco kann man daher annehmen, dass hier kein effizienter Natriumexklusionsmechanismus besteht. Hohe Konzentrationen an Natrium bzw. niedrige K^+/Na^+ -Verhältnisse stören viele

enzymatische Vorgänge (Tester und Davenport, 2003). Salzresistente Pflanzen sind in der Lage auch unter Salzstress ein hohes K^+/Na^+ -Verhältnis im Cytosol aufrecht zu erhalten (Yeo, 1998; Maathuis und Amtmann, 1999). Dass dies in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall ist, zeigt Abbildung 17 B (S. 32). Das K^+/Na^+ -Verhältnis im Zellsaft ist unter Salzstress signifikant vermindert, was verdeutlicht, dass *Vicia faba* eine salzsensitive Pflanze ist. Gleiches gilt für das K^+/Na^+ -Verhältnis im Blattapoplasten (Abb. 17 A). Wie für viele andere Pflanzen auch ist für *Vicia faba* bekannt, dass ein Natrium-Kaliumantagonismus zu einer verminderten Kaliumkonzentration unter Salzstress führt (Ullah *et al.*, 1993). Eine erhöhte Natriumkonzentration bewirkt eine Verdrängung von Calcium von den Membranen der Wurzelzellen. Dadurch besteht eine verminderte K^+/Na^+ -Selektivität (Cramer *et al.*, 1985). So kommt es bei Glykophyten unter Salzstress zu erhöhten Mengen an Natrium, die mit dem Transpirationsstrom in die Blätter transportiert werden (Shabala, 2000; Munns, 2002). Besonders betroffen sind dabei Blätter mit hoher Transpirationsrate während der Behandlung (Munns, 2002). Zu Behandlungsbeginn ist das zweitälteste Blatt fast ausgewachsen. Demnach haben alle Blätter, die jünger sind als das zweitälteste Blatt, ihre Hauptwachstumsphase während der Salzbehandlung und es wäre somit wahrscheinlich, dass die zum Erntezeitpunkt mittelalten Blätter am meisten vom Salzstress betroffen sind. Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei *Faba*-Bohnen in der zweiten Phase von Salzstress die Schadsymptome zuerst bei mittelalten Blättern auftreten (Slabu, 2005), was in dieser Arbeit für Pflanzen in der zweiten Phase von Salzstress bestätigt werden konnte (nicht abgebildet). Obwohl sich die Pflanzen zum Zeitpunkt der Ernte in der ersten nach Munns (1993) beschriebenen Phase von Salzstress befinden, ist deutlich zu erkennen, dass der Natriumüberschuss einen negativen Einfluss auf die Konzentrationen der anderen gemessenen Kationen in Blatt, Spross und Wurzel hat.

KALIUM

Vor allem für die Kaliumkonzentration im Spross wird berichtet, dass sie unter Salzstress vermindert wird (Flowers und Hajibagheri, 2001; Mühling und Läubli, 2002b). Ein Kaliummangel ist in diesem Fall aber völlig auszuschließen, da die Kaliumkonzentration von wachsenden Blättern der jungen Pflanzen unter Salzstress in dieser Arbeit mit 24 mg/g TM noch über den von Bergmann (1993) beschriebenen Grenzwerten für vollentwickelte Blätter zu Blühbeginn liegt. Eine Vergleichbarkeit der

Ionenkonzentrationen ist aufgrund des unterschiedlichen Pflanzen- und vor allem Blattalters schwierig, aber aufgrund der guten Mobilität des Kaliums (Schubert, 2006) scheinen zumindest die jungen für die Messungen genutzten Blätter ausreichend versorgt zu sein. Kaliummangel kann demnach ausgeschlossen werden.

CALCIUM

Auch Calcium kann durch überschüssiges Natrium verdrängt werden, was zur Folge hat, dass die Membranstabilität sinkt und somit die Membranpermeabilität erhöht wird (Cramer *et al.*, 1985; Lynch *et al.*, 1986; Marschner, 2002; Halperin *et al.*, 2003). Die geringe Calciumkonzentration, die sich aus der Nährstoffanalyse aus dem ganzen Blatt ergeben hat (Abb. 12, S. 30), ist damit zu erklären, dass die Blätter noch nicht ausgewachsen sind und noch nicht soviel transpirieren wie ein ausgewachsenes Blatt. Da Calcium wenig phloemmobil ist, ist der Transport von einer gewissen Transpirationsintensität abhängig, die bei den jungen Blättern oft noch nicht gegeben ist (Schubert, 2006). Durch einen salzinduzierten Wasserstress wäre eine Verringerung der Calciumkonzentration in jungen Blättern aufgrund des verminderten Transports im Xylem noch wahrscheinlicher. Ein salzinduzierter Calciummangel ist allerdings mehr bei monokotylen Pflanzen zu erwarten, weil deren Zellwände im Vergleich zu dikotylen Pflanzen einen geringeren Pektinanteil aufweisen (Carpita und Gibeaut, 1993). Die Carboxylgruppen der Pektine treten größtenteils methyliert auf und haben somit einen entscheidenden Anteil an der Kationenaustauschkapazität (Goldberg *et al.*, 1992). Aufgrund dieser potenziell höheren Kationenaustauschkapazität ist ein Calciummangel daher bei *Vicia faba*, einer dikotylen Pflanze, eher unwahrscheinlich.

4.2.2 Ionenverhältnisse im Apoplasten und im Symplasten

Während des Zentrifugationsvorganges zur Gewinnung der apoplastischen Waschflüssigkeit (AWF) kann es zu cytosolischen Verunreinigungen kommen (Husted und Schjoerring, 1995). Hierbei könnten unter anderem Ionen aus dem Cytosol in die AWF gelangen, was zu Fehlinterpretationen führen kann. Vor allem durch zu hohe Zentrifugationskräfte und Schnittstellen am Blattgewebe werden diese Verunreinigungen verursacht. In dieser Arbeit wurden ganze Blätter verwendet. Der einzige Schnitt musste am Blattstiel durchgeführt werden. Der Blattstiel wurde während der Zentrifugation nach oben gerichtet, um Verunreinigungen durch diese

Schnittstelle zu minimieren (Abb. 2, S. 15). Dieser Schnitt kann aufgrund seiner geringen Größe allerdings vernachlässigt werden. Die Blätter wurden zwischen 2 Trichter gelegt, um Knicke und somit Verletzungen des Gewebes zu vermeiden. Zusätzlich wurden Kontamination und Austauschprozesse durch möglichst kurze Infiltrationszeiten minimiert. Als Marker für eine cytoplasmatische Verunreinigung werden in vielen Arbeiten Enzymaktivitäten der Hexosephosphat-Isomerase (HPI), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) oder der Malatdehydrogenase (MDH) in der AWF gemessen, da bekannt ist, dass diese Enzyme natürlicherweise nicht außerhalb der Plasmamembran auftauchen (Tetlow und Farrar, 1993; Dannel *et al.*, 1995; Lyons *et al.*, 1999). Enzymaktivitäten als Marker wurden in dieser Arbeit nicht gemessen werden, aber es wurde für *Vicia faba* in der Literatur bereits gezeigt, dass die AWF unter ähnlichen Zentrifugationsbedingungen wie in dieser Arbeit (5 Minuten, 90 g) nicht entscheidend mit G6P-DH (Turcsanyi *et al.*, 2000) beziehungsweise HPI (Coester, 2000; Lohaus *et al.*, 2001) kontaminiert war und eine cytosolische Verunreinigung somit vernachlässigbar gering war. Als ein weiterer Marker für cytosolische Verunreinigungen in der AWF kann aber auch die Kaliumkonzentration an sich angesehen werden (Lohaus *et al.*, 2001). Die Kaliumkonzentration im Cytosol liegt bei etwa 100 – 200 mM (Flowers und Hajibagheri, 2001; Schubert, 2006), während für den Apoplasten Konzentrationen von ca. 10 mM genannt werden (Mühling und Sattelmacher, 1997). In der vorliegenden Arbeit liegt die Kaliumkonzentration im AWF von Blättern der ungestressten Ackerbohne bei 3 mM (Abb. 15 A, S. 31). Ähnlich niedrige Konzentrationen werden für die AWF aus Blättern von Ackerbohnen von Lohaus *et al.* (2001) und Mühling (1998) genannt. Weiterhin sei zu berücksichtigen, dass man bei der AWF-Gewinnung nie die komplette Flüssigkeit aus dem Apoplasten extrahieren kann. Für Blätter von *Vicia faba* wird von Coester (2000) berichtet, dass bei einer Zentrifugation von 5 Minuten mit 150 g 90 % des infiltrierten Lösungsvolumens extrahiert wird. Da in dieser Arbeit aber die Konzentrationen und nicht die Gehalte der Ionen im Blattapoplasten ermittelt wurden, ist eine vollständige Extraktion nicht notwendig. Die Osmolarität der Infiltrationslösung hat bei dieser Methode keine Auswirkung auf die Ionenkonzentration in der AWF von *Vicia faba* (Lohaus *et al.*, 2001). Bei der Infiltration mit entionisiertem Wasser ist auch in der vorliegenden Arbeit nicht mit einer Beeinflussung Ionenverhältnisse in der AWF-Lösung zu rechnen.

Die Menge der nicht diffusionsfähigen Anionen in der Zellwand bestimmen in der Regel die Kationenaustauschkapazität (KAK) im Apoplasten. Die KAK ist bei dikotylen Pflanzen wesentlich höher als bei monokotylen Pflanzen, was mit den freien Carboxylgruppen des Pektins zu erklären ist (Keller und Deuel, 1957). Da die KAK im Apoplasten stark von ihren Umwelteinflüssen abhängig ist, wird sie zum Beispiel auch durch Salzstress vermindert (Bigot und Binet, 1986). Eine Verdrängung von Kationen von den Bindungsplätzen im Apoplasten durch einen Überschuss an Natrium unter Salzstressbedingungen wäre somit durchaus denkbar. Die Ionenverhältnisse im Blattapoplasten der Ackerbohne soll daher im Folgenden diskutiert werden:

NATRIUM

Um physiologische Einschränkungen zu vermeiden, sollten die Natriumkonzentrationen im pflanzlichen Cytosol laut Munns und Tester (2008) möglichst niedrig gehalten werden. Für das Cytosol von Wurzelzellen der Gerste unter Salzstress wurden Natriumkonzentrationen von 10 – 30 mM gemessen (Carden *et al.*, 2003). *In vitro* Messungen zeigten, dass die meisten Enzyme ab einer Natriumkonzentration von 100 mM gehemmt werden (Greenway und Osmond, 1972). Diese Grenze konnte in der vorliegenden Arbeit im Cytosol nicht annähernd erreicht werden, da für den Zellsaft von Blättern von salzgestressten Ackerbohnen eine Natriumkonzentration von 90 mM gemessen wurde (Abb. 16 A, S. 32). Dabei ist aber zu beachten, dass dieser Zellsaft den Inhalt der beim Einfrieren aufgeplatzten Vakuolen enthält und die tatsächliche Ionenkonzentration im Cytosol vermutlich noch niedriger sein wird.

Hohe Natriumkonzentrationen im Blattapoplasten wurden als Grund für die Pflanzenschäden unter Salzstress lange Zeit verantwortlich gemacht (Oertli, 1968). Auch Munns und Passioura (1984) berichten von Turgorverlust und schließlich Zellschrumpfung nach einer vermehrten Ionenakkumulation im Apoplasten. Die schädigende Wirkung einer zu hohen Natriumkonzentration im Apoplasten wird zwar für Reis bestätigt (Flowers *et al.*, 1991), aber in der jüngeren Literatur wird dargestellt, dass unter Salzstress keine erhöhten Natriumkonzentrationen im Blattapoplasten von wachsenden Blättern von salzempfindlichen Pflanzen (Mais und

Weizen) gefunden werden können (Mühling und Läuchli, 2002a; 2002b; Mühling und Läuchli, 2003). Dies trifft sowohl für Kurzzeit- als auch für Langzeitstress zu (Mühling und Läuchli, 2002b). In der Literatur wird beschrieben, dass überschüssiges Natrium bei Pflanzen unter Salzstress in die Vakuole kompartimentiert wird (Apse und Blumwald, 2007). Dieser Transport erfolgt durch Na^+/H^+ -Antiporter und Cl^- - Kanäle (Blumwald und Poole, 1987; Zörb *et al.*, 2005) und schützt das Cytoplasma vor zu hohen Natriumkonzentrationen (Flowers, 1985). Es wurde aber auch schon dargestellt, dass Natrium statt in der Vakuole im Blattapoplasten der salzresistenten Pappel angereichert wurde (Ottow *et al.*, 2005). Das Natrium könnte hier als Osmotikum fungieren, um die Wasseraufnahme aus salinen Böden zu gewährleisten. Dieser Anpassungsmechanismus hat allerdings den Nachteil, dass dabei andere Kationen verdrängt werden können (Munns, 2005). Auch für *Vicia faba* wurde gezeigt, dass es bei osmotischem Stress durch eine Behandlung mit PEG (Polyethylenglycol) zu einer erhöhten Akkumulation von Natrium in den Blättern kommt (Slabu, 2005). Dies lässt ebenfalls darauf schließen, dass das Natrium unter osmotischen Stress ähnlich wie das Kalium als Osmotikum in den Pflanzen wirken kann, um den Wasserverlust in den Mesophyllzellen zu verhindern (Shabala, 2000). Für *Vicia faba* unter Salzstress wird in dieser Arbeit ein deutlicher Anstieg der Natriumkonzentration auf etwa 50 mM in der apoplastischen Waschflüssigkeit dargestellt (Abb. 15 A, 31). Dieser Anstieg der Natriumkonzentration stimmt mit der Aussage von Oertli (1968) überein. Es lässt sich in der vorliegenden Arbeit also nicht ausschließen, dass die erhöhten Natriumkonzentrationen im Blattapoplasten eine Rolle in der salzstressinduzierten Wachstumshemmung spielen. Auch im Zellsaft von salzgestressten Ackerbohnen wurde hier ein deutlicher Anstieg der Natriumkonzentration nachgewiesen (Abb. 16 A, S. 32). Das könnte ein Hinweis dafür sein, dass Natrium auch in der Vakuole kompartimentiert wird, um toxischen Natriumkonzentrationen im Cytoplasma zunächst zu verhindern (Munns, 1993). Es wurde zudem von einer höheren Selektivität der Plasmamembran von Pflanzen unter Salzstress berichtet (Kader und Lindberg, 2005; Ottow *et al.*, 2005), wodurch das Cytosol unter Salzstress ebenfalls geschützt werden soll. In Kapitel 4.2.1 (S. 51) wurde bereits geschlossen, dass Pflanzen in dieser Arbeit vermutlich keinen effizienten Natriumexklusionsmechanismus am Plasmalemma von Wurzelzellen oder Xylemparenchymzellen besitzen, da sich die Natriumkonzentration in Wurzel, Spross und wachsendem Blatt etwa auf einem gleichen Level befanden (Abb. 12-14).

Denkbar wäre in diesem Fall, dass die Ackerbohne eine Anpassungsstrategie für die erste Phase von Salzstress entwickelt hat, bei der Natrium in den Apoplasten und wahrscheinlich auch in der Vakuole deponiert wird, um als Osmotikum den Wasserhaushalt im Spross zu sichern. Dieser Anpassungsmechanismus kann die Pflanze bis zu einem bestimmten Maß vor Dehydrierung bewahren, aber die Produktionsleistung und letztlich der Ertrag ist dadurch nicht zwangsläufig höher als es bei Pflanzen ohne diesen Anpassungsmechanismus der Fall sein wird (McCree und Richardson, 1987). Außerdem besteht dabei die Gefahr, dass eine Aufkonzentrierung osmotischer Substanzen in der Vakuole eine Dehydrierung des Cytosols mit sich zieht (Oertli, 1968). Da die Ackerbohne allerdings als salzsensitiv beschrieben wird, wird sie vermutlich mit zu großen Überschüssen an Natrium überfordert sein. Sobald die Kapazität der Vakuole und/oder des Apoplasten erreicht ist, wäre eine darauf folgende Natriumanreicherung im Cytosol denkbar. Die Überlebensstrategie der Ackerbohne für die erste Phase von Salzstress könnte somit beim Übergang zur zweiten Phase von Salzstress zum Verhängnis werden. Vermutlich sind je nach Pflanzenart und Salzresistenz große Unterschiede zu finden, was die Natriumkonzentration im Blattapoplasten von Pflanzen unter Salzstress betrifft.

KALIUM

Neben der Natriumkonzentration wird auch für die Kaliumkonzentration ein signifikanter Anstieg im Blattapoplasten nachgewiesen (Abb. 15 B, S. 31). Dieser Anstieg könnte zum einen mit einem Aufkonzentrierungseffekt aufgrund der verminderten Sprossmasse (Abb. 5, S. 24) und zum anderen mit einem Versuch der Pflanze eine osmotische Anpassung zu erzielen erklärt werden. Unter Salzstress kann Calcium wie bereits erwähnt durch einen Überschuss an Natrium von der Plasmamembran verdrängt werden, wodurch die Membranpermeabilität erhöht wird (Cramer *et al.*, 1985). Diese erhöhte Membrandurchlässigkeit wäre ebenfalls ein Erklärungsansatz für den Anstieg der Kaliumkonzentration im Blattapoplasten von *Vicia faba* unter Salzstress. Es wäre bei einer erhöhten Membrandurchlässigkeit denkbar, dass Kalium auf diesem Wege aus dem Cytosol in den Apoplasten gelangt. Im Zellsaft ist gegensätzlich dazu eine Abnahme der Kaliumkonzentration unter Salzstressbedingungen zu beobachten (Abb. 16 A, S. 32). In den Abbildungen 13 und 14 (S. 30) ist zu erkennen, dass die Kaliumkonzentration unter

Salzstressbedingungen, sowohl im Spross als auch in der Wurzel, signifikant reduziert ist. Es lässt sich daher vermuten, dass die Kaliumaufnahme über die Wurzel aufgrund des Ionenantagonismus´ mit den Natriumionen gehemmt ist.

CALCIUM

Vor allem für dikotyle Pflanzen wird in vielen Studien über Zellstreckung angenommen, dass die Calciumbrücken eine tragende Rolle für die Veränderung der Zellwände spielen (Grignon und Sentenac, 1991). Von Knee (1982) wurde vermutet, dass es bei einer säureinduzierten Erhöhung der Zellwandextensibilität zur Verdrängung von Calcium durch die Protonen kommt. Diese Vermutung konnte bisher allerdings noch nicht bestätigt werden (Ferguson, 1984). In dieser Arbeit kann man anhand der Daten über die Calciumkonzentration in der apoplastischen Waschflüssigkeit (AWF) keine Aussage über das gebundene Calcium machen, da für die Gewinnung der AWF lediglich mit deionisiertem Wasser infiltriert wurde. Für die Erfassung von gebundenem Calcium wäre als Infiltrationslösung beispielsweise Bariumchlorid geeignet (Mühling und Sattelmacher, 1995). Die Calciumkonzentration bleibt in der AWF ebenso wie die von Magnesium unter Salzstress unverändert (Abb. 15 B, S. 31). Ein Einfluss auf die Wachstumsminderung durch die freien Calcium- bzw. Magnesiumionen im Apoplasten unter Salzstress wäre somit nicht zu vermuten. Allerdings kommt es im Zellsaft zu einem signifikanten Abfall der Calciumkonzentration durch den Einfluss erhöhter Salzkonzentrationen im Wurzelmedium (Abb. 16 B, S. 32). In der Literatur wird ebenfalls beschrieben, dass die Calciumkonzentrationen im Cytosol von salzgestressten Pflanzen abnimmt, da Calcium durch andere Kationen, wie in diesem Fall vom Natrium, von seinen Bindungsstellen an der Membran verdrängt werden kann (Cramer *et al.*, 1985; Jones *et al.*, 1995; Halperin *et al.*, 2003).

4.3 Beurteilung der Wachstumshemmungen von *Vicia faba* unter

Salzstress

Vicia faba weist gegenüber Salzstress eine mittlere bis starke Empfindlichkeit auf (Delgado *et al.*, 1994; Zahran, 1999; Brady, 2002; Zahran *et al.*, 2007). Dennoch wurden für Ackerbohne osmotische Anpassungsstrategien wie Anreicherung von

Glucose, Fructose und Prolin im Blatt nachgewiesen (Ullah *et al.*, 1993), welche als Osmotika eine wichtige Rolle bei der osmotischen Anpassung spielen (Greenway und Munns, 1980). In der vorliegenden Arbeit wird für Ackerbohne gezeigt, dass die Sprossfrischmasse ab einer neuntägigen Behandlung von 75 mM NaCl und die Wurzelfrischmasse ab 100 mM NaCl signifikant vermindert werden (Abb. 5, S. 24). Auch die Trockenmasse ist ab einer neuntägigen Behandlung von 100 mM NaCl signifikant reduziert. Die Trockenmasse der Wurzel weist bei Salzbehandlungen bis 125 mM NaCl hingegen keine signifikante Verminderung auf (Abb. 5). Auch in der Literatur wurde beschrieben, dass die Trockenmasse des Sprosses von *Vicia faba* unter Salzstress sensibler reagiert als die der Wurzel (Cordovilla *et al.*, 1994; Mühling und Läuchli, 2002a). Die Sprosslängen und die Blattflächen von salzgestressten Pflanzen waren im Vergleich zu den Kontrollvarianten ebenfalls signifikant verkürzt bzw. verkleinert (Abb. 6, 7 und 10, S. 25 und 28). Eine Reduktion der Blattgröße von gestressten Pflanzen wird auch von weiteren Autoren beschrieben (Granier und Tardieu, 1998; Heckenberger *et al.*, 1998). Das Pflanzenwachstum von *Vicia faba* wurde auch durch eine Behandlung mit dem Osmotikum Polyethylenglycol (PEG) reduziert, ohne dabei Nährstoffmangel oder Schadsymptome an den Blättern hervorzurufen (Slabu, 2005). Dies unterstützt die Aussage, dass die Wachstumshemmung in der ersten Phase von Salzstress durch eine rein osmotische Wirkung und nicht durch Ionentoxizität verursacht wird (Munns, 2002).

Abbildung 8 (S. 27) zeigt, dass der Blattlängenzuwachs in der potenziellen Erntewoche bei allen Varianten beim jüngsten dargestellten Blattpaar am höchsten ist. Die jüngsten Blätter weisen zu diesem Zeitpunkt höhere Wachstumsaktivitäten auf als die entsprechend älteren Blätter, welche ihre höchste Wachstumsaktivität zu einem früheren Zeitpunkt hatten. Fälschlicherweise könnte aus dieser Abbildung interpretiert werden, dass die Zuwachsraten der Blattlänge unter Salzstress höher sind. Allerdings ist diese Tatsache mit der Blattauswahl zu begründen. Salzgestresste Pflanzen sind in ihrer Entwicklung langsamer, was man an der Anzahl an aufgefalteten Blattpaaren zum Erntezeitpunkt erkennen kann (Abb. 9). Das fünftälteste Blatt einer Kontrollpflanze ist zur Zeit der Ernte schon älter als das fünftälteste Blatt der Behandlung (100 mM NaCl) und die Wachstumsaktivität ist dementsprechend niedriger. Um Blattpaare gleichen Alters zu vergleichen, wurde für

die Messungen jeweils das jüngste aufgefaltete Blatt ausgewählt. Für die Messungen wurde somit das sechstälteste Blatt der Kontrollvariante mit dem fünftältesten Blatt der Behandlungsvariante verglichen, die jeweils gleiche Wachstumsaktivitäten aufwiesen (Abb. 8, S. 27). Wie bereits erwähnt, waren in diesem Fall noch nicht alle sechstältesten Blätter aufgefaltet. Dies könnte eine Erklärung für die relativ großen Abweichungen (siehe Fehlerbalken) bei diesen Blättern ab einer Behandlungsintensität von 50 mM NaCl sein. Aus den oben genannten Gründen werden die Daten der Blattflächen von gestressten und nicht gestressten Pflanzen in Abbildung 10 (S. 28) nach ihrem Blattalter sortiert, um gleichaltrige Blätter besser vergleichen zu können. Es besteht bei allen dargestellten gleichaltrigen Blättern ein signifikanter Unterschied zwischen der Blattfläche von gestressten und ungestressten Pflanzen. Dies zeigt, dass alle Blätter von den Wachstumshemmungen in der ersten Phase von Salzstress betroffen sind.

Es konnte für Wurzelzellen von Sorghum-Pflanzen (*Sorghum bicolor* x *S. sudanensis*) bereits gezeigt werden, dass die Beschaffenheit der Zellwände durch Salzstress verändert wird (Koyro, 1997). Es wurde dabei beobachtet, dass die Cellulosemikrofibrillen von Zellwänden der Wurzelepidermis der ungestressten Pflanzen parallel angeordnet sind, was das Längenwachstum fördert. Bei salzgestressten Pflanzen war das Mikrofibrillennetzwerk weniger strukturiert und viel engmaschiger, was lediglich eine nicht richtungsgebundene Zellstreckung fördert. Außerdem wurde eine Calloseanreicherung in den Zellwänden der Wurzelcortexzellen von Sorghum nachgewiesen (Koyro, 2002). Es konnte bereits eine Verknüpfung zwischen Zellwandausformung und intrazellulärer Abscisinsäure festgestellt werden (Schnepf und Reinhard, 1997). Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass Abscisinsäure auch unter Salzstress als Signalstoff fungiert (Hartung *et al.*, 2002), über den die Zellwandbeschaffenheit direkt oder indirekt verändert und die Zellstreckung gehemmt wird.

Abbildung 27 (S. 41) zeigt den mit der DISP-Methode ermittelten Tagesgang von *Vicia faba*. Dieses Wachstumsmuster ist unter Salzstressbedingungen sehr ähnlich ausgeprägt. Die einzigen beiden Unterschiede im Vergleich zum Wachstumstagesgang der Kontrollvariante weist der Tagesgang von *Vicia faba* unter Salzstress mit einer kurzzeitigen Wachstumsreduktion innerhalb der Dunkelphase

(ca. 23.00 bis 2.00 Uhr) und einer kurzzeitigen Wachstumserhöhung zu Beginn der Lichtphase (ca. 7.30 bis 10.00 Uhr) auf. Die Ergebnisse der DISP-Messung belegen, dass die Blattwachstumsrate in der Nacht höher ist als am Tag (Abb. 11, S. 29). Während die Wachstumsrate von salzgestressten Blättern in der Nacht unverändert ist, kann in der Lichtphase gar ein signifikanter Anstieg im Vergleich zur Kontrollvariante beobachtet werden. Die Mittelwerte der Daten aus der Licht- und der Dunkelphase (d.h. des kompletten Tagesverlaufs) weisen allerdings keine signifikanten Änderungen zwischen Kontroll- und Behandlungsvariante auf (nicht abgebildet). Der Anstieg der Wachstumsrate von Blättern unter Salzstress ist mit der Auswahl des Blattstadiums zu erklären (siehe Kap. 4.3, S. 61). Ein weiterer Grund für diese Beobachtung könnte der Zeitraum der Messungen an den jeweiligen Blättern sein. Die Blätter wurden schließlich nicht in ihrem kompletten Wachstumsverlauf, sondern nur in einem gewissen Zeitraum gemessen. Somit sind Parameter wie beispielsweise Blattmasse, -länge oder -fläche zum Zeitpunkt der Ernte aussagekräftiger, um salzstressinduzierte Wachstumshemmungen darzustellen, als Wachstumsraten über einen eingegrenzten Zeitraum. Über die Wachstumshemmung von Blättern dikotyler Pflanzen unter Trockenstress wird in der Literatur von einer gleichmäßigen Wachstumshemmung über den kompletten Tagesgang berichtet (Heckenberger *et al.*, 1996; Schurr *et al.*, 2000; Walter, 2001), wovon man in der vorliegenden Arbeit bei Pflanzen unter Salzstress auch ausgehen kann.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich bei den Hemmungen des Blattwachstums unter Salzstress nicht um einen Mangel an Energie handelt, da die relative Blattwachstumsrate weder in der Lichtphase noch in der Dunkelphase verringert ist. Wenn es sich um eine energiemangelbedingte Wachstumshemmung handeln würde, müsste man davon ausgehen, dass die Hemmung in der Nacht stattfindet, wenn die Photosynthese nicht aktiv ist und mit einem Energiemangel gerechnet werden müsste. Es gibt einige Hinweise darauf, dass es bei Pflanzen unter Salzstress zu Problemen mit dem Energiehaushalt kommt. Es wurde zum Beispiel berichtet, dass die Konzentration an Chlorophyll bei Pflanzen unter Salzstress verringert ist (Jaleel *et al.*, 2008). Weitere Autoren bestätigen, dass der Bedarf an Energie bei salzgestressten Pflanzen gesteigert ist, weil der im Tonoplasten lokalisierte Na^+/H^+ -Antiporter für die Natrium-Kompartimentierung in

die Vakuole ATP benötigt (Blumwald und Poole, 1987; Apse und Blumwald, 2007). Zusätzlich wird viel Energie für die Synthese von osmotischen Substanzen bei Pflanzen mit der Strategie der osmotischen Anpassung verbraucht (Yeo, 1983). Ein Nachweis für den gesteigerten Energiebedarf aufgrund der Natriumexklusion erbrachten Helal und Mengel (1981), die zeigten, dass eine höhere Lichtintensität den gesteigerten Energiebedarf von Pflanzen unter Salzstress ausgleicht. Da dieser Effekt bei Ackerbohnen, die sich in der ersten Phase von Salzstress befanden, allerdings nicht beobachtet werden konnte (Slabu, 2005), ist wie bei He und Cramer (1996) davon auszugehen, dass die salzstressbedingte Wachstumsminde rung nicht mit einem Mangel an Energie zu begründen ist. Als eine frühe Reaktion auf den osmotischen Effekt von Salzstress wird die verminderte Stomataöffnung beschrieben (Munns und Tester, 2008). Die stomatäre Öffnung wird dabei zunächst durch den gestörten Wasserhaushalt und kurze Zeit später durch die lokale Synthese von ABA vermindert (Fricke *et al.*, 2004). Die Photosyntheserate pro Blattfläche bleibt dabei oft unverändert, obwohl die stomatäre Leitfähigkeit vermindert ist (James *et al.*, 2002). Da die Pflanzen nach Einstellen von Salzstress sehr schnell mit einer reduzierten Blattwachstumsrate reagieren, ist eine Verminderung der Photosyntheserate als Ursache dieser Wachstumshemmung außerdem sehr unwahrscheinlich (Passioura und Munns, 2000; Fricke *et al.*, 2004). Ein weiterer Hinweis, dass Veränderungen der Photosyntheserate nicht die Ursache für eine Wachstumshemmung unter Salzstress sind, ist die Tatsache, dass unter Salzstress eine Erhöhung der gespeicherten Kohlenhydrate zu beobachten ist. Dies weist auf ungenutzte Assimilate hin (Munns *et al.*, 2000).

Auch wenn man salzstressbedingte Ioneneffekte zum Zeitpunkt der Ernte der Ackerbohnen in dieser Arbeit nicht ausschließen kann, weisen die diskutierten Fakten auf einen rein osmotischen Effekt als Ursache der Verringerung des Spross- und Blattwachstums hin. Vor allem bei den hier gemessenen jungen Blättern ist dies im Vergleich zu älteren transpirierenden Blättern sehr wahrscheinlich (Munns, 2002). Hormonelle Signale vermitteln hierbei vermutlich zwischen Wurzel und Spross (Munns, 2002). Abscisinsäure (ABA) ist dabei das favorisierte Signal, da es eine Korrelation zwischen Blattexpansion und ABA-Konzentration gibt (He und Cramer, 1996).

Auch der „Wall associated kinase“ (WAK) wird neben der Signalfunktion zwischen Cytoplasma und extrazellulärer Matrix eine Bedeutung für die Zellstreckung zugeschrieben (Verica und He, 2002). Es konnte für Blätter von Gerste gezeigt werden, dass die WAK-Expression unter Salzstress signifikant erhöht ist und eine Korrelation zum Blattlängenzuwachs besteht (Kranz, 2004). Somit liegt die Vermutung nahe, dass dieses Protein eine Rolle bei der Änderung der Wachstumsaktivitäten von Pflanzen unter Salzstress spielt.

Neben der bereits erwähnten „Wall associated kinase“ (Verica und He, 2002) werden den Proteinklassen der Expansine, der Xyloglucan-Transglycosylasen und den Endonucleasen eine Bedeutung für die erhöhte Zellwanddehnbarkeit während der Wachstumsprozesse zugeschrieben (Cosgrove, 1999). Expansine spielen dabei eine besondere Rolle beim säureinduzierten Zellwachstum, indem sie vermutlich schwächend auf die Glucan-Glucan-Wechselwirkungen der Cellulosefibrillen der Zellwand wirken (McQueen-Mason und Cosgrove, 1995). Als Reaktion auf eine externe Zugabe von Expansin zu lebenden Zellen von Tabak wird eine Stimulation der Wachstumsaktivität beobachtet (Link und Cosgrove, 1998). Expansine wurden erstmals von McQueen-Mason isoliert (McQueen-Mason *et al.*, 1992) und sind die einzigen bekannten Zellwandproteine, die in einem sauren pH-Milieu Zellexpansion induzieren können (Cosgrove, 1999; Cleland, 2002). Wie in Abschnitt 4.4 beschrieben ist der apoplastische pH-Wert in Blättern von *Vicia faba* unter Salzstress erhöht (Abb. 23-25, S. 36 f.). Da das pH-Optimum der Expansine im sauren Bereich liegt (Cleland, 2002), wäre hier vorstellbar, dass die pH-Erhöhung unter Salzstress die Produktivität des Expansins senkt, womit die Wachstumsinderung zu erklären wäre. In der Literatur wird bestätigt, dass es bei Pflanzen einen Zusammenhang zwischen Trockenstress und Expansinaktivität gibt (Wu *et al.*, 1996; Sharova, 2007).

4.4 Einfluss von Salzstress auf den pH-Wert im Blattapoplasten

4.4.1 Bewertung der Ergebnisse des apoplastischen pH-Wertes

Der Turgor wird wie bereits erwähnt nicht durch Salz- oder Wasserstress vermindert (Puliga *et al.*, 1996; Cramer *et al.*, 1998), was mit einer Akkumulierung von gelösten Substanzen zu erklären wäre (Michelena und Boyer, 1982). Demnach liegt die Vermutung nahe, dass eine Hemmung der Zellwandextensibilität unter Salzstress für die Blattwachstumsreduktion verantwortlich sein muss. Für Pflanzen unter Trockenstress wird von einer Zellwandverhärtung berichtet, die bereits bei leichtem Stress für die Hemmung des Blattwachstums verantwortlich gemacht wird (Passioura und Fry, 1992; Chazen und Neumann, 1994). Für ein ungehemmtes Blattwachstum wäre unter diesen Umständen ein erhöhter Turgor notwendig (Matthews *et al.*, 1984). Laut der Säure-Wachstums-Hypothese ist eine Ansäuerung der Zellwand Grundlage für die Expansion der Zelle (Hager *et al.*, 1971; Hager, 2003). Der pH-Wert im dünnen Flüssigkeitsfilm im Apoplasten wird von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst (Grignon und Sentenac, 1991) und besitzt eine geringe Pufferkapazität (Felle und Hanstein, 2002). Eine apoplastische pH-Wert-Erhöhung wird als Folge für vielerlei Stressarten genannt (Grignon und Sentenac, 1991; Gollan *et al.*, 1992; Wilkinson und Davies, 1997; Felle *et al.*, 2005). Van Volkenburgh und Boyer (1985) vermuteten, dass Trockenstress das Blattwachstum über die Effekte eines erhöhten pH-Wertes im Apoplasten reduziert. Die Ergebnisse der Änderungen des apoplastischen pH-Wertes von salzgestressten Pflanzen sind wie schon erwähnt widersprüchlich. Es gibt einige Methoden zur Ermittlung des apoplastischen pH-Wertes, die unterschiedlich gut geeignet sind, um Aussagen über die Verhältnisse im Apoplasten von lebenden Blättern zu machen. Neves-Piestun und Bernstein (2001) konnten beispielsweise keine Hemmung einer zur Zellwandexpansion notwendigen Ansäuerung in externen Lösungen von wachsenden Maisblattsegmenten unter Salzstress beobachten. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, dass das unter Salzstress reduzierte Blattwachstum nicht durch eine verminderte Pumpaktivität der Plasmalemma-H⁺-ATPase hervorgerufen wurde. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass in diesen Untersuchungen pH-Änderungen in Außenlösungen gemessen wurden, die nicht die *in vivo*-Verhältnisse an der

Plasmamembran oder im Apoplasten widerspiegeln (Hager, 2003). In einer weiteren Arbeit wurden transgene Pflanzen entwickelt, welche pH-Indikatoren in den gewünschten Pflanzengeweben exprimieren können (Gao *et al.*, 2004). Es konnte dabei mit Hilfe ratiometrischer Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass der apoplastische pH-Wert im Wurzelapoplasten von *Arabidopsis thaliana* durch Salzstress von ca. 6,4 auf etwa 6,7 erhöht wurde, während der pH-Wert im Cytosol keine nennenswerten Änderungen erfuhr. Der Vorteil dieser Methode ist, dass hier an intakten Pflanzen ohne Infiltrationsvorgang gemessen werden konnte. Allerdings sei hier zu berücksichtigen, dass es sich um den Apoplasten von Wurzelzellen handelt, was schwer mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit über den pH-Wert im Blattapoplasten zu vergleichen ist. Außerdem handelt es sich hier um die kurzfristigen Auswirkungen (30 min.) nach Induktion von Salzstress und die Salzkonzentration (100 mM NaCl) wurde nicht schrittweise angepasst, was ebenfalls einen Vergleich erschwert. Mit Hilfe von pH-sensitiven Mikroelektroden konnte von Felle und Hanstein (2002) gezeigt werden, dass bei abgeschnittenen Blättern von *Vicia faba* schon wenige Minuten nach Zugabe von 20 mM NaCl im Petiolenbad eine kurzfristige pH-Erhöhung um 0,3 pH-Einheiten eintritt. Diese Messungen beziehen sich allerdings ebenfalls auf die kurzfristige Reaktion eines abgeschnittenen Blattes auf Salzstress. Gegensätzlich zu den beiden vorigen Ergebnissen konnte allerdings auch eine Ansäuerung im Apoplasten von Wurzeln als Folge von Salzstress dargestellt werden (Zidan *et al.*, 1990). Der apoplastische pH-Wert der Wurzelepidermis von Mais erfuhr 30 Minuten nach Einwirkung von 100 mM NaCl eine Verminderung von 6,0 auf 5,1. Allerdings handelt es sich auch hier um die kurzfristige Reaktion auf eine Zugabe von Salzstress ohne Anpassung. Außerdem wurde hierbei an Maiskeimlingen nur in der Rhizosphäre, also außerhalb des Gewebes, gemessen. Viele Messungen des apoplastischen pH-Wertes wurden oft an isoliertem Gewebe durchgeführt und sind nur von geringer Relevanz für natürliche Systeme (Peters und Felle, 1999; Walter *et al.*, 2000). Die apoplastische Flüssigkeit eines Blattes ist auf einen dünnen, wenige μm dicken Film beschränkt und ist schwer zugänglich. Die Messungen sind daher *in vivo* sehr schwer durchzuführen. Für die Fragestellung dieser Arbeit ist es allerdings sehr wichtig, Informationen über die Zusammensetzung des Apoplasten von lebenden Blättern zu bekommen. Aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene *in vivo*-Messungen des pH-Wertes im Blattapoplasten von *Vicia faba* durchgeführt.

4.4.2 Änderung des pH-Wertes im Blattapoplasten von *Vicia faba* unter Salzstress

Die verschiedene Eignung der in dieser Arbeit angewandten Methoden wurde in Kapitel 4.1 (S. 44) bereits diskutiert. In der Literatur wird aufgrund der vielen unterschiedlichen eingesetzten Messmethoden für den Apoplasten ein weiter pH-Bereich von 3,5 bis 8,3 genannt (Grignon und Sentenac, 1991; Yu *et al.*, 2000). Hierbei sei ein pH-Wert von über 7 eher kritisch zu betrachten, weil dann kein pH-Gradient zwischen Apoplast und Symplast bestehen würde. Der Nährstofftransport würde so erheblich erschwert werden, da dieser Gradient eine entscheidende Bedeutung für die Nährstoffaufnahme hat (Schubert und Mengel, 1989; Mohr und Schopfer, 1992). Grignon und Sentenac (1991) zeigen, dass für dikotyle Pflanzen durchschnittlich ein höherer pH-Wert im Apoplasten vorliegt als bei monokotylen Pflanzen. Die in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ermittelten pH-Werte lagen je nach eingesetztem Farbstoff zwischen 5,3 und 6,6. Der mit Hilfe der pH-sensitiven Mikroelektroden ermittelte pH-Bereich lag zwischen 4,9 und 5,5. Die gemessenen pH-Werte stimmen also mit dem pH-Bereich aus der Literatur überein.

Die Ergebnisse der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie mit pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen zeigen einen signifikanten pH-Anstieg im Blattapoplasten von *Vicia faba* unter Salzstress (100 mM NaCl). Dieser pH-Anstieg konnte mit allen drei verwendeten Farbstoffen nachgewiesen werden (Abb. 23 und 24, S. 36). Dennoch gibt es Unterschiede, was die absoluten pH-Werte im Blattapoplasten betrifft. Diese Unterschiede zwischen den drei Farbstoffen sind in ihren unterschiedlichen Eignungen für die Messungen unter den beschriebenen Bedingungen zu erklären (siehe Kapitel 4.1.2, S. 48). Bereits die visuelle Kontrolle der mit der bildverarbeitenden Fluoreszenzmikroskopie erstellten Ratio-Bilder von Blattabschnitten gestresster und nicht gestresster Pflanzen lässt einen deutlichen Farbunterschied erkennen (Abb. 21, S. 35). Vor allem im Bereich um die Stomata herum ist durch die Falschfarbendarstellung der Ratio-Werte eine Rotfärbung bei der Behandlungsvariante zu erkennen. Unter Zuhilfenahme der Farbskala und der durch die Kalibrierung zugeordneten pH-Werte kann geschlussfolgert werden, dass

zumindest im stomatären Raum von Blättern der Salzstressvariante eine pH-Wert-Erhöpfung vorliegt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus anderen Arbeiten (Bowling und Edwards, 1984; Edwards *et al.*, 1988) ist der apoplastische pH-Wert im stomatären Raum höher als im restlichen Gewebe (Abb. 22, S. 35). Es besteht in beiden genannten Gewebebereichen sowie beim gesamten Gewebe ein signifikanter Unterschied zwischen den pH-Werten in Blättern von gestressten und nicht gestressten Pflanzen. Das zeigt, dass die in Abbildungen 23 und 24 (S. 36) dargestellten pH-Unterschiede im gesamten Blattapoplasten bestehen und nicht nur von den Unterschieden im stomatären Raum herbeigeführt werden. Der pH-Wert wird demzufolge unter Salzstress in allen Bereichen der Blattapoplasten und nicht nur in speziellen Regionen erhöht.

Felle und Hanstein (2002) konnten mit ionenselektiven Mikroelektroden bei abgeschnittenen Blättern von *Vicia faba* schon wenige Minuten nach Zugabe von 20 mM NaCl im Petiolenbad eine kurzfristige pH-Erhöpfung von 0,3 pH-Einheiten messen. Diese Reaktion konnte auch bei abgeschnittenen Blättern von *Vicia faba* in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (nicht abgebildet). Es soll hier jedoch die längerfristige Auswirkung von Salzstress auf den pflanzlichen Organismus beschrieben werden. Die Salzbehandlung wurde aus diesem Grunde schrittweise an der Wurzel induziert und eine Messung erst neun Tage nach Einstellung der vollen Behandlung von 100 mM NaCl durchgeführt. Das zu messende Blatt musste dafür nicht abgeschnitten werden. Die Messungen mit pH-sensitiven Mikroelektroden zeigen, ähnlich wie die Messungen mit der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie, einen signifikanten pH-Anstieg von 4,9 auf 5,5 im Blattapoplasten von *Vicia faba* unter Salzstress (Abb. 25, S. 42). Die Differenz der mit der Fluoreszenzmikroskopie ermittelten pH-Werte von gestressten und nicht gestressten Pflanzen ist etwa die gleiche (Abb. 23 und 24, S. 36). Allerdings sind die absoluten Beträge im Vergleich zu den elektrophysiologisch ermittelten Werten höher. Dieser Unterschied ist mit den bereits erwähnten Nebenwirkungen des Infiltrationsprozesses zu erklären (siehe Kapitel 4.1.1, S. 44). Ähnliche Ergebnisse wie in dieser Arbeit bei *Vicia faba* konnten auch mit *in vivo*-Messungen sowohl mit ratiometrischer Fluoreszenzmikroskopie als auch mit pH-sensitiven Mikroelektroden an wachsenden Blättern von Mais gewonnen werden (Pitann, unveröffentlicht). Es kann hier geschlussfolgert werden, dass der pH-Wert im Blattapoplasten von *Vicia faba* unter Salzstress um etwa 0,5 pH-

Einheiten erhöht wird, was mit beiden beschriebenen *in vivo*-Methoden nachgewiesen werden konnte.

4.4.3 Gründe für die Alkalisierung im Blattapoplasten unter Salzstress

Was könnte der Grund für die Alkalisierung des Blattapoplasten von Pflanzen unter Salzstress sein? Es ist bekannt, dass die Absenkung des apoplastischen pH-Wertes durch die Plasmalemma-H⁺-ATPase erreicht wird (Taiz, 1984; Kutschera, 1994). Für abgeschnittene Blätter von *Vicia faba* wurde dargestellt, dass eine Zugabe von Cyanid am Blattstiel einen deutlichen pH-Anstieg im Blattapoplasten verursacht (Felle und Hanstein, 2002). Cyanid hemmt den mitochondrialen Elektronentransport und somit die respirative Synthese von ATP, was zur Folge hat, dass die Plasmalemma-H⁺-ATPase (Depolarisation des Plasmalemmas) gehemmt wird (Felle und Hanstein, 2002). Die Aktivität der Plasmalemma-H⁺-ATPase ist entscheidend für den Aufbau eines pH-Gradienten, mit dem die Nährstoffaufnahme angetrieben wird (Schubert und Mengel, 1989). Das Phytotoxin Fusicoccin bewirkt gegensätzlich eine Stimulation der Protonenausscheidung durch die Plasmalemma-H⁺-ATPase, was eine Hyperpolarisation des Plasmalemmas verursacht (Marre, 1979). Eine Zugabe von Fusicoccin an die Petiole von abgeschnittenen Blättern der Ackerbohne führen zur Ansäuerung des Blattapoplasten (Felle und Hanstein, 2002). Auch Auxin kann in seiner aktivierten Form die Aktivität der ATPase steigern (Hager, 2003). Neben der Veränderung der ATPase-Aktivität wird weiterhin vermutet, dass der apoplastische pH-Wert durch Kationenkanäle bzw. durch Ionenverteilung und -transport am Plasmalemma beeinflusst wird (Felle, 1998; Gerendas und Schurr, 1999).

Wäre es also möglich, dass die ATPase-Aktivität unter Salzstress vermindert ist? Für Mais konnte bereits gezeigt werden, dass die Pumpaktivität der Plasmalemma-H⁺-ATPase unter Salzstress vermindert ist (Zörb *et al.*, 2005). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass aufgrund der reduzierten Pumpleistung die Protonenausscheidung in den Blattapoplasten von Pflanzen unter Salzstress gehemmt ist. Eine Ansäuerung der Zellwände könnte dann nicht ausreichend stattfinden, was die Zellwandextensibilität und letzten Endes das Blattwachstum vermindert (Hager, 2003). Hartung *et al.* (1988) vermuteten, dass Trockenstress die Plasmalemma-H⁺-ATPase deaktivieren könnte. Gegensätzlich dazu wurde für

Halophyten von einer Stimulation der Plasmalemma-H⁺-ATPase berichtet, wodurch ein Protonengradient aufgebaut wird, der wiederum den Natriumtransport aus dem Cytosol mittels Na⁺/H⁺-Antiporter ermöglicht (Ayala *et al.*, 1996). Aus diesen Daten lässt sich folgern, dass die Salzresistenz unter anderem mit der Fähigkeit der Plasmalemma-H⁺-ATPase zusammenhängen könnte, unter Salzstress einen ausreichenden Protonengradienten aufzubauen. Eine Hemmung der Pumpaktivität der Plasmalemma-H⁺-ATPase wäre also im Fall der Alkalisierung des Blattapoplasten *Vicia faba* unter Salzstress denkbar.

Eine geringe Wasserverfügbarkeit aufgrund des durch Salzstress bedingten niedrigen Wasserpotenzials verursacht in der ersten Phase von Salzstress eine Verminderung der Wachstumsrate sowie metabolische Änderungen, die mit denen durch Trockenstress verursachten Änderungen identisch sind (Munns, 2002). Aus diesem Grunde werden in der vorliegenden Arbeit häufig die Folgen von Trockenstress mit den Folgen von Salzstress verglichen. Da sich die gestressten Pflanzen hier auch in der ersten Phase von Salzstress befinden, wäre ein durch den Salzstress erzeugter osmotischer Effekt als Auslöser für den Alkalisierungsprozess des Blattapoplasten denkbar. Für *Vicia faba* konnte gezeigt werden, dass ein Angebot von 38 mM Sorbitol ähnlich wie ein Angebot von 20 mM NaCl oder KCl am Blattstiel eines abgeschnittenen Blattes den pH-Wert im Blattapoplasten ansteigen lässt (Felle und Hanstein, 2002). Dabei konnte auch nachgewiesen werden, dass das Chlorid im Falle der Zugabe von KCl bzw. NaCl keinen Einfluss auf den pH-Wert im Apoplasten hat. Bei diesen Ergebnissen ist allerdings zu berücksichtigen, dass es sich hierbei um kurzfristige Änderungen im Zeitrahmen einer halben Stunde handelt und die Zugabe des Osmotikums über die Petiole des abgeschnittenen Blattes erfolgte. Es wird beschrieben, dass pH-Messungen des Blattapoplasten von intakten Gerstepflanzen nach einer Gabe von 100 mM Sorbitol an die Wurzel keine Änderungen des pH-Wertes zeigen (Felle *et al.*, 2005). Bei diesen Resultaten handelt es sich jedoch um die Reaktion der Pflanze bis zu 60 Minuten nach Zugabe des Osmotikums und die Ergebnisse sind daher kaum mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu vergleichen. Bei Pflanzen, die über einen längeren Zeitraum unter Trockenstress standen, wurde ebenfalls eine pH-Erhöhung im Xylemsaft von Pflanzen nachgewiesen (Gollan *et al.*, 1992; Wilkinson und Davies, 1997), was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Felle und Hanstein (2002) zeigten für *Vicia faba*,

dass der apoplastische pH-Wert nur als Signal bei Trockenstress fungiert, wenn parallel dazu auch die Osmolarität im Petiolenbad erhöht ist. Dass der apoplastische pH-Wert in dem Fall allein als Signal einer Stresssituation der Pflanze fungiert, kann demnach ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend sei zu erwähnen, dass eine apoplastische Alkalisierung scheinbar eine generelle Reaktion auf Stress ist (Felle *et al.*, 2005). Felle und Hanstein (2002) schlussfolgerten, dass der pH-Wert im Apoplasten wesentlich geringer gepuffert ist als der im Cytosol und Pflanzen somit über pH-Änderungen im Apoplasten sehr schnell auf neue Situationen in ihrer Umwelt reagieren können. Man sollte dabei auch berücksichtigen, dass es vermutlich große Unterschiede zwischen den Stressreaktionen von Kurz- und Langzeitstress gibt. Zudem reagieren die verschiedenen Pflanzenarten sehr unterschiedlich auf Stress.

4.4.4 Signalübertragung bei Salzstress

Um eine Reaktion im Spross von Pflanzen unter Salzstress zu bewirken, ist eine Signalübertragung von der Wurzel notwendig. Abscisinsäure (ABA) ist als wichtiges Phytohormon bekannt, welches bei Wasserstressbedingungen von der Wurzel zum Spross gesendet wird, um dort Wasserverluste durch Transpiration und Blattwachstum zu regulieren (Hartung *et al.*, 2002; Taiz und Zeiger, 2002; Xiong und Ishitani, 2006). ABA bewirkt eine Stomataschließung und bezweckt somit einen Schutz vor Austrocknung unter Trockenstress bzw. osmotischem Stress (Zhang und Outlaw, 2001; Israelsson *et al.*, 2006). ABA beeinflusst aber nicht nur die Stomataregulierung, sondern hemmt auch das Wachstum aufgrund verringerter Zellwandextensibilität (Thompson *et al.*, 1997; Cramer *et al.*, 1998; Fricke *et al.*, 2004). Zumindest unter Trockenstress scheint der erhöhte pH-Wert im Blattapoplasten von Pflanzen eine gesteigerte Freigabe von ABA zu bewirken (Hartung *et al.*, 1983; Cornish und Zeewart, 1985; Hartung *et al.*, 1988; Bacon *et al.*, 1998). Eine durch Fusicoccin induzierte pH-Absenkung im Blattapoplasten von Baumwolle veranlasst entsprechend eine Reduzierung des ABA-Gehaltes im Xylemsaft (Hartung *et al.*, 1988), was den direkten Zusammenhang von apoplastischem pH-Wert und ABA im Apoplasten bestätigt. Eine pH-Erhöhung im Xylemsaft von Blättern bewirkt eine Stomataschließung (Wilkinson und Davies,

1997). Bei einem erhöhten apoplastischen pH-Wert befindet sich ABA in einem unprotonierten Zustand und liegt ungeladen vor. Dadurch wird ABA besser über den Transpirationsstrom zu den Schließzellen der Stomata transportiert, ohne zuvor in die benachbarten Mesophyllzellen zu gelangen (Cornish und Zeewart, 1985). Dazu wird eine sehr geringe ABA-Konzentration benötigt, die bei ungestressten Pflanzen allein keine Auswirkung auf die Stomataregulierung hat (Wilkinson *et al.*, 1998). Es wurde vermutet, dass der Xylemsaft von gestressten Pflanzen nicht ausreichend ABA enthält, um eine physiologische Stressreaktion in den Blättern zu bewirken (Munns und King, 1988). An anderer Stelle wurde beobachtet, dass eine Alkalisierung eine Akkumulation von ABA im Apoplasten der Schließzellen hervorruft (Slovik *et al.*, 1992; Slovik und Hartung, 1992; Hartung *et al.*, 1998; Wilkinson und Davies, 2002). Umgekehrt wurde beschrieben, dass eine Zugabe von ABA am Blattstiel eines abgeschnittenen Blattes von *Vicia faba* (Felle und Hanstein, 2002) aber auch an die Wurzel von intakten Gerstenpflanzen (Felle *et al.*, 2005) eine pH-Erhöhung im Blattapoplasten zur Folge hat. Weiterhin wurde berichtet, dass eine Erhöhung der ABA-Konzentration erst nach Beginn einer stressinduzierten Wachstumsreduzierung eintrat (Dodd und Davies, 1994). Die genauen Mechanismen der pH-Wert-Erhöhung sind noch nicht geklärt (Wilkinson *et al.*, 1998). Es gibt Hinweise, dass eine Verminderung der Plasmalemma-H⁺-ATPase-Aktivität von Pflanzen unter Trockenstress den pH-Wert im Xylemsaft beeinflusst (Fromard *et al.*, 1995). Es wäre auch vorstellbar, dass es bei Trockenstress zu einer Aufkonzentrierung osmotisch wirksamer Substanzen kommt und die Auswirkungen mit denen von Salzstress vergleichbar wären. Als Folge von Trockenstress wird der pH-Wert im Xylem und somit auch im Blattapoplasten erhöht. Darauf folgend wird ein Teil des inaktiven ABAs in den Schließzellen freigegeben, was eine Stomataschließung zufolge hat (Wilkinson und Davies, 1997; Hartung *et al.*, 1998; Wilkinson und Davies, 2002). Bacon *et al.* (1998) berichten von einem Zusammenhang zwischen ABA und pH-Wert im Xylemsaft. Ein erhöhter pH-Wert im Xylemsaft bewirkt laut dieser Studie eine erhöhte ABA-Konzentration im Apoplasten, welche eine Wachstumshemmung hervorruft. ABA wird zudem eine entscheidende Rolle der Salzresistenz von Mais in der ersten Phase von Salzstress zugeschrieben (De Costa *et al.*, 2007).

Es wäre auch denkbar, dass der apoplastische pH-Wert selbst als Stresssignal fungiert (Wilkinson und Davies, 1997; Wilkinson *et al.*, 1998). In der Literatur wird beispielsweise ein ansteigender pH-Wert im Xylemsaft als eine Reaktion auf Trockenstress beschrieben, welche eine Signalfunktion besitzt und eine Stomataschließung in Blättern bewirkt (Wilkinson und Davies, 1997; Wilkinson *et al.*, 1998). Auch an anderer Stelle wird geschlossen, dass ein Protonentransport am Plasmalemma an sich nicht den intrazellulären pH-Wert regulieren kann (Gerendas und Schurr, 1999). Gegensätzlich dazu berichten aber Bacon *et al.* (1998), dass stressinduzierte pH-Änderungen im Xylemsaft zumindest keine Auswirkungen auf den Wasserhaushalt und die ABA-Konzentration von Blättern der Gerste haben. Ferner wird von Felle und Hanstein (2002) gezeigt, dass eingestellte pH-Änderungen am Blattstiel von *Vicia faba* nur sehr geringe Auswirkungen auf den pH-Wert im Blattapoplasten haben. Induzierte pH-Änderungen an der Wurzel von Gerste verursachten auch nach 60 Minuten noch keine Auswirkungen auf den pH-Wert im Blattapoplasten, womit der pH-Wert im Xylemsaft als Signal unter Stressbedingungen ausgeschlossen werden kann (Felle *et al.*, 2005). Da der pH-Wert in dieser Arbeit nur im Blattapoplasten ermittelt wurde, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob der pH-Wert im Xylem als Signalstoff zwischen Wurzel und Spross vermittelt.

Weiterhin wäre eine weitere mögliche Erklärung für die pH-Wert-Erhöhung unter Stress eine Veränderung der Nitratreduktase-Aktivität (Raven und Smith, 1976). Des Weiteren wären stressinduzierte Veränderungen der Ionenzusammensetzung des Xylemsaftes als Grund denkbar. Hierdurch könnte der Ionenaustausch zwischen Zellwand und Xylemleitbahnen und somit der pH-Wert des Xylemsaftes beeinflusst werden (Ryan *et al.*, 1992; Schurr *et al.*, 1992).

Eine andere Möglichkeit des ausschlaggebenden Signals an der Wurzel unter osmotischen Stress wäre ein rein hydraulisches Signal. Von Chazen und Neumann (1994) wurde gezeigt, dass eine Zellwandverhärtung in Maisblättern als wachstumshemmende Reaktion auf osmotischen Stress an der Wurzel folgt. Ähnliches konnte von Cramer *et al.* Gezeigt werden. Dieser Effekt wurde aber auch bei Pflanzen mit in flüssigem Stickstoff abgetöteten Wurzeln entdeckt, von denen man keine hormonellen Signale oder elektrophysiologischen Auswirkungen erwartet.

Auch der Calciumkonzentration im Cytosol wird die Funktion eines sekundären Botenstoffes als Signal unter Salzstress zugeschrieben (Xiong und Ishitani, 2006). Pflanzen reagieren unmittelbar auf die Zugabe von Natrium mit einer erhöhten Calciumkonzentration im Cytosol (Lynch *et al.*, 1989; Knight *et al.*, 1997; Zhu, 2002). Calcium spielt scheinbar auch eine wichtige Rolle als Signal im SOS-Signalpfad (salt overly sensitiv), bei dem überschüssiges Natrium mit Hilfe von Na^+/H^+ -Antiportern in der Plasmamembran wieder aus dem Cytosol gelangt (Zhu, 2002).

4.5 Zusammenhang von Blattwachstum und pH-Wert im Blattapoplasten

4.5.1 Beurteilung der digitalen Bildsequenzverarbeitung zur Wachstumsbestimmung

Obwohl die DISP-Methode einen sehr hohen technischen Aufwand erfordert, ist sie eine geeignete Methode zur präzisen Vermessung von Wachstumsmustern (Walter, 2001). Es kann hierbei gleichzeitig eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung erreicht werden. Die Aufnahme und die Auswertung können automatisiert durchgeführt werden und die Methode kann auf Wachstumsprozesse verschiedenster räumlicher und zeitlicher Dimensionen skaliert werden. Trotz großer anfallender Datenmengen können für die Interpretation der Ergebnisse die Parameter auf ein sinnvolles Maß reduziert werden. Für den Messprozess wird physiologisch inaktives Licht im nahen Infrarotbereich verwendet, was zum einen Messungen im Dunkeln ermöglicht und zum anderen für strukturreiche Bilder sorgt und somit künstliche Markierungen nicht mehr notwendig sind (Walter, 2001). Als Nachteil der DISP-Methode werden die für die Messung notwendige Fixierung der Blätter genannt, was zu einer Verhinderung der natürlichen nyctinastischen Bewegungen (tagesperiodische Bewegungen von Laubblättern) führt (Walter *et al.*, 2002). Diese fast ausschließlich vertikalen Bewegungen beruhen auf Turgorveränderungen in speziellen Geweben und sind nicht mit der Expansion eines Organs verbunden (Bünning und Moser, 1966; Herbert, 1992). Es handelt sich hierbei allerdings nicht um Wachstum, da unter pflanzlichem Wachstum eine irreversible Volumen- und Substanzzunahme verstanden wird, die an die lebende Zelle gebunden ist (Strasburger, 2002). Dennoch wird durch die Fixierung der Blätter das Wachstum gehemmt. Diese Hemmung kann allerdings durch pflanzenspezifisch entsprechende Zugkräfte an den Blättern kompensiert werden (Walter, 2001; Walter *et al.*, 2002). Für die vorliegende Arbeit ist die DISP-Methode wegen der oben genannten Gründe die optimale Methode, um die Wachstumsrate von Blättern über den Tagesverlauf zu erfassen.

4.5.2 Wachstumsmuster von *Vicia faba* im Tagesgang

Abbildung 27 (S. 41) zeigt den mit der DISP-Methode gemessenen Wachstumstagesgang vom jüngsten aufgefalteten Blatt von *Vicia faba*. Es lässt sich ein Wachstumsmaximum zu Beginn der Dunkelphase beobachten. Die relative Blattwachstumsrate ist insgesamt in der Dunkelphase höher als in der Lichtphase. Der Wachstums-Tagesgang für *Vicia faba* tritt unter den gegebenen Bedingungen reproduzierbar auf. Es handelt sich wahrscheinlich um einen pflanzenartsspezifischen endogenen, circadianen Rhythmus (Nultsch, 2001), der mit einer genetischen Anpassung an die 24-Stunden-Periodenzeit der Natur zu begründen ist (Mohr und Schopfer, 1992). Diese tageszeitliche Variation der Wachstumsaktivität kann durch diurnal regulierte physiologische Prozesse bedingt sein, aber es kann auch kurzfristige Wachstumsreaktionen auf Umweltveränderungen geben (Shackel *et al.*, 1987). Diese „innere Uhr“ der Pflanze ist keine Folge des tagesperiodischen Lichtwechsels, aber sie lässt sich von äußeren Einflüssen wie zum Beispiel Licht „justieren“ (Mohr und Schopfer, 1992).

Unabhängig der für die Pflanzenanzucht eingestellte Bedingungen am Tag und in der Nacht (siehe Kapitel 2.1, S.8) gibt es viele mögliche Begründungen für die Änderungen von Wachstumsraten im Tagesverlauf. Es wurde für wachsende Blätter der Weinrebe bereits von höherem Turgordruck in der Dunkelphase berichtet, was zu einer kurzfristig erhöhten Blattexpansionsrate führt (Shackel *et al.*, 1987). Auch eine Erhöhung der Luftfeuchtigkeit bewirkt in der genannten Studie eine kurzzeitige Steigerung der Blattexpansion. Weiterhin wurden Änderungen der Membranpotenziale als Reaktion auf einen Lichtwechsel genannt, welche sich auf verschiedene Ionenkanäle auswirken (Elzenga *et al.*, 1995; Shabala und Newman, 1999). Dies wiederum kann einen Einfluss auf die Wachstumsaktivität haben. Kohlenhydrate spielen eine Rolle für pflanzliches Wachstum als Energieträger aber auch als Bestandteile der Zellwand (Cosgrove, 2005). Anhand von Arbeiten mit Mutanten von *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Kohlenhydratstoffwechsel und Wachstumsaktivität von Blättern im Tagesverlauf gibt (Wiese *et al.*, 2007). Letztlich sei

zusammenzufassen, dass die Mechanismen der Wachstumsdynamik der verschiedenen Pflanzenarten noch weitgehend unbekannt sind (Matsubara *et al.*, 2006) und dass es große Unterschiede zwischen den Pflanzenarten bezüglich des Wachstumstagesganges gibt (Walter, 2001). Räumliche und zeitliche Variationen des Blattwachstums werden durch eine Vielzahl von endogenen und exogenen Faktoren beeinflusst (Walter und Schurr, 2005).

4.5.3 Veränderung des apoplastischen pH-Wertes im Tagesgang

Neben der durch Stomataöffnung und -schließung bedingte Änderungen der Druckverhältnisse im Blatt (Shackel *et al.*, 1987) ist als wahrscheinliche Ursache für die Wachstumsänderung nach Lichtwechsel die Änderung der pH-Verhältnisse im Blattapoplasten zu nennen (Mühling *et al.*, 1995). In der Literatur wird beschrieben, dass eine Ansäuerung des Apoplasten von Mesophyllzellen von photosynthetischen Reaktionen induziert wird (Petzold und Dahse, 1988; Marre *et al.*, 1989; Van Volkenburgh und Cleland, 1990). Wachsende Blätter reagieren auf Belichtung mit einer Ansäuerung des Apoplasten (Van Volkenburgh und Cleland, 1980), welche wiederum für eine säureinduzierte Zellwandstreckung nötig ist (Rayle und Cleland, 1992). Für kurzfristige Lichtwechsel wurde für *Bromus erectus* (Hanstein und Felle, 1999) und für *Vicia faba* (Mühling und Läuchli, 2000) berichtet, dass der pH-Wert im Blattapoplasten wenige Minuten nach Ausschalten des Lichtes um etwa 0,4 pH-Einheiten ansteigt, während beim erneuten Anschalten des Lichtes ein pH-Abfall in der gleichen Höhe gezeigt wird. Die Messungen zu diesen Ergebnissen beziehen sich auf den kurzfristigen Einfluss eines Lichtwechsels auf den apoplastischen pH-Wert von Blättern. In dieser Arbeit wurde allerdings der langfristige Verlauf des apoplastischen pH-Wertes im Tagesgang erfasst. Abbildung 28 (S. 41) zeigt die Veränderungen des pH-Wertes im Blattapoplasten von *Vicia faba* im Tagesgang, welche mit der bildverarbeitenden Fluoreszenzmikroskopie ermittelt wurden. Es ist deutlich zu erkennen, dass der apoplastische pH-Wert nachts um etwa 0,2 pH-Einheiten niedriger ist als am Tag.

Wie bereits in Abschnitt 4.3 (S. 58) beschrieben, wäre auch hier eine entscheidende Rolle der Expansine denkbar. Das pH-Optimum von Expansinen liegt zwischen 3,5 und 4,5 (Cleland, 2002). Dieser pH-Bereich wird im ungestörten Blattapoplasten in

der Regel nicht erreicht. Anhand des apoplastischen pH-Wertes in wachsenden Blättern der Ackerbohne im Tagesgang (Abb. 28, S. 41) lässt sich allerdings erkennen, dass der pH-Wert in der Nacht sich zumindest diesem Optimum annähert. Es wäre daher möglich, dass der Wirkungsgrad der Expansine aufgrund des niedrigeren pH-Wertes in der Nacht höher ist, womit die erhöhten Wachstumsraten in der Nacht zu begründen wären (Abb. 27, S. 41). Der ansteigende pH-Wert könnte demnach die Expansinaktivität hemmen und somit für die verminderte Wachstumsrate am Tag verantwortlich sein. Es wäre demzufolge denkbar, dass die zeitliche Ausprägung der pH-Änderungen im Tagesverlauf über die Wirkung des Expansins eine Auswirkung auf das beobachtete Wachstumsmuster hat.

4.5.4 Zusammenhang von Blattwachstum und pH-Wert im Blattapoplasten

Viele grundlegende Fragen zu den Mechanismen der Regulation des Blattwachstums sind unbeantwortet (Dale, 1988). Blätter von dikotylen Pflanzen weisen an der Blattbasis in der Regel höhere Wachstumsraten als an der Blattspitze auf (Schurr *et al.*, 2000). Die Blattspitze ist somit einige Tage früher ausgewachsen als die Blattbasis (Turgeon, 1989). Eine Messung von Blättern von *Vicia faba* mit der bildverarbeitenden Fluoreszenzmikroskopie nach partieller Infiltration mit Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran zeigte keine signifikanten pH-Unterschiede zwischen den eingeteilten Blattabschnitten Blattspitze, Blattmitteil und Blattbasis (nicht abgebildet). In Abbildung 26 (S. 39) wird dargestellt, dass es im Bereich der Blattbasis eine zum Erntezeitpunkt besonders aktive Wachstumszone gibt und ein deutlicher Basis-Spitze-Gradient existiert. Es wäre denkbar, dass in dieser Arbeit kein pH-Gradient im Blatt gefunden wurde, weil bei der Auswahl des Blattstückes für die Fluoreszenzmikroskopie vermutlich nicht immer ein Blattstück genau aus dem Bereich mit besonders hoher Wachstumsrate ausgewählt werden konnte. Denn bei farbcodierten Darstellungen der Wachstumsratenverteilung auf der Blattoberfläche wird stets ein sehr heterogenes Wachstumsmuster beobachtet (Walter, 2001), was die Auswahl des geeigneten Blattsegments erschwert.

Pseudo-ratiometrische Messungen mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop in Wurzelhaaren von *Arabidopsis* zeigten eine Ansäuerung der Zellwand während der

Wachstumsphase (Bibikova *et al.*, 1998). Eine künstliche pH-Erhöhung im Apoplasten mit Puffern verringerte hingegen das Wachstum. Dieser Vorgang war reversibel, was zeigt, dass es sich nicht um einen toxischen Einfluss auf das Wachstum handelt. Eine Verminderung der Wachstumsaktivität könnte ebenfalls durch die Hemmung der ATPase mit Vanadat oder Cyanid bewirkt werden, was ein Hinweis auf den Zusammenhang von apoplastischem pH-Wert und Wachstumsaktivität sein könnte. Da man mit einer einfachen Ansäuerung des Apoplasten keine Wachstumssteigerung erzielen konnte, muss davon ausgegangen werden, dass der pH-Wert im Apoplasten nicht alleine und direkt das Wachstum beeinflussen kann, sondern dass der Wachstumsprozess durch ein komplexes Regulationssystem gesteuert wird (Bibikova *et al.*, 1998). In der Literatur gibt es weitere Hinweise, dass wachsende Pflanzenorgane einen niedrigeren pH-Wert im Vergleich zu den voll ausgewachsenen Organen aufweisen (Grignon und Sentenac, 1991). Das ist in dieser Arbeit zwar nicht der Fall (Abb. 29, S. 42), aber es gibt einen deutlichen Zusammenhang zwischen Blattlängenzuwachs und dem apoplastischen pH-Wert von wachsenden Blättern (Abb. 30, S. 43). Es lässt sich aus den beiden genannten Abbildungen schlussfolgern, dass die Wachstumsaktivität bei wachsenden Blättern umso höher ist, je niedriger der pH-Wert im Blattapoplasten ist. Einen weiteren Hinweis dafür geben die Ergebnisse des Tagesganges der Wuchsrates (Abb. 27, S. 41) und des apoplastischen pH-Wertes (Abb. 28, S. 41). In der Nacht ist sowohl der pH-Wert im Blattapoplasten erniedrigt als auch die relative Wuchsrates von Blättern erhöht. Diese Beobachtungen liegen im Einklang mit der Säure-Wachstums-Hypothese (Hager *et al.*, 1971; Hager, 2003), die somit in dieser Arbeit bestätigt werden kann. In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass ein säureinduziertes Wachstum bereits bei pH-Werten zwischen 5 und 6 erfolgen kann (Rayle, 1973; Jacobs und Ray, 1976; Cleland *et al.*, 1987). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten apoplastischen pH-Werte liegen größtenteils in diesem in der Literatur genannten pH-Bereich. Die dargestellten Wachstumsunterschiede können daher durchaus mit den pH-Änderungen im Blattapoplasten unter Salzstress und im Tagesgang zusammenhängen.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der apoplastische pH-Wert in wachsenden Blättern von *Vicia faba* unter Salzstress signifikant erhöht war und dass es einen engen Zusammenhang von pH-Wert des Blattapoplasten und Wachstumsaktivitäten von Blättern gibt. Es bliebe zu prüfen, ob die in der vorliegenden Arbeit gefundene Alkalisierung im Blattapoplasten von *Vicia faba* unter Salzstress direkt mit der Pumpaktivität der Plasmalemma-H⁺-ATPase gekoppelt ist, so wie es für Mais bereits gezeigt wurde (Zörb *et al.*, 2005). Hierzu wäre erstmals eine Isolierung von Plasmalemma-Vesikeln der Ackerbohne durchzuführen.

Um zu prüfen, ob die Auswirkungen auf den pH-Wert im Blattapoplasten in diesem Fall lediglich durch den rein osmotischen Effekt in der ersten Phase von Salzstress zu begründen sind, wären *in vivo*-Messungen mit pH-sensitiven Mikroelektroden und/oder ratiometrischer Fluoreszenzmikroskopie von Blättern von *Vicia faba* zu empfehlen, welche nur mittels Osmotika wie zum Beispiel Polyethylenglycol gestresst wurden. Dabei ist vor allem die Langzeitwirkung an vollständigen intakten Pflanzen sinnvoll, da sich viele Angaben aus der Literatur oft nur an kurzfristigen Auswirkungen orientieren. Interessant wäre es hierbei auch zu wissen, wann der apoplastische pH-Wert von ganzen Pflanzen nach Beginn der Salzbehandlung zu steigen beginnt. Die Messung mit ionensensitiven Mikroelektroden wäre trotz ihrer hervorragenden Eignung für kurzfristige Effekte für eine solche Messungen über einen langen Zeitraum nur bedingt geeignet, weil die richtige Position der Elektrode innerhalb der Spaltöffnung durch die Wachstumsbewegung des Blattes nach mehreren Stunden oft nicht mehr gewährleistet werden kann. Denkbar wären hierzu eher viele Einzelernten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlungsbeginn und Messungen mit der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie. Weiterhin gibt es noch viele Unklarheiten über die genauen physiologischen Ursachen der Wachstumshemmung und letztlich der Ertragsminderung von Kulturpflanzen unter Salzstress. Diese Unklarheiten gilt es mit dem langfristigen Ziel der Entwicklung salzresistenter Kulturpflanzen aufzuklären.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es die Wachstumshemmungen von Blättern von *Vicia faba* in der ersten Phase von Salzstress zu untersuchen. Weiterhin sollten die Untersuchungen Aufschluss über den pH-Wert und die Kationenverhältnisse im Blattapoplasten unter Salzstressbedingungen bringen. Zudem sollten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Auskunft über den Zusammenhang von Blattwachstum und pH-Wert im Blattapoplasten von *Vicia faba* geben.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen folgende Ergebnisse:

1. Sowohl Spross- als auch Blattwachstum von *Vicia faba* werden in der ersten nach Munns (1993) beschriebenen Phase von Salzstress gehemmt. Die Trockenmasse der Wurzel wird im Gegensatz zu ihrer Frischmasse nicht durch Salzstress beeinflusst. Eine erhöhte Salzkonzentration in der Nährlösung bewirkt eine verlangsamte Pflanzenentwicklung bei *Vicia faba*.
2. Die Ergebnisse der beiden *in vivo*-Methoden (ratiometrische Fluoreszenzmikroskopie und elektrophysiologische Untersuchungen mit pH-sensitiven Mikroelektroden) zeigen, dass der apoplastische pH-Wert im Blatt von *Vicia faba* unter Salzstress signifikant erhöht ist. Die salzstress-induzierte Alkalisierung findet nicht nur im stomatären Raum statt, sondern ist im gesamten Blattapoplasten nachzuweisen.
3. Bei intakten Blättern von *Vicia faba* kann in Bezug auf Tageszeit und Blattalter eine negative Korrelation zwischen Wachstum und dem pH-Wert im Apoplasten festgestellt werden. Für wachsende Blätter der Ackerbohne wurde ein reproduzierbarer Wachstumstagesgang mit einem Wachstumsmaximum am Tag-Nacht-Übergang dargestellt. Die relativen Wuchsraten der Blätter waren in der Nacht höher als am Tag. Parallel dazu wurde in der Nacht ein niedrigerer pH-Wert im Apoplasten von wachsenden Blättern gefunden. Die Säure-Wachstums-Hypothese kann hier mit einer Kombination zweier *in vivo*-Methoden (ratiometrische

Fluoreszenzmikroskopie und Wachstumsbestimmung mit Hilfe digitaler Bildsequenzverarbeitung) bestätigt werden.

4. Die Natriumkonzentration im Blattapoplasten steigt bei *Vicia faba* unter Salzstress signifikant an. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Wachstumsminderung der Blätter unter Salzstress durch die erhöhte Konzentration an Natrium im Blattapoplasten verursacht wird. Das durch Salzstress stark verminderte K^+/Na^+ -Verhältnis im Blatt belegt, dass *Vicia faba* als sehr salzsensitiv einzustufen ist. Die Ackerbohne verfügt scheinbar über keinen Natriumexklusionsmechanismus, der den Spross vor einer zu hohen Natriumkonzentration unter Salzstress zu schützen vermag.

Erstmals konnten mit Hilfe einer Kombination von zwei *in vivo*-Methoden die Auswirkung von Salzstress auf den apoplastischen pH-Wert im Blatt einer salzempfindlichen dikotylen Pflanze dargestellt werden. Der apoplastische pH-Wert im Blattapoplasten von *Vicia faba* wird unter Salzstress erhöht und ist in der Lichtphase höher als in der Dunkelphase. Blattwachstum ist unter Salzstress reduziert und in der Lichtphase niedriger als in der Dunkelphase. Es lässt sich daher schlussfolgern, dass ein zu hoher pH-Wert im Blattapoplasten das Blattwachstum verringert, was mit der Säure-Wachstums-Hypothese übereinstimmt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern jedoch nur einen kleinen Beitrag zur Aufklärung der salzinduzierten Wachstumsstörungen innerhalb eines komplexen physiologischen und biochemischen Systems der Pflanze. Weitere Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet werden auch zukünftig von besonderem Interesse vor allem im Hinblick auf die Entwicklung salzresistenter Pflanzen sein.

6 Summary

The aim of this research project was to investigate the growth reduction of leaves from broad bean (*Vicia faba*) grown under salinity. Further the investigations should give information of the pH value and cation conditions in the apoplast of the leaf under salt stress conditions. Moreover, the results of the *in vivo* measurements should show the relationship between leaf growth and apoplastic pH of *Vicia faba*.

In summary, the investigations show the following results:

1. Both shoot and leaf growth of broad bean are inhibited in the first phase of salt stresses proposed by Munns (1993). In contrary to the fresh weight, root dry weight was not affected by salt stress. Increasing the salt concentration in the nutrient solution causes decelerated plant development.

2. Measurements by means of ratiometric fluorescence microscopy, on the one hand, and the use of microelectrodes on the other, show that apoplastic pH of the leaves is significantly increased under salt stress. This stress-induced alkalization is not only the result of the substomatal cavity but it is found in the whole leaf tissue as well.

3. The measurements indicate that there is a negative correlation between leaf growth and apoplastic pH of intact leaves of *Vicia faba* regarding leaf age and daytime. For expanding leaves of *Vicia faba* a reproducible diurnal course of the relative growth rate (RGR) is represented. The RGR reaches its maximum at the beginning of the dark period and is lowered during the day. Contrary to the RGR, apoplastic pH is lower in the night. The acid growth hypothesis can be confirmed by the combination of two *in vivo* methods used in this investigation.

4. The sodium concentration in the leaf apoplast of broad bean under saline conditions increases significantly. Hence, the reason for the salt-induced leaf growth reduction could also be the increasing sodium concentration in the apoplast. The reduced K^+/Na^+ -ratio demonstrates that faba beans are very sensitive to salinity. The

Summary

results of the present investigation exhibit that *Vicia faba* apparently has no mechanism to exclude sodium from the shoot in order to protect it against high concentration of sodium under salinity.

For the first time the combination of two *in vivo* methods offers the opportunity to adequately clarify for the effects of salt stress on the apoplastic pH in leaves of a dicotyledonous plant sensitive to salt. The apoplastic pH in the leaves of *Vicia faba* is increased under salt stress and is higher in the light phase than in the dark phase. Leaf growth is reduced under salt stress and is lower in the light phase than in the dark phase. Hence, it can be concluded that an increased apoplastic pH reduces the leaf. This agrees with the acid growth hypothesis. Nevertheless, the results of the present work deliver only a small contribution to the clarification of the salt-induced growth reduction within the complicated physiological and biochemical system of the plant. Other research projects on this problem are needed to develop plants resistant to salt.

7 Literatur

Amtmann A, Sanders D (1999): Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. In 'Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology' pp. 75-112.

Apse MP, Blumwald E (2007): Na⁺ transport in plants. *Febs Letters* **581**, 2247-2254.

Ayala F, O'Leary JW, Schumaker KS (1996): Increased vacuolar and plasma membrane H⁺-ATPase activities in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *J. Exp. Bot.* **47**, 25-32.

Bacon MA, Wilkinson S, Davies WJ (1998): pH-regulated leaf cell expansion in droughted plants is abscisic acid dependent. *Plant Physiology* **118**, 1507-1515.

Bergmann W (1993): Ernährungsstörungen bei Kulturpflanzen (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart)

Bibikova TN, Jacob T, Dahse I, Gilroy S (1998): Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **125**, 2925-2934.

Bigot J, Binet P (1986): Study of the cation exchange capacity and selectivity of isolated root cell walls of *Cochlearia Anglica* and *Phaseolus Vulgaris* grown in media of different salinities. *Canadian Journal of Botany* **64**, 955-958.

Bigün J, Granlund GH (1987): Optimal orientation detection of linear symmetry. *Proceedings of the First International Conference on Computer Vision, London, UK.*

Blumwald E, Poole RJ (1987): Salt tolerance in suspension cultures of sugar beet - induction of Na⁺/H⁺ antiport activity at the tonoplast by growth in salt. *Plant Physiol.* **83**, 884-887.

Bowling DJF, Edwards A (1984): pH gradients in the stomatal complex of *Tradescantia virginiana*. *Journal of Experimental Botany* **35**, 1641-1645.

Brady NC (2002): The nature and properties of soils. *New Jersey, Prentice Hall.*

Bright GR, Fisher GW, Rogowska J, Taylor DL (1987): Fluorescence ratio imaging microscopy: temporal and spatial measurements of cytoplasmic pH. *Journal of Cell Biology* **104**, 1019-1033.

Bright GR, Fisher GW, Rogowska J, Taylor DL (1989): Fluorescence ratio imaging microscopy. *Methods in Cell Biology* **30**, 157-192.

Bünning E, Moser I (1966): Response-Kurven bei der Circadianen Rhythmik von Phaseolus. *Planta* **69**, 101-110.

Canny MJ (1987): Locating active proton extrusion pumps in leaves. *Plant Cell and Environment* **10**, 271-274.

Canny MJ (1995): Apoplastic water and solute movement: New rules for an old space. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**, 215-236.

Carden DE, Walker DJ, Flowers TJ, Miller AJ (2003): Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na⁺ and K⁺ to salt tolerance. *Plant Physiology* **131**, 676-683.

Carpita, NC und Gibeaut, DM (1993): Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* **3**, 1-30.

Chazen O, Neumann PM (1994): Hydraulic signals from the roots and rapid cell-wall hardening in growing maize (*Zea Mays* L.) leaves are primary responses to polyethylen glycol-induced water deficits. *Plant Physiology* **104**, 1385-1392.

Chen Y, Arriaga EA (2006): Individual acidic organelle pH measurements by capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* **78**, 820-826.

Chesson A, Gardner PT, Wood TJ (1997): Cell wall porosity and available surface area of wheat straw and wheat grain fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **75**, 289-295.

Cicek N, Cakirlar H (2002): The effects of salinity on some physiological parameters in two maize cultivars. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* **28**, 66-74.

Cleland RE (2002): The role of the apoplastic pH in cell wall extension and cell enlargement. In 'Handbook of plant growth - pH as the master variable'. (Ed. Z Rengel) pp. 131-148. (Marcel Dekker: New York).

Cleland RE, Cosgrove D, Tepfer M (1987): Long-term acid-induced wall extension in an in-vitro system. *Planta* **170**, 379-385.

Coester K (2000): Charakterisierung der Ionenverhältnisse im Blattapoplasten unter besonderer Berücksichtigung der Nährstoffauswaschung. *Dissertation aus der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*.

Cordovilla MD, Ligeró F, Lluch C (1994): Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen assimilation in nodules of faba bean (*Vicia faba* L.). *Applied Soil Ecology* **11**, 1-7.

Cornish K, Zeewart J (1985): Movement of abscisic acid into the apoplast in response to water stress in *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiology* **76**, 1029-1035.

Cosgrove DJ (1986): Biophysical control of plant cell growth. *Annual Review of Plant Physiology* **37**, 377-405.

Cosgrove DJ (1997): Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* **9**, 1031-1041.

Cosgrove DJ (1999): Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review of Plant Physiology And Plant Molecular Biology* **50**, 391-417.

Cosgrove DJ (2005): Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 850-861.

Cramer GR, Krishnan K, Abrams SR (1998): Kinetics of maize leaf elongation IV. Effects of (+)- and (-)-abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* **49**, 191-198.

Cramer GR, Lauchli A, Polito VS (1985): Displacement of Ca^{2+} by Na^{+} from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? *Plant Physiology* **79**, 207-211.

Cramer GR, Schmidt CL, Bidart C (2001): Analysis of cell wall hardening and cell wall enzymes of salt-stressed maize (*Zea mays*) leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**, 101-109.

Dale JE (1988): The control of leaf expansion. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**, 267-295.

Dannel F, Pfeffer H, Marschner H (1995): Isolation of Apoplasmic Fluid from Sunflower Leaves and Its Use for Studies on Influence of Nitrogen Supply on Apoplasmic pH. *Journal of Plant Physiology* **146**, 273-278.

De Costa W, Zörb C, Hartung W, Schubert S (2007): Salt resistance is determined by osmotic adjustment and abscisic acid in newly developed maize hybrids in the first phase of salt stress. *Physiologia Plantarum* **131**, 311-321.

Deitmer JW, Schild D (2000): Ca^{2+} und pH: Ionenmessungen in Zellen und Geweben. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg*.

Delgado MJ, Ligeró F, Lluch C (1994): Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biology and Biochemistry* **26**, 371-376.

Dodd IC, Davies WJ (1994): Leaf growth responses to ABA are temperature dependent. *Journal of Experimental Botany* **45**, 903-907.

Edwards KL, Scott TK (1974): Rapid growth responses of corn root segments: Effect of pH on elongation. *Planta* **119**, 27-37.

Edwards MC, Smith GN, Bowling DJF (1988): Guard cells extrude protons prior to stomatal opening - a study using fluorescence microscopy and pH micro-electrodes. *Journal of Experimental Botany* **39**, 1541-1547.

Elzenga JTM, Prins HBA, Van Volkenburgh E (1995): Light-induced membrane potential changes of epidermal and mesophyll cells in growing leaves of *Pisum sativum*. *Planta* **197**, 127-134.

Essa TA (2002): Effect of salinity stress on growth and nutrient composition of three soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science* **188**, 86-93.

FAO (2006): Extent and causes of salt-affected soils in participating countries. (Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Fasano JM, Swanson SJ, Blancaflor EB, Dowd PE, Kao T-h, Gilroy S (2001): Changes in root cap pH are required for the gravity response of the Arabidopsis root. *Plant Cell* **13**, 907-922.

Felle H, Bertl A (1986): The fabrication of H⁺-selective liquid-membrane micro-electrodes for use in plant cells. *Journal of Experimental Botany* **137**, 1416-1428.

Felle H, Hanstein S (2002): The apoplastic pH of the substomatal cavity of *Vicia faba* leaves and its regulation responding to different stress factors. *Journal of Experimental Botany* **53**, 73-82.

Felle HH (1998): The apoplastic pH of the *Zea mays* root cortex as measured with pH-sensitive microelectrodes: aspects of regulation. *Journal of Experimental Botany* **49**, 987-995.

Felle HH (2006): Apoplastic pH during low-oxygen stress in barley. *Annals of Botany* **98**, 1085-1093.

Felle HH, Herrmann A, Hüchelhoven R, Kogel KH (2005): Root-to-shoot signalling: apoplastic alkalization, a general stress response and defence factor in barley (*Hordeum vulgare*). *Protoplasma* **227**, 17-24.

Ferguson IB (1984): Calcium in plant senescence and fruit ripening. *Plant, Cell & Environment* **7**, 477-489.

Flowers T (1985): Physiology of halophytes. *Plant and Soil* **89**, 41-56.

Flowers TJ (2004): Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* **55**, 307-319.

Flowers TJ, Hajibagheri MA (2001): Salinity tolerance in *Hordeum vulgare*: ion concentrations in root cells of cultivars differing in salt tolerance**. *Plant and Soil* **231**, 1-9.

Flowers TJ, Hajibagherp MA, Yeo AR (1991): Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. *Plant, Cell & Environment* **14**, 319-325.

Flowers TJ, Troke PF, Yeo AR (1977): The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **28**, 89-121.

Flowers TJ, Yeo AR (1995): Breeding for salinity resistance in crop plants: Where next? *Australian Journal of Plant Physiology* **22**, 875-884.

Fricke W, Akhiyarova G, Veselov D, Kudoyarova G (2004): Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate in response to salinity in barley leaves. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1115-1123.

Fricke M, Parsons A, Tlalka M, Blancaflor E, Gilroy S, Meyer A, Plieth C (2001): Fluorescent Probes for Living Cells. In 'Plant Cell Biology: A Practical Approach, Second Edition'. (Eds C Hawes, B Satiat-Jeunemaitre) pp. 72-76. (Oxford University Press, Oxford).

Fromard L, Babin V, Fleurat-Lessard P, Fromont JC, Serrano R, Bonnemain JL (1995): Control of vascular sap pH by the vessel-associated cells in woody species. *Physiological and Immunological Studies* **108**, 913-918.

Fuglsang, AT, Guo, Y., Cuin, TA, Qiu, Q., Song, C., Kristiansen, KA, Bych, K., Schulz, A., Shabala, S., Schumaker, KS, Palmgren, MG und Zhu, J-K (2007): Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell* **19**, 1617-1634.

Gao DJ, Knight MR, Trewavas AJ, Sattelmacher B, Plieth C (2004): Self-reporting arabidopsis expressing pH and [Ca²⁺] indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress. *Plant Physiology* **134**, 898-908.

Gerendas J, Schurr U (1999): Physicochemical aspects of ion relations and pH regulation in plants - a quantitative approach. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1101-1114.

Gilroy S, Bethke PC, Jones RL (1993): Calcium homeostasis in plants. *Journal of Cell Science* **106**, 453-461.

Goldberg, R, Bordendave, M, Pierron, M, Prat, R und Mutaftschiev, S (1992): Enzymatic process in growing cell walls, possible control by pectinmethylesterase. In: *Plant cell walls as biopolymers with physiological functions*. Masuda, Y. Osaka, Yamada Science Foundation: 269-274.

Gollan T, Schurr U, Schulze ED (1992): Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. I. The concentration of cations, anions, amino acids in, and pH of, the xylem sap. *Plant, Cell & Environment* **15**, 551-559.

Gowing DJG, Davies WJ, Jones HG (1990:) A positive root-sourced signal as an indicator of soil drying in apple, *malus x domestica* Borkh. *Journal of Experimental Botany* **41**, 1535-1540.

Granier C, Tardieu F (1998): Spatial and temporal analyses of expansion and cell cycle in sunflower leaves . A common pattern of development for all zones of a leaf and different leaves of a plant. *Plant Physiology* **116**, 991-1001.

Grattan SR, Grieve CM (1999): Salinity mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae* **78**, 127-157.

Greenway H, Munns R (1980): Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **31**, 149-190.

Greenway H, Osmond CB (1972): Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. *Plant Physiology* **49**, 256-259.

Grignon C, Sentenac H (1991): pH and ionic conditions in the apoplast. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 103-123.

Hager A (2003): Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *Journal of Plant Research* **116**, 483-505.

Hager A, Menzel H, Krauss A (1971): Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. *Planta* **100**, 47-75.

Halperin SJ, Gilroy S, Lynch JP (2003): Sodium chloride reduces growth and cytosolic calcium, but does not affect cytosolic pH, in root hairs of *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of Experimental Botany* **54**, 1269-1280.

Hanstein S, Felle HH (1999): The influence of atmospheric NH₃ on the apoplastic pH of green leaves: a non-invasive approach with pH-sensitive microelectrodes. *New Phytologist* **143**, 333-338.

Hartung W, Kaiser W, Burschka C (1983): Release of ABA from leaf strips under osmotic stress. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **112**, 131-138.

Hartung W, Radin JW, Hendrix DL (1988): Abscisic acid movement into the apoplastic solution of water-stressed cotton leaves. *Plant Physiology* **86**, 908-913.

Hartung W, Sauter A, Hose E (2002): Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *Journal of Experimental Botany* **53**, 27-32.

Hartung W, Wilkinson S, Davies W (1998): Factors that regulate abscisic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. *Journal of Experimental Botany* **49**, 361-367.

Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000): Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology And Plant Molecular Biology* **51**, 463-499.

Haugland RP (1996): Molecular Probes - Handbook of fluorescent probes and research chemicals. *Sixth Edition, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA*.

HauBecker H, Spies H (1999): Motion. *Handbook of computer Vision and Applications (B. Jähne, H. HauBecker und P. Geißler), Academic Press, San Diego, USA*, 310-369.

Hawes C, Satiat-Jeunemaitre B (2001): Plant Cell Biology: A Practical Approach, Second Edition. *Oxford University Press, Oxford*, 72-76.

He T, Cramer GR (1996): Abscisic acid concentrations are correlated with leaf area reductions in two salt-stressed rapid-cycling Brassica species. *Plant and Soil* **179**, 25-33.

Heckenberger U, Roggatz U, Schurr U (1998): Effect of drought stress on the cytological status in *Ricinus communis*. *Journal of Experimental Botany* **49**, 181-189.

Heckenberger U, Schurr U, Schulze ED (1996): Stomatal response to abscisic acid fed into the xylem of intact *Helianthus annuus* (L.) plants. *Journal of Experimental Botany*. **47**, 1405-1412.

Helal HM, Mengel K (1981): Interaction between light intensity and NaCl salinity and their effects on growth, CO₂ assimilation, and photosynthate conversion in young broad beans. *Plant Physiology* **67**, 999-1002.

Herbert TJ (1992): Geometry of heliotropic and nyctinastic leaf movements. *American Journal of Botany* **79**, 547-550.

Hoffmann B, Kosegarten H (1995): FITC-dextran for measuring apoplast pH and apoplastic pH gradients between various cell types in sunflower leaves. *Physiologia Plantarum* **95**, 327-335.

Hoffmann B, Plänker R, Mengel K (1992): Measurements of pH in the apoplast of sunflower leaves by means of fluorescence. *Physiologia Plantarum* **84**, 146-153.

Husted S, Schjoerring JK (1995): Apoplastic pH and ammonium concentration in leaves of *Brassica napus* L. *Plant Physiology* **109**, 1453-1460.

Israelsson M, Siegel RS, Young J, Hashimoto M, Iba K, Schroeder JI (2006): Guard cell ABA and CO₂ signaling network updates and Ca²⁺ sensor priming hypothesis. *Current Opinion In Plant Biology* **9**, 654-663.

Jacobs M, Ray PM (1976): Rapid auxin-induced decrease in free space pH and its relationship to auxin-induced growth in Maize and Pea. *Plant Physiology* **58**, 203-209.

Jaleel CA, Sankar B, Sridharan R, Panneerselvam R (2008): Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turkish Journal of Biology* **32**, 79-83.

James RA, Rivelli AR, Munns R, Caemmerer Sv (2002): Factors affecting CO₂ assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat. *Functional Plant Biology* **29**, 1393-1403.

Jones DL, Shaff JE, Kochian LV (1995): Role of calcium and other ions in directing root hair tip growth in *Limnobium stoloniferum*. *Planta* **197**, 672-680.

Kader MA, Lindberg S (2005): Uptake of sodium in protoplasts of salt-sensitive and salt-tolerant cultivars of rice, *Oryza sativa* L. determined by the fluorescent dye SBFI. *Journal of Experimental Botany* **56**, 3149-3158.

Keller P, Deuel H (1957): Kationenaustauschkapazität und Pektidgehalt von Pflanzenwurzeln. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **79**, 119-131.

Kerkeb L, Donaire JP, Rodriguez-Rosales MP (2001): Plasma membrane H⁺-ATPase activity is involved in adaptation of tomato calli to NaCl. *Physiologia Plantarum* **111**, 483-490.

Klement Z (1965): Method of obtaining fluid from the intercellular spaces of foliage and the fluid's merit as substrate for phyto-bacterial pathogens. *Phytopathological Notes* **55**, 1033-1034.

Knee M (1982): Fruit softening III. Requirement for oxygen and pH effects. *Journal of Experimental Botany* **33**, 1263-1269.

Knight H, Trewavas AJ, Knight MR (1997): Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *The Plant Journal* **12**, 1067-1078.

Köhler W, Schachtel G, Voleske P (2002): Biostatistik – Eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler. 3. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Koyro H-W (1997): Ultrastructural and physiological changes in root cells of Sorghum plants (*Sorghum bicolor* × *S. sudanensis* cv. Sweet Sioux) induced by NaCl. *Journal of Experimental Botany* **48**, 693-706.

Koyro H-W (2002): Ultrastructural Effects of Salinity in Higher Plants. In 'Salinity: Environment - Plants - Molecules'. (Eds A Läuchli, U Lüttge). (Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Niederlande).

Kranz T (2004): Effekt einer Erholung von Wasserstressbedingungen auf die Mehlauresistenz von Gerste (*Hordeum vulgare* L.). *Diplomarbeit, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und Umweltmanagement, Justus-Liebig-Universität Giessen*.

Kurkdjian A, Guern J (1989): Intracellular pH: Measurement and importance in cell activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 271-303.

Kutschera U (1994): The current status of the acid-growth hypothesis. *New Phytologist* **126**, 549-569.

Larcher W (2001): Ökophysiologie der Pflanzen, 6. Auflage. (Ulmer Verlag, Stuttgart).

Link BM, Cosgrove DJ (1998): Acid-growth response and alpha-expansins in suspension cultures of bright yellow 2 tobacco. *Plant Physiology* **118**, 907-916.

Lockhart JA (1965): An analysis of irreversible plant cell elongation. *Journal of Theoretical Biology* **8**, 264-275.

- Lohaus G, Pennewiss K, Sattelmacher B, Hussmann M, Mühling KH (2001): Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia Plantarum* **111**, 457-465.
- Lynch JP, Cramer GR, Läuchli A (1986): Salinity reduces membrane-associated calcium in corn root protoplasts. *Plant Physiology* **83**, 390-394.
- Lynch JP, Polito VS, Läuchli A (1989): Salinity stress increases cytoplasmic Ca activity in maize root protoplasts. *Plant Physiology* **90**, 1271-1274.
- Lyons TOM, Ollerenshaw JH, Barnes JD (1999): Impacts of ozone on *Plantago major*: apoplastic and symplastic antioxidant status. *New Phytologist* **141**, 253-263.
- Maathuis FJM, Amtmann A (1999): K⁺Nutrition and Na⁺Toxicity: The basis of cellular K⁺/Na⁺ratios. *Annals of Botany* **84**, 123-133.
- MacDonald IR (1975): Effect of vacuum infiltration on photosynthetic gas exchange in leaf tissue. *Plant Physiology* **56**, 109-112.
- Marre E (1979): Fusicoccin: A tool in plant physiology. *Annual Review of Plant Physiology* **30**, 273-288.
- Marre MT, Albergoni FG, Moroni A, Marre E (1989): Light-induced activation of electrogenic H⁺ extrusion and K⁺ uptake in *Elodea densa* depends on photosynthesis and is mediated by the plasma membrane H⁺ ATPase. *Journal of Experimental Botany* **40**, 343-352.
- Marschner H (2002): Mineral nutrition of higher plants. (Academic Press: London).
- Marschner H, Ossenberg-Neuhaus H (1976): Langstreckentransport von Natrium in Bohnenpflanzen. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **139**, 139-142.
- Matsubara S, Hurry V, Druart N, Benedict C, Janzik I, Chavarria-Krauser A, Walter A, Schurr U (2006): Nocturnal changes in leaf growth of *Populus deltoides* are controlled by cytoplasmic growth. *Planta* **223**, 1315-1328.
- Matthews MA, van Volkenburgh E, Boyer JS (1984): Acclimation of leaf growth to low water potentials in sunflower. *Plant, Cell & Environment* **7**, 199-206.
- McCree KJ, Richardson SG (1987): Stomatal closure vs. osmotic adjustment: a comparison of stress response. *Crop Science* **27**, 539-543.
- McQueen-Mason S, Cosgrove DJ (1995): Expansin mode of action on cell walls: Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation and binding. *Plant Physiology* **107**, 87-100.
- McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ (1992): Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. *Plant Cell* **4**, 1425-1433.

Mengel K (1991): Ernährung und Stoffwechsel der Pflanzen, 7.Auflage (Gustav Fischer Verlag, Jena).

Michelena VA, Boyer SJ (1982): Complete turgor maintenance at low water potentials in the elongating region of maize leaves. *Plant Physiology* **69**, 1145-1149.

Mohr H, Schopfer P (1992): Pflanzenphysiologie. 4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin.

Morgan JM (1984): Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **35**, 299-319.

Mühling KH (1998): Charakterisierung der Ionenverhältnisse im Apoplasten von Blättern mit Hilfe der bildverarbeitenden ratiometrischen Fluoreszenz-Mikroskopie. *Habilitationsschrift, Agrarwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Shaker Verlag, Aachen.*

Mühling KH, Läuchli A (2000): Light-induced pH and K⁺ changes in the apoplast of intact leaves. *Planta* **212**, 9-15.

Mühling KH, Läuchli A (2002a): Determination of apoplastic Na⁺ in intact leaves of cotton by *in vivo* fluorescence ratio-imaging. *Functional Plant Biology* **29**, 1491-1499.

Mühling KH, Läuchli A (2002b): Effect of salt stress on growth and cation compartmentation in leaves of two plant species differing in salt tolerance. *Journal Of Plant Physiology* **159**, 137-146.

Mühling KH, Läuchli A (2003): Interaction of NaCl and Cd stress on compartmentation pattern of cations, antioxidant enzymes and proteins in leaves of two wheat genotypes differing in salt tolerance. *Plant and Soil* **253**, 219-231.

Mühling KH, Plieth C, Hansen UP, Sattelmacher B (1995): Apoplastic pH of intact leaves of *Vicia faba* as influenced by light. *Journal of Experimental Botany* **46**, 377-382.

Mühling KH, Sattelmacher B (1995): Apoplastic ion concentration of intact leaves of field bean (*Vicia faba*) as influenced by ammonium and nitrate nutrition. *Journal of Plant Physiology* **147**, 81-86.

Mühling KH, Sattelmacher B (1997): Determination of apoplastic K⁺ in intact leaves by ratio imaging of PBF1 fluorescence. *Journal of Experimental Botany* **48**, 1609-1614.

Munns R (1993): Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell and Environment* **16**, 15-24.

Munns R (2002): Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment* **25**, 239-250.

Munns R (2005): Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* **167**, 645-663.

Munns R, Guo J, Passioura JB, Cramer GR (2000): Leaf water status controls day-time but not daily rates of leaf expansion in salt-treated barley. *Functional Plant Biology* **27**, 949-957.

Munns R, King RW (1988): Abscisic acid is not the only stomatal inhibitor in the transpiration stream of wheat plants. *Plant Physiology* **88**, 703-708.

Munns R, Passioura JB (1984): Effect of prolonged exposure to NaCl on the osmotic pressure of leaf xylem sap from intact, transpiring barley plants *Australian Journal of Plant Physiology* **11**, 497-507.

Munns R, Tester M (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 651-681.

Munoz GE, Barlow PW, Palma B (1996): Effects of sea water on roots of *Prosopis alba* (Leguminosae) seedlings. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* **59**, 55-63.

Neves-Piestun BG, Bernstein N (2001): Salinity-induced inhibition of leaf elongation in maize is not mediated by changes in cell wall acidification capacity. *Plant Physiology* **125**, 1419-1428.

Nultsch W (2001): Allgemeine Botanik. 11. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart.

Oertli JJ (1968): Extracellular salt accumulation, a possible mechanism of salt injury in plants. *Agrochimica* **12**, 461-469.

Oparka KJ (1991): Uptake and compartmentation of fluorescent probes by plant Cells. *Journal of Experimental Botany* **42**, 565-579.

Ottow EA, Brinker M, Teichmann T, Fritz E, Kaiser W, Brosche M, Kangasjarvi J, Jiang XN, Polle A (2005): *Populus euphratica* displays apoplastic sodium accumulation, osmotic adjustment by decreases in calcium and soluble carbohydrates, and develops leaf succulence under salt stress. *Plant Physiology* **139**, 1762-1772.

Passioura JB (1988): Root signals control leaf expansion in wheat seedlings growing in drying soil. *Functional Plant Biology* **15**, 687-693.

Passioura JB, Fry SC (1992): Turgor and cell expansion: Beyond the Lockhart equation. *Australian Journal of Plant Physiology* **19**, 565-576.

Passioura JB, Munns R (2000): Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Functional Plant Biology* **27**, 941-948.

Peiter E (2002): Metabolitentransport im indeterminierten Leguminosenknöllchen Untersuchungen zu Struktur und Funktion der Transportwege von *Vicia faba* L. Dissertation, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und Umweltmanagement, Justus-Liebig-Universität Giessen.

Peters WS, Felle H (1991): Control of apoplast pH in corn coleoptile segments. 1: The endogenous regulation of cell wall pH. *Journal of Plant Physiology* **137**, 655-661.

Peters WS, Felle HH (1999): The correlation of profiles of surface pH and elongation growth in maize roots. *Plant Physiology* **121**, 905-912.

Peters WS, Lüthen H, Böttger M, Felle H (1998): The temporal correlation of changes in apoplast pH and growth rate in maize coleoptile segments. *Australian Journal of Plant Physiology* **25**, 21-25.

Petzold U, Dahse I (1988): Proton Extrusion by Leaf Discs of *Vicia faba* L.: Light- and Ion-stimulated H⁺ release. *Biologia Plantarum* **30**, 124-130.

Pitman MG, Läuchli A (2002): Global Impact of Salinity and Agricultural Ecosystems. In 'Salinity: Environment - Plants - Molecules'. (Eds A Läuchli, U Lüttge). (Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Niederlande).

Plieth C (1995): Bestimmung von Ionenkonzentrationen und ihrer Änderungen in grünen pflanzlichen Zellen und Geweben mit Hilfe der bildverarbeitenden ratiometrischen Fluoreszenz-Mikroskopie und der Laser-Doppler-Anemometrie. *Dissertation, Institut für angewandte Physik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Shaker-Verlag Aachen.*

Pritchard J, Jones RGW, Tomos AD (1991): Turgor, growth and rheological gradients of wheat roots following osmotic stress. *Journal of Experimental Botany* **42**, 1043-1049.

Puliga S, Vazzana C, Davies WJ (1996): Control of crops leaf growth by chemical and hydraulic influences. *Journal of Experimental Botany* **47**, 529-537.

Raven JA, Smith FA (1976): Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytologist* **76**, 415-431.

Rayle DL (1973): Auxin-induced hydrogen-ion secretion in *Avena* coleoptiles and its implications. *Planta* **114**, 63-73.

Rayle DL, Cleland RE (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well *Plant Physiology* **99**, 1271-1274.

Rengasamy P (2006): World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1017-1023.

Rink TJ, Tsien RY, Pozzan T (1982): Cytoplasmic pH and Free Mg²⁺ in Lymphocytes. *Journal of Cell Biology* **95**, 189-196.

Rober-Kleber N, Albrechtova JTP, Fleig S, Huck N, Michalke W, Wagner E, Speth V, Neuhaus G, Fischer-Iglesias C (2003): Plasma membrane H⁺-ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development. *Plant Physiology* **131**, 1302-1312.

Rodriguez HG, Roberts JKM, Jordan WR, Drew MC (1997): Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Plant Physiology* **113**, 881-893.

Ryan PR, Newman IA, Arif I (1992): Rapid calcium exchange for protons and potassium in cell walls of Chara. *Plant, Cell & Environment* **15**, 675-683.

Sakurai N (1998): Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. *Journal of Plant Research* **111**, 133-148.

Sattelmacher B (2000): Tansley review no. 22 - The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist* **149**, 167-192.

Schachtschabel P, Blume H-P, Brümmer G, Hartge KH, Schwertmann U (1998): Lehrbuch der Bodenkunde, 14. Auflage (Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart).

Schmundt D, Stitt M, Jahne B, Schurr U (1998): Quantitative analysis of the local rates of growth of dicot leaves at a high temporal and spatial resolution, using image sequence analysis. *The Plant Journal* **16**, 505-514.

Schnepf E, Reinhard C (1997): Brachyocytes in Funaria protonemata: Induction by abscisic acid and fine structure. *Journal of Plant Physiology* **151**, 166-175.

Schopfer P (1989): pH-Dependence of extension growth in avena coleoptiles and its implications for the mechanism of auxin action. *Plant Physiology* **90**, 202-207.

Schubert S (1990): Natriumexklusion von Maiswurzeln und ihre Bedeutung für die Salzresistenz der Pflanze. *Habilitationsschrift, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement, Justus-Liebig-Universität Giessen*.

Schubert S (2006): Pflanzenernährung - Grundwissen Bachelor (UTB, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart).

Schubert S, Mengel K (1989): Important factors in nutrient availability: Root morphology and physiology. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **152**, 169-174.

Schurr U, Gollan T, Schulze ED (1992): Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of Helianthus annuus. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. *Plant, Cell & Environment* **15**, 561-567.

Schurr U, Heckenberger U, Herdel K, Walter A, Feil R (2000): Leaf development in *Ricinus communis* during drought stress: dynamics of growth processes, of cellular structure and of sink-source transition. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1515-1529.

Shabala S (2000): Ionic and osmotic components of salt stress specifically modulate net ion fluxes from bean leaf mesophyll. *Plant, Cell & Environment* **23**, 825-837.

Shabala S, Newman I (1999): Light-induced changes in hydrogen, calcium, potassium, and chloride ion fluxes and concentrations from the mesophyll and epidermal tissues of bean leaves. Understanding the Ionic basis of light-induced bioelectrogenesis. *Plant Physiology* **119**, 1115-1124.

Shackel KA, Matthews MA, Morrison JC (1987): Dynamic Relation between Expansion and Cellular Turgor in Growing Grape (*Vitis vinifera* L.) Leaves. *Plant Physiology* **84**, 1166-1171.

Sharova EI (2007): Expansins: Proteins involved in cell wall softening during plant growth and morphogenesis. *Russian Journal of Plant Physiology* **54**, 713-727.

Slabu C (2005): Physiologische Reaktionen der Ackerbohne (*Vicia faba* L.) auf Natrium und Chlorid. *Dissertation, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und Umweltmanagement, Justus-Liebig-Universität Giessen*.

Slovik S, Baier M, Hartung W (1992): Compartmental distribution and redistribution of abscisic acid in intact leaves. *Planta* **187**, 14-25.

Slovik S, Hartung W (1992): Compartmental distribution and redistribution of abscisic acid in intact leaves. *Planta* **187**, 37-47.

Stahlberg R, Van Volkenburgh E (1999): The effect of light on membrane potential, apoplastic pH and cell expansion in leaves of *Pisum sativum* L. var. *Argenteum*. - Role of the plasma-membrane H⁺-ATPase and photosynthesis. *Planta* **208**, 188-195.

Strasburger (2002): Lehrbuch der Botanik für Hochschulen, 35. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*.

Sze H, Li XH, Palmgren MG (1999): Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell* **11**, 677-689.

Taiz L (1984): Plant cell expansion: Regulation of cell wall mechanical properties. *Annual Review of Plant Physiology* **35**, 585-657.

Taiz L, Zeiger E (2002): *Plant Physiology* (Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, USA, 3. Auflage).

Tester M, Davenport R (2003): Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* **91**, 503-527.

Tetlow IJ, Farrar JF (1993): Apoplastic sugar concentration and pH in barley leaves infected with brown rust. *Journal of Experimental Botany* **44**, 929-936.

Thompson DS, Wilkinson S, Bacon MA, Davies WJ (1997): Multiple signals and mechanisms that regulate leaf growth and stomatal behaviour during water deficit. *Physiologia Plantarum* **100**, 303-313.

Tsien RY (1989): Fluorescent indicators of ion concentrations. *Methods in Cell Biology* **30**, 127-156.

- Turcsanyi E, Lyons T, Plochl M, Barnes J (2000): Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line of defence against ozone? Testing the concept using broad bean (*Vicia faba* L.). *Journal of Experimental Botany* **51**, 901-910.
- Turgeon R (1989): The sink-source transition in leaves. *Annual Review Of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 119-138.
- Ullah SM, Soja G, Gerzabek MH (1993): Ion uptake, osmoregulation and plant-water relations in faba beans (*Vicia faba* L.) under salt stress. *Journal for Land Management, Food and Environment* **44**, 291-301.
- Van der Werf A (1996): Growth analysis and photoassimilate partitioning. In Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-sink Relationships (Eds E Zamski, AA Schaffer) pp. 1-20. (Marcel Dekker, New York).
- Van Volkenburgh E, Boyer SJ (1985): Inhibitory effects of water deficit on maize leaf elongation. *Plant Physiology* **77**, 190-194.
- Van Volkenburgh E, Cleland RE (1980): Proton excretion and cell expansion in bean leaves. *Planta* **148**, 273-278.
- Van Volkenburgh E, Cleland RE (1990): Light-stimulated cell expansion in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves I. Growth can occur without photosynthesis. *Planta* **182**, 72-76.
- Van Weert AW, Dunn KW, Gueze HJ, Maxfield FR, Stoorvogel W (1995): Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *Journal of Cell Biology* **130**, 821-834.
- Vergne I, Constant A, Laneelle G (1998): Phagosomal pH determination by dual fluorescence flow cytometry. *Analytical Biochemistry* **255**, 127-132.
- Verica JA, He ZH (2002): The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family. *Plant Physiology* **129**, 455-459.
- Walter A (2001): Räumliche und zeitliche Wachstumsmuster in Wurzeln und Blättern dikotyler Pflanzen. *Dissertation, Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg*.
- Walter A, Feil R, Schurr U (2002): Restriction of nyctinastic movements and application of tensile forces to leaves affects diurnal patterns of expansion growth. *Functional Plant Biology* **29**, 1247-1258.
- Walter A, Schurr U (2005): Dynamics of leaf and root growth: Endogenous control versus environmental impact. *Annals of Botany* **95**, 891-900.
- Walter A, Silk WK, Schurr U (2000): Effect of soil pH on growth and cation deposition in the root tip of *Zea mays* L. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**, 65-76.

Wang W, Vinocur B, Altman A (2004): Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**, 1-14.

Wiese A, Christ MM, Virnich O, Schurr U, Walter A (2007): Spatio-temporal leaf growth patterns of *Arabidopsis thaliana* and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle. *New Phytologist* **174**, 752-761.

Wilkinson S, Corlett JE, Oger L, Davies WJ (1998): Effects of xylem pH on transpiration from wild-type and flacca tomato leaves. A vital role for abscisic acid in preventing excessive water loss even from well-watered plants. *Plant Physiology* **117**, 703-709.

Wilkinson S, Davies WJ (1997): Xylem sap pH increase: A drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiology* **113**, 559-573.

Wilkinson S, Davies WJ (2002): ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell & Environment* **25**, 195-210.

Wilkinson S, Davies WJ (2008): Manipulation of the apoplastic pH of intact plants mimics stomatal and growth responses to water availability and microclimatic variation. *Journal of Experimental Botany* **59**, 619-631.

Wu YJ, Sharp RE, Durachko DM, Cosgrove DJ (1996): Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiology* **111**, 765-772.

Xiong L, Ishitani M (2006): Stress Signal Transduction: Components, Pathways and Network Integration. In 'Abiotic Stress Tolerance in Plants - Toward the Improvement of Global Environment and Food'. (Eds AK Rai, T Takabe). (Springer, Dordrecht, Niederlande).

Yang YW, Newton RJ, Miller FR (1990): Salinity tolerance in sorghum. I. Whole plant response to sodium chloride in *S. bicolor* and *S. halepense*. *Crop Science* **30**, 775-781.

Yeo A (1998): Review article. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany* **49**, 915-929.

Yeo A (1999): Predicting the interaction between the effects of salinity and climate change on crop plants. *Scientia Horticulturae* **78**, 159-174.

Yeo AR (1983): Salinity resistance: Physiologies and prices. *Physiologia Plantarum* **58**, 214-222.

Yu Q, Tang C, Kuo J (2000): A critical review on methods to measure apoplastic pH in plants. *Plant And Soil* **219**, 29-40.

Zahran HH (1999): Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 968-+.

Zahran HH, Marin-Manzano MC, Sanchez-Raya AJ, Bedmar EJ, Venema K, Rodriguez-Rosales MP (2007): Effect of salt stress on the expression of NHX-type ion transporters in *Medicago intertexta* and *Metilotus indicus* plants. *Physiologia Plantarum* **131**, 122-130.

Zhang JS, Xie C, Li ZY, Chen SY (1999): Expression of the plasma membrane H⁺-ATPase gene in response to salt stress in a rice salt-tolerant mutant and its original variety. *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 1006-1011.

Zhang SQ, Outlaw WH (2001): The guard-cell apoplast as a site of abscisic acid accumulation in *Vicia faba* L. *Plant, Cell & Environment* **24**, 347-355.

Zhu J-K (2002): Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 247-273.

Zhu JK (2001): Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* **6**, 66-71.

Zidan I, Azaizeh H, Neumann PM (1990): Does salinity reduce growth in maize root epidermal cells by inhibiting their capacity for cell wall acidification? *Plant Physiology* **93**, 7-11.

Zörb C, Stracke B, Tramnitz B, Denter D, Sumer A, Mühling KH, Yan F, Schubert S (2005): Does H⁺ pumping by plasmalemma ATPase limit leaf growth of maize (*Zea mays*) during the first phase of salt stress? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **168**, 550-557.

8 Anhang

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. K. H. Mühling für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung und die stete Bereitschaft zur Diskussion danken.

Bei Herrn Prof. Dr. S. Schubert möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Ausbildung seit meiner Diplomarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. K.-H.Kogel gilt mein Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Frau Prof. Dr. S. Schnell und Herrn Prof. Dr. B. Honermeier möchte ich mich für die Teilnahme an der Prüfungskommission danken.

Herrn Dr. A. Walter (ICG-3 Phytosphäre, Forschungszentrum Jülich) möchte ich für die Methodeneinweisung und Bereitstellung des DISP-Systems für Messungen in Gießen danken.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Felle (Institut für Allgemeine Botanik, Justus-Liebig-Universität Giessen) möchte ich mich ebenfalls für die Methodeneinweisung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Herrn Roland Pfanschilling und Frau Anita Langer danke ich mich für die Einweisung und Hilfe am Atom-Absorptions-Spektrometer.

Bei Frau Sigrid Beckermann und Frau Christina Plachta bedanke ich mich für die zuverlässige Unterstützung aus dem Sekretariat.

Bei Claudia möchte ich mich für die Unterstützung bei der Pflanzenanzucht und für stets gute Stimmung bei der Arbeit bedanken.

Bei Christa möchte ich mich für die Ratschläge und Hilfe im Labor bedanken.

Anne danke ich ebenfalls für die Unterstützung im Labor und den berühmt berüchtigten Rotweinkuchen.

Bei meinem Klimaschrank (BioLine VB 1514, Vötsch Industrietechnik, Balingen), dem treuen Charly, möchte ich mich für die sehr zuverlässigen Dienste für die Pflanzenanzucht danken.

Bei meiner ehemaligen Bürokollegin und „Korrekturleserin“ Sandra möchte ich mich herzlich für die kritische Durchsicht meines Manuskripts bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Karl bedanken, der den Lagerraum im IFZ-Keller stets sehr zuverlässig bewacht hat.

Christoph-Martin möchte ich für die Tipps zum Thema Statistik danken und wünsche ihm viel Erfolg am Mikroskop in Kiel.

Herrn Dr. Christian Zörb danke ich für die hilfreichen Ratschläge und die Motivation zur Bewerbung um das Stipendium.

Bei meinen Bohnen (*Vicia faba*, minor cv. Scirocco) bedanke ich mich für die „Hilfsbereitschaft“ bei den Versuchen mit einer kleinen Hommage auf der letzten Seite.

Weiterhin will ich mich bei all meinen Freunden bedanken, die mich auch in Phasen ertragen mussten, in denen mich meine Arbeit etwas zu sehr im Griff hatte.

Bei meiner „Doktorschwester“ Britta bedanke ich mich ganz besonders für die sehr gute Zusammenarbeit und die Unterstützung, die bis zum letzten Endspurt der Disputation reichte.

Meinem Vater will ich mich für die zuverlässige Unterstützung danken.

Bei meiner Freundin Sonja will ich mich einfach für alles bedanken!

Weiterhin will ich mich bei allen bedanken, die zu der unvergesslichen Disputationsfeier beigetragen haben.

Bei der Begabtenförderung der Konrad-Adenauer-Stiftung, von der ich eine Promotionsförderung erhalten habe, will ich mich für die finanzielle und ideelle Unterstützung danken.

Hommage an meine tapferen Hülsenfrüchte

Neulich beim IFZ am Bergwerkswald
hat´s unheimlich laut geknallt.

Ich dacht´ es sei der Jäger mit der Flinte,
doch mein Gehörsinn spinnte.

Es waren die Ackerbohnen,
die in der Klimahalle wohnen.

Denn wie jeder weiß, gibt jedes Böhnchen
hin und wieder gerne ein Tönchen.

Sie wachsen zwar unter der künstlichen Sonne,
aber ihr Dasein ist für sie jedoch keine Wonne.

Denn Diplombauer Thorsten will an ihnen messen,
warum sie sich bei zuviel Kochsalz stressen.

Dazu ist es leider von Nöten,
die Böhnchen stets zu töten.

Es ist ihr Schicksal – sie sterben zum guten Zweck,
und in Zukunft ist hoffentlich die Hungersnot weg.

Jede *Vicia faba* ist ein wahrer Held,
das sieht man selten auf der Welt.

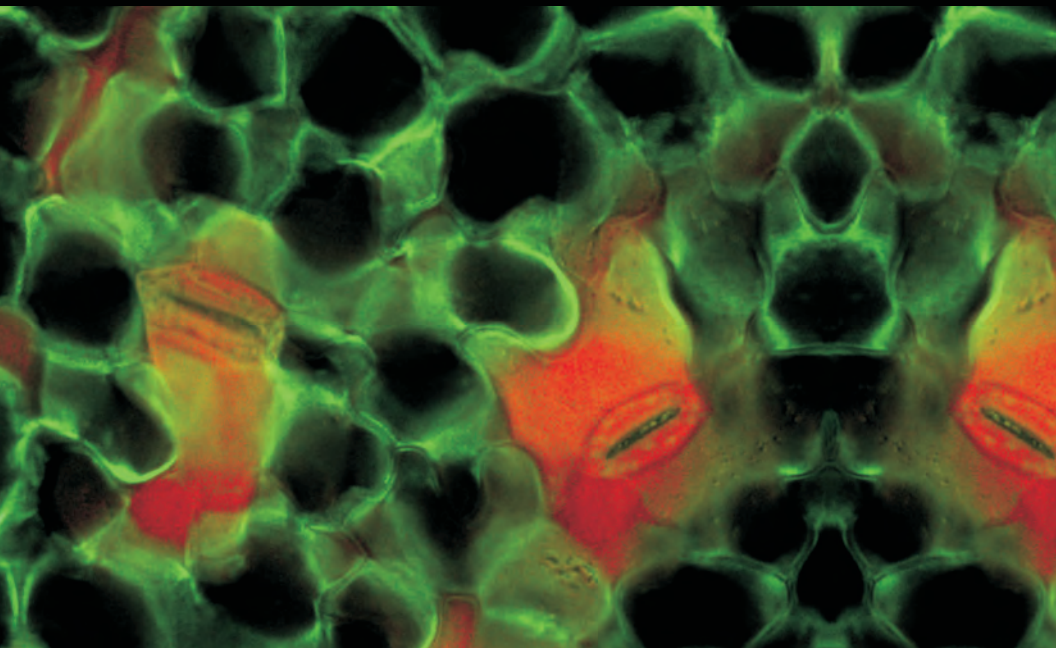
Und bei jeder Klositzung danke ich jeder Bohne
mit jedem andächtig erzeugten Tone...

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum

Unterschrift:
Thorsten Kranz



edition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5437-7



9 783835 195437 31 ©