

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Physiker und Diplom-Biologe  
Achim Walter  
aus Öhringen

Tag der mündlichen Prüfung:

# **Räumliche und zeitliche Wachstumsmuster in Wurzeln und Blättern dikotyler Pflanzen**

*Etablierung und Anwendung einer neuen Methodik  
zur automatisierten Durchführung von  
Wuchsanalysen auf Basis digitaler  
Bildsequenzverarbeitung*

Gutachter:

Priv.doz. Dr. Ulrich Schurr

Prof. Dr. Bernd Jähne

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Pflanzliches Wachstum – Definition und Bedeutung .....	1
1.2	Wachstumsmuster.....	2
1.3	Die Regulation von Blatt- und Wurzelwachstum .....	6
1.4	Begriffe und Methoden der Wachstumsmessung.....	11

## Material und Methoden

<b>2</b>	<b>Wurzelwachstum</b> .....	<b>17</b>
2.1	Pflanzenanzucht.....	17
2.2	Wachstumsbestimmung mit konventionellen Mitteln.....	19
2.3	Bestimmung von Depositionsraten .....	21
2.4	Ernteverfahren.....	21
<b>3</b>	<b>Blattwachstum</b> .....	<b>22</b>
3.1	Pflanzenanzucht.....	22
3.2	Wachstumsbestimmung mit konventionellen Mitteln .....	24
3.3	Ernteverfahren .....	28
<b>4</b>	<b>Wachstumsbestimmung mit Hilfe digitaler Bildsequenzverarbeitung</b> .....	<b>30</b>
4.1	Messprinzip .....	30
4.2	Technische Durchführung: Blattwachstum .....	32
4.3	Technische Durchführung: Wurzelwachstum .....	39
<b>5</b>	<b>Inhaltsstoffbestimmungen</b> .....	<b>42</b>
5.1	Ethanolische Extraktion.....	42
5.2	Lösliche Kohlenhydrate .....	42
5.3	Stärke .....	44
5.4	Aminosäuren .....	45
5.5	Anionen und Kationen .....	46
5.6	Transkriptmengen des Expansin-Gens NtExp1.....	48
5.7	Gaswechsellmessungen .....	50

## Ergebnisse

<b>6</b>	<b>Wurzelwachstum .....</b>	<b>51</b>
6.1	Wachstum unter Standardbedingungen .....	52
6.1.1	Tagesgang .....	53
6.1.2	Räumliche Verteilung von Wuchsraten in der Wachstumszone .....	54
6.1.3	Transversal-Oszillationen der Wurzelspitze .....	56
6.1.4	Inhaltsstoffverteilung .....	58
6.2	Einfluss externer Nährstoff-Verfügbarkeit .....	63
6.2.1	Wachstum .....	63
6.2.2	Inhaltsstoffverteilungen .....	67
6.2.3	Integrale Betrachtung von Substanzmengen und Substanzdepositionen .....	71
6.2.4	Betrachtung von Flussraten an der basalen Grenzfläche der Wachstumszone .....	74
6.3	Einfluss des externen pH-Werts .....	80
6.3.1	Wachstum .....	80
6.3.2	Inhaltsstoffverteilungen .....	81
6.4	Einfluss der Temperatur .....	83
<b>7</b>	<b>Blattwachstum .....</b>	<b>85</b>
7.1	Strukturelle Heterogenität des Blattes .....	85
7.1.1	Zusammenhang von Biomasse und Fläche .....	85
7.1.2	Anteil von Ader und Intercostalfeld .....	86
7.1.3	Anteil des Interzellularraumes .....	87
7.1.4	Trockengewichtsanteil .....	88
7.2	Wachstum unter Standardbedingungen .....	89
7.2.1	Wachstumsverteilungen in verschiedenen Blattstockwerken .....	90
7.2.2	Nyctinastien .....	90
7.2.3	Genauigkeit der DISP-Messmethode .....	93
7.2.4	Wachstumsverteilung auf dem Blatt .....	98
7.2.4.1	Zeitliche Muster .....	98
7.2.4.2	Raum-zeitliche Muster .....	99
7.2.4.3	Kleinskalige Effekte .....	102
7.2.4.4	Ader-Intercostalfeld-Verteilung .....	104

---

7.2.5 Inhaltsstoffverteilungen .....	104
7.2.5.1 Versuchsdesign ‚Inhaltsstoffanalyse Tabak‘ .....	105
7.2.5.2 Ader-Intercostalfeld .....	105
7.2.5.3 Basis-Spitze .....	110
7.2.5.4 Versuchsdesign ‚Inhaltsstoffanalyse Rizinus‘ .....	113
7.2.5.5 Tagesgang .....	115
7.2.5.6 Unterschiedliche Blattstockwerke .....	119
7.2.5.7 Relationen von Zuckern und Aminosäuren .....	123
7.2.6 Expression des Expansin-Gens NtExp1 .....	125
7.2.6.1 Tagesgang .....	126
7.2.6.2 Basis-Spitze .....	126
7.2.6.3 Ader-Intercostalfeld .....	127
7.2.6.4 Unterschiedliche Blattstockwerke .....	127
7.3 Einfluss von Zugkräften .....	128
7.3.1 Wachstum .....	129
7.3.2 Inhaltsstoffverteilungen .....	133
7.4 Einfluss einer Turgorvariation .....	134
7.5 Einfluss veränderter Temperaturverhältnisse .....	134
7.6 Einfluss von Trockenstress .....	137
7.7 Einfluss eines veränderten Nährstoffangebotes .....	138
7.8 Einfluss veränderter Tageslänge .....	142
7.8.1 Wachstum .....	142
7.8.2 Inhaltsstoffverteilungen .....	146
7.9 Einfluss veränderter Lichtintensität .....	151
7.10 Einfluss eines veränderten Inklinationwinkels eines Blattes .....	152
7.10.1 Wachstum .....	153
7.10.2 Inhaltsstoffverteilungen .....	154
7.11 Interaktion mit den übrigen Blättern der Pflanze .....	155
7.12 Wachstum isolierter Blattscheiben .....	157

## Diskussion

<b>8 Erfassen von Wachstumsmustern mit Hilfe verschiedener Techniken.....</b>	<b>163</b>
8.1 Vergleich der DISP-Methodik mit anderen Methoden .....	163
8.1.1 Räumliche und zeitliche Auflösung .....	163
8.1.2 Biomechanische Beeinflussung des zu untersuchenden Organs.....	165
8.1.3 Einfluss der Lichtquelle auf die Bestimmung von Wachstum.....	166
8.1.4 Zusammenfassende Wertung .....	167
8.2 Übrige Methoden der Wuchsanalyse .....	168
8.2.1 Nichtdestruktive Methoden.....	168
8.2.2 Destruktive Methoden .....	169
<b>9 Wachstumsmuster in Blatt und Wurzel .....</b>	<b>171</b>
9.1 Tagesgänge .....	171
9.1.1 Wurzel.....	171
9.1.2 Blatt .....	171
9.1.3 Kombinierte Untersuchungen von Tagesgängen an Blatt und Wurzel .....	173
9.1.4 Endogene Rhythmik des Blattwachstums.....	175
9.2 Räumliche Wachstumsmuster .....	175
9.2.1 Wurzel.....	175
9.2.2 Blatt .....	179
9.3 Nutationen und Krümmungsbewegungen .....	180
9.3.1 Transversal-Oszillationen der wachsenden Wurzelspitze .....	180
9.3.2 Nyctinastien der Blätter .....	183
9.3.3 Weitere rhythmische Krümmungsbewegungen der Blätter.....	185
9.4 Reaktionen auf dynamische Änderungen externer Bedingungen.....	186
9.4.1 Wurzel.....	186
9.4.2 Blatt .....	187

---

<b>10 Inhaltsstoff-Verteilungen und Wachstumsmuster .....</b>	<b>191</b>
10.1 Tagesgänge in Wurzeln und Blättern .....	191
10.1.1 Wurzel .....	191
10.1.2 Stoffflüsse zwischen Wurzel und Blatt .....	192
10.1.3 Blatt .....	193
10.2 Räumliche Verteilung von Inhaltsstoffen in Wurzel und Blatt .....	196
10.2.1 Wurzel .....	163
10.2.2 Blatt .....	196
10.3 Einfluss externer Nährstoff-Verfügbarkeit auf Wurzeln .....	197
10.4 Einfluss des externen pH auf Wurzeln .....	200
10.5 Änderung der Lichtverhältnisse an Tabakblättern .....	202
10.6 Einfluss von Zug an Rizinusblättern .....	203
<b>11 Regulationsmechanismen von Wachstum .....</b>	<b>204</b>
11.1 Biomechanik .....	204
11.2 Biophysik .....	205
11.3 Biochemie .....	207
11.4 Molekularbiologie .....	207
<b>12 Zusammenfassung .....</b>	<b>211</b>
<b>13 Ausblick .....</b>	<b>213</b>
<b>14 Literatur .....</b>	<b>215</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AS <sub>Gesamt</sub>	Summe aller analysierten Aminosäuren
B	Breite eines Tabakblattes
C(x)	Konzentration an der Stelle x
CCD	Charge Coupled Device (Chip zur Aufnahme von Bildern in elektronischen Kameras)
D(x)	Depositionsrate an der Stelle x
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat (ATP: Adenosin-5'-triphosphat)
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
DISP	Digital Image Sequence Processing (digitale Bildsequenzverarbeitung)
DL	Dauerlicht
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DoTAOH	Dodecyltrimethylammoniumhydroxid
E-Cup	Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
F1	Erstes Folgeblatt von Rizinus (F2: zweites, F3: drittes,...)
FG	Frischgewicht
GOGAT	Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase
GS	Glutaminsynthetase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IC	Intercostalfeld
IR	Infrarot
IZ	Interzellulare
L	Länge eines Tabakblattes
L <sub>1</sub>	Länge des mittleren Blattlappens eines Rizinusblattes
L <sub>3</sub>	Länge des dazu senkrechten Blattlappens
LVDT	Linear Variable Differential Transducer (elektr. Messgerät für Längenveränderungen)

---

MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MR	Mittelrippe
MRA	Mittelrippenanteil
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid (Boten-Ribonukleinsäure, folgt aus DNA-Transkription)
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NtExp1	Codierendes Gen für die untersuchte Isoform von Expansin aus <i>Nicotiana tabacum</i>
OD	Optische Dichte
OPA	o-Phtalsäuredialdehyd
P	Primärblatt von Rizinus
PCR	Polymerase Chain Reaction (Verfahren zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten)
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß; gibt die Güte von Fitfunktionen an (Wert zw. 0 und 1, 1: optimal)
REGR	Relative Elemental Growth Rate (Wuchsrate kleiner Elemente von Geweben/Organen)
RGR	Relative Growth Rate (In dieser Arbeit stets: Wuchsrate kompletter Organe)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SWV	Spross-Wurzel-Verhältnis (Quotient aus FG oder TG der entsprechenden Organe)
TG	Trockengewicht
TGA	Trockengewichtsanteil
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-(9,10)p-t-octylphenol
UV	Ultraviolett
v(x)	Geschwindigkeit an der Stelle x
V <sub>Spitze</sub>	Absolute Wuchsrate der Wurzel (Elongations-Geschwindigkeit der Wurzelspitze)
v <sub>x</sub> (x)	X-Komponente der Geschwindigkeit an der Stelle x
v <sub>y</sub> (x)	Y-Komponente der Geschwindigkeit an der Stelle x
XXFGol	Ein Xyloglucan-nonasaccharid (3 Xylose, 3 Glucose je 1 Fucose, Galactose, Glucitol)



# 1 Einleitung

## 1.1 Pflanzliches Wachstum – Definition und Bedeutung

Wachstum ist wie Ernährung und Evolution ein grundlegendes Merkmal lebender Systeme (Lovelock 1982). Der Begriff ‘Wachstum’ kann verschieden definiert werden.

**Im Kontext der vorliegenden Arbeit wird unter pflanzlichem ‘Wachstum’ eine irreversible Volumen- und Substanzzunahme verstanden, die an die lebende Zelle gebunden ist**

(nach Strasburger 1998, Nultsch 1996).

‘Entwicklung’ und ‘Differenzierung’ sind zwei verwandte, in ihrer Bedeutung von pflanzlichem ‘Wachstum’ jedoch verschiedene Begriffe, die fälschlicherweise oft synonym verwendet werden. Als ‘Wachstum und Entwicklung’ wird in der Regel die Gesamtheit der Prozesse bezeichnet, die von der Keimzelle zur ausgewachsenen Pflanze führen (Nultsch 1996). Hierzu gehören die Entwicklungsprozesse der Zellteilung, Zellvergrößerung und Zelldifferenzierung. Unter ‘Differenzierung’ wird eine qualitative Veränderung der Form oder Funktion verstanden, die vom Wachstum stets abgegrenzt wird (Strasburger 1998).

Das Wachstum pflanzlicher Organismen ist ein Prozess von vielschichtiger Bedeutung.

Die **zentrale Stellung von Wachstum** innerhalb der grundlegenden pflanzlichen Lebensprozesse kann durch einen **Vergleich von Pflanze und Tier** veranschaulicht werden.

### *Wachstum und Fortbewegung*

Die ‘typische Pflanze’ (Strasburger 1998) ist festgewachsen; das ‘typische Tier’ ist dagegen zur Ortsveränderung befähigt. Pflanzen sind jedoch genauso wie Tiere darauf angewiesen, sich stets neue Ortsbereiche erschliessen zu können, um beispielsweise auf Umweltveränderungen zu reagieren, oder um sich in Konkurrenzsituationen hinsichtlich Nährstoffen oder Licht durchsetzen zu können. Wachstum ‘ersetzt’ hier in gewisser Weise die Fortbewegung.

### *Baupläne der Körper*

Pflanzen besitzen einen ‘offenen Bauplan’ (Strasburger 1998): Die für zentrale Prozesse wie Photosynthese, Gasaustausch oder Nährstoffresorption benötigten großen Oberflächen sind in Form von Blatt- und Wurzeloberflächen der Umwelt exponiert. Tiere sind dagegen ‘geschlossene’ Organismen: Die für Atmung, Nahrungsresorption und Exkretion erforderlichen großen Oberflächen werden durch Einfaltungen im Körperinneren ausgebildet.

Dieser Unterschied bringt es mit sich, dass bei Pflanzen kein ausgewachsener Zustand eintritt, während Tiere typischerweise ausgewachsene, adulte Zustände erreichen. Pflanzen wachsen zeitlebens und erhalten in gewissen Körperteilen stets eine embryogene Aktivität aufrecht.

### *Wachstum, Struktur-Funktions-Beziehungen und intraspezifische Polymorphie*

Das Wachstum einer Pflanze ist ein sehr differenziert regulierter, dynamischer Prozess, der die Individuen einer Art zur Ausbildung unterschiedlicher Physiognomien befähigt. Aufgrund der sessilen Lebensweise und des offenen Bauplans müssen Pflanzen in der Lage sein, auf Umweltveränderungen (veränderte Ansprüche an die pflanzliche Funktion) mit einer Anpassung ihres Körperbaus (ihrer Struktur) zu reagieren. Eine adaptive Variation des Habitus kann dabei ausschließlich mit Hilfe von Verlagerungen und Intensitätsänderungen der Wachstumsaktivität innerhalb der Pflanze erreicht werden (Schulze 1982). Beispielsweise können

- dem Wind exponierte Bäume die Richtung ihres Ast- und Wurzelwachstums anpassen
- unter Lichtmangel stehende Keimlinge die Verlängerung ihrer Sprossachse fördern
- unter Nährstoffmangel stehende Pflanzen ein höheres Wurzel-Spross-Verhältnis einstellen

Bei Tieren existiert eine analoge Variationsmöglichkeit nur auf einer wesentlich größeren Zeitskala während der Evolution neuer Arten. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Zunahme der Körpergröße von Pinguin-Arten vom Äquator zum Pol, die ein auf die jeweilige Jahresmitteltemperatur optimiertes Verhältnis von Körperoberfläche zu Volumen mit sich bringt.

## **1.2 Wachstumsmuster**

Im Kontext der vorliegenden Arbeit wird unter einem **Wachstumsmuster** das **wiederholte Auftreten einer bestimmten raum-zeitlichen Verteilung der Wachstumsaktivität** verstanden.

Während der Entwicklung eines Organs treten charakteristische raum-zeitliche Variationen der Wachstumsaktivität auf. Deren Zustandekommen ist dadurch bedingt (Magnani und Grace 2000), dass Pflanzen – wie alle lebenden Organismen – selbst-organisierende Systeme sind (Prigogine und Stengers 1985). Die Koordinationen des Verhaltens einzelner Systemkomponenten führt dabei oft zu Phasenverschiebungen von zeitlich variablen Abläufen, was räumliche Muster von zum Teil beeindruckender Symmetrie hervorbringt, wie sie z.B. als morphologisches Muster bei der Anlage von Blättern am Sprossapikalmeristem oder in Blüten zu finden sind.

Aufgrund des offenen Bauplans sind charakteristische Wachstumsmuster oft durch eine Vermessung der Oberflächenzunahme eines Organs detektierbar. Eine hochaufgelöste Analyse der raum-zeitlichen Wachstumsmuster auf der Pflanzenoberfläche ist daher ein mächtiges diagnostisches Werkzeug, das eine Fülle von Informationen über das untersuchte System liefern kann.

Folgende Aspekte sind dabei von besonderer Bedeutung:

- *Räumliche Gradienten der Wachstumsaktivität.* Sie können mit der Anordnung von Geweben unterschiedlichen Entwicklungszustandes in Wachstumszonen oder über verschiedene Blattstockwerke hinweg zusammenhängen (Walter und Schurr 1999).
- *Tageszeitliche Variationen der Wachstumsaktivität.* Sie können beispielsweise durch diurnal regulierte physiologische Prozesse bedingt sein oder als kurzfristige Wachstumsreaktionen auf Umweltveränderungen angesehen werden (Shackel et al. 1987).
- *Die Kombination raum-zeitlicher Wuchsanalysen mit Inhaltsstoff-Bestimmungen.* Dadurch wird es ermöglicht, Stoffflüsse oder Depositionsraten von Substanzen zu messen (z.B. Silk 1984, Walter et al. 2000). Die Berechnung des Netto-Stoffeintransports von Substanzen, deren zeitliches und räumliches Konzentrationsmuster in einem zuwachsenden Organ bekannt ist, gelingt nur, wenn auch die zeitliche und räumliche Wachstumsverteilung in diesem Organ bekannt ist. Ein Biomassenzuwachs ohne Eintransport der zu untersuchenden Substanz würde zu einer Verdünnung führen.

### Organisation von Wachstumszonen

In der vorliegenden Arbeit werden Wachstumszonen von linearer oder flächiger Organisation betrachtet. Die **Wurzelwachstumszone** ist (ebenso wie die Wachstumszone der Blätter mono-kotyler Pflanzen) **linear organisiert**: Entlang der Wachstumszone sind in räumlicher Abfolge Zellen zu finden, die sich in unterschiedlichen zeitlichen Zuständen ihrer Entwicklung befinden. Eine im Apikalmeristem gebildete Zelle teilt sich im Verlauf ihrer Entwicklung noch mehrmals, durchläuft dann entlang einer nahezu linearen räumlichen Trajektorie die Streckungszone des Organs und stellt ihren Wachstumsprozess am anderen Ende der Wachstumszone ein. Die räumliche Verteilung der Wachstumsaktivität weist im vorderen Drittel der Zellstreckungszone ein Maximum auf; die Intensität fällt sowohl zum Meristem als auch zur Basis der Wachstumszone hin ab.

In der Wachstumszone von **Maiswurzeln** werden typischerweise pro Tag mehrere hunderttausend Zellen neu gebildet (Erickson 1976). Die hierbei stattfindenden Mitosen dauern zwischen 12 und 200 Stunden (Strasburger 1998). Die Phase der Zellstreckung ist im Mittel nach 12 h abgeschlossen (Silk 1984). Die räumliche Ausdehnung der Wachstumszone bleibt über viele Tage hinweg konstant.

**Flächig organisierte Wachstumszonen** liegen bei **Blättern dikotyler Pflanzen** vor. Die Zellen der Blattspitze (bzw. bei peltaten Blättern - wie etwa denjenigen von Rizinus - des Blattrandes) werden früher angelegt als diejenigen der Blattbasis (Blattzentrum). Die Zone des Übergangs von der Zellteilung zur Zellstreckung schreitet wie die gesamte Blatentwicklung als eine Welle von der Blattspitze zur Blattbasis fort (Van Vokenburgh 1987). Die Zonen von Zellteilung und Zellstreckung sind räumlich nicht voneinander getrennt. Auch in Zonen, in denen sich fast nur noch Zellstreckung abspielt, werden Zellteilungsstadien gefunden (Heckenberger et al. 1998).

In Spinatblättern werden beispielsweise noch bei etwa 50 % der Blatt-Endgröße Zellteilungsstadien vorgefunden (Saurer und Possingham 1970); in Rizinusblättern können noch bei einer Länge des mittleren Blattlappens von 8 cm Zellteilungen an der Blattbasis beobachtet werden (Heckenberger et al. 1998). Die Phase der Zellstreckung beginnt in vielen Zellen zu dem Zeitpunkt, an dem das junge Blatt die Knospe verlässt (Arney 1952). Ab diesem Zeitpunkt tritt ein Basis-Spitze-Gradient der Wachsraten auf, der aus der zeitlichen Entwicklungsdifferenz der Zellen resultiert. Die Phase der Zellstreckung dauert typischerweise mehrere Tage an; die Wachstumszone umfasst das gesamte Blatt und vergrößert sich daher stetig.

### **Wachstumsmuster resultieren in Bewegungen**

Das Wachstum eines Organs lässt sich nie nur mit Hilfe der oben angeführten Beschreibungen von linearen bzw. flächigen Wachstumszonen erklären. Es treten stets auch sekundäre räumliche Regulationseffekte auf, die zu reversiblen Abweichungen der Form des Organs von einem länglichen Gebilde oder einer Fläche führen können. Solche dynamischen, aus der Existenz **‘sekundärer’ Wachstumsmuster** resultierenden Formveränderungen gehören den pflanzlichen Bewegungserscheinungen an. Zwar lassen sich nicht alle pflanzlichen Bewegungserscheinungen auf Wachstumsprozesse zurückführen; umgekehrt führt Wachstum jedoch stets auch zu Bewegung. Wenn die Wachstumsaktivität in einer raum-zeitlich koordinierten Weise auf verschiedene Seiten eines Organes verteilt ist, kommt es zu prominenten, oft sogar rhythmischen Bewegungen. Beispielsweise entstehen die Rankenbewegungen windender Pflanzen durch Wachstumsmaxima, die die Sprossachse helikal umlaufen (Silk 1989). Derartige Bewegungen treten auch in nicht windenden Organen, wie den Hypokotylen von Keimlingen auf (z.B. Kristie und Joliffe 1986) und werden dort **‘Circumnutationen’** genannt.

Eine andere Form der Bewegungen sind **‘Nastien’**. Darunter versteht man durch Reizung (interner oder externer Art) ausgelöste Bewegungen, deren Richtung unabhängig von der Richtung des auslösenden Reizes sind. Hierzu gehören zum Beispiel die **‘Nyctinastien’** genannten Blatthebungs- und -senkungsbewegungen, die durch den Beginn der Nacht ausgelöst werden und vor allem für Bohnen sehr gut untersucht sind (Bünning 1948).

Schliesslich kann die koordinierte, sekundäre Verteilung von Wachstumsmustern auch noch zu **‘Tropismen’** führen. Von tropistischen Bewegungen spricht man, wenn die durch einen Reiz ausgelöste Bewegung in ihrer Richtung in Beziehung zur Richtung des einwirkenden Reizes steht. Dies ist etwa bei gravitropischen Reaktionen der Fall, wo die der Erde abgewandte Laterale einer Wurzel stärker wächst als die erdnahe, sodass eine Orientierungsänderung des Organes in Richtung Erdmittelpunkt zustande kommt (Buff et al. 1987). Eine weitere tropistische Reaktion stellt die Ausrichtung von Blattoberflächen zum Licht dar (Phototropismus). Auch tropistische Bewegungen können in Form von Schwingungen ablaufen, in deren Verlauf die **‘Sollrichtung’**, auf die sich das pflanzliche Organ einzustellen versucht, oszillatorisch angenähert wird.

## Interaktion von Wachstumsmustern und ‘physiologischen’ Mustern

Auch auf verschiedenen physiologischen Regulationsebenen werden Muster ausgebildet. Diese gehen oft mit der Ausbildung charakteristischer Wachstumsmuster Hand in Hand. **Veränderte Ansprüche an die Funktion des Organismus** führen oft zu einer **Veränderung seiner Struktur** (Schulze 1982), die aufgrund des offenen pflanzlichen Bauplans anhand von Wachstumsmustern der pflanzlichen Oberfläche analysiert werden kann. Dies wurde bereits im Abschnitt über die besondere Bedeutung von Wachstum für pflanzliche Organismen (Kap. 1.1) ausgeführt. Die Analyse von Wachstumsmustern kann daher oft auch Aussagen über physiologische Funktionen bzw. physiologische Musterbildungen liefern.

So ist etwa bekannt, dass hinsichtlich der **Nährstoff-Allokation** eine starke Homöostase existiert, die in relativ konstanten Verhältnissen der wichtigsten Elemente (C, N, P) innerhalb der Pflanze resultiert (Redfield 1958, Schulze et al. 1994, McDonald und Davies 1996). Wachstum einzelner Organe muss hierfür stets im Zusammenhang der Ausbildung von Sink-Source-Beziehungen (Farrar 1993) und Stofftransportprozessen (Minchin et al. 1993), etwa im Phloem der Pflanze verstanden werden. Es ist dabei allerdings eine noch ungeklärte Frage, ob die Acquisition von C und N wirklich unter der Prämisse eines konstanten C:N-Verhältnisses erfolgt (Mäkelä und Sievänen 1987) oder ob sie summarisch reguliert wird (Dewar 1993, Magnani et al. 1999).

Auch das **Wassertransportsystem** innerhalb einer Pflanze entwickelt sich nach einem klaren Muster, was auf die innige Verbindung von Wachstumsmustern und funktionellen Beziehungen hinweist (Boyer 1985): So besteht zum Beispiel, wie schon Leonardo da Vinci bemerkt hatte, zwischen den Durchmessern von Zweigen eines Baumes und dem sie tragenden Stammabschnitt eine enge Korrelation (Richter 1989). Dies wird als Ursache der fraktalen Geometrie von Baumkronen diskutiert (Long 1994), könnte aber umgekehrt auch zeigen, dass die fraktale Geometrie des Systems eine Ausprägung charakteristischer struktureller Muster bedingt. Ebenso besteht zwischen Blattfläche und Saffholz-Querschnitt ein konstantes Verhältnis, wobei eine Flächeneinheit von Blättern stets durch eine proportionale Querschnittsfläche von Leitungsgewebe versorgt wird (Shinozaki et al. 1964, Margolis et al. 1995).

Die **Analyse von Wachstumsmustern** ist dennoch nur von **begrenzter Aussagekraft für die Untersuchung physiologischer Zusammenhänge**, da pflanzliche Regulationsprozesse in der Regel sehr komplex und vielseitig miteinander vernetzt sind. Reale physiologische Vorgänge innerhalb der Pflanze können nur selten durch die Untersuchung eines einzigen Parameters analysiert werden.

Als Grund für die hohe Komplexität und Vernetzung pflanzlicher Regulationsmechanismen ist ihr offener Bauplan anzusehen. Die offene Organisation des Pflanzenkörpers schränkt die Entwicklung zentraler Organe ein: Bei Pflanzen gibt es keine dem Herz, den Nieren oder dem Nervensystem vergleichbaren Organe. Dies bringt es mit sich, dass sehr viele Funktionen dezentral und höchst flexibel organisiert sind und sich nicht mit Hilfe vergleichsweise einfach zu erforschender Kausalketten erklären lassen. Am Vergleich der Wirkung von Hormonen in Tieren und Pflanzen kann die vergleichsweise hohe Komplexität pflanzlicher Regulationsmechanismen im nächsten Abschnitt veranschaulicht werden.

### 1.3 Die Regulation von Blatt- und Wurzelwachstum

Wachstumsregulation spielt sich auf verschiedenen Ebenen der pflanzlichen Organisation ab. Die Regulationsmechanismen der verschiedenen Ebenen interagieren dabei miteinander. Dynamische Änderungen der Wachstumsmuster können sich jederzeit als Reaktion auf veränderte interne oder externe Rahmenbedingungen ergeben.

Einige Komponenten des **sensorischen Apparats**, mit dessen Hilfe die Pflanze dabei auf Umwelteinflüsse reagiert, sind aus der Literatur bekannt. So wird beispielsweise die Lichtqualität via Phytochrom (Smith 1995) und Kryptochrom (Cashmore 1998) perzipiert und die Richtung der Erd-Schwerkraft über Stärke und Statolithen (z.B. Sinclair und Trewavas 1997, Slack 1997), um nur einige der wichtigsten Sensoren zu nennen.

#### **Ebene der Gesamtpflanze: Biochemische Regulation**

Auf Ebene der Gesamtpflanze spielt die Regulation durch biochemische Signale eine zentrale Rolle. Von großer Bedeutung sind dabei **Phytohormone** (Nultsch 1996, Strasburger 1998). Auxinen, Gibberellinen und Cytokininen wird eine fördernde, Abscisinsäuren und Ethylen eine meist hemmende Wirkung auf das Wachstum zugesprochen. Auch Jasmonsäuren und Brassinolide greifen nachgewiesenermaßen in die hormonelle Kontrolle des Wachstums ein.

In Pflanzen wurden in den vergangenen Jahrzehnten viele Bestandteile hormoneller Signalketten gefunden. Trotz intensiver Bemühungen konnte jedoch bis heute das Funktionieren keiner einzigen hormonellen Signalkette nachgewiesen werden, die analog zu den Verhältnissen in Tieren arbeiten würde (Strasburger 1998): Phytohormone lösen zwar bereits in geringen Mengen pflanzliche Reaktionen aus (detaillierte Beschreibungen z.B. in Kende und Zeevaart 1997); **im Unterschied zum Tier** sind jedoch

- a) die Hormonbildungsorte in der Regel auf weite Bereiche des Organismus verteilt
- b) die Hormone oft auch an ihrem Bildungsort selbst wirksam
- c) Wirkungen eines spezifischen Hormons auf verschiedene Organe nachgewiesen
- d) die Auswirkungen eines spezifischen Hormons recht vielgestaltig
- e) die Effekte der verschiedenen Hormone aufs Engste miteinander verflochten.

Eine Untersuchung der hormonellen Regulation von Wachstumsmustern wurde daher in der vorliegenden Arbeit nicht verfolgt.

Auf **biochemischer Ebene** ist in Pflanzen die Regulation von Prozessen durch metabolische Substanzen, wie im Beispiel der Photosynthese durch Fructose-2,6-Bisphosphat (Huber 1986, Stitt 1987), von großer Bedeutung. Für den Prozess der Wachstumsregulation spielt **Nitrat** eine wichtige Rolle (Scheible et al. 1997a); dieser Substanz wird verschiedentlich sogar hormonelle Funktion beigemessen (Trewavas 1983).

## Zell- und Gewebeebene

Auf biochemischer Ebene existiert in Pflanzen bei der intrazellulären Signalübertragung eine hohe Modulationsfähigkeit bezüglich der 'Second Messenger'. **Calcium** ist hier für Wachstums- und Formgebungsprozesse von herausragender Bedeutung (Trewavas und Malho 1997). Über die Möglichkeit einer biochemischen Regulation hinaus steht der Pflanze jedoch durch das Zusammenspiel von Turgor und Zellwand-Dehnbarkeit eine mächtige biophysikalische Kontrollmöglichkeit der Wachstumsprozesse zur Verfügung, deren Rolle jedoch über die Zellebene hinaus bislang schlecht untersucht ist.

## Die Lockhart-Gleichung: ein biophysikalisches Modell der Wachstumsregulation

Die Regulation des Wachstums über Eigenschaften der pflanzlichen Zellwand wird auf biophysikalischer Ebene mit Hilfe des Lockhartschen Modells pflanzlichen Wachstums beschrieben (Lockhart 1965, Cosgrove 1986). Wachstum kann durch das Zusammenspiel von Turgor (dem internen Druck der pflanzlichen Zelle) und der Dehnbarkeit oder Expansibilität ihrer Zellwände verstanden werden.

Der Volumenzuwachs einer Einzelzelle wird bei uneingeschränkter Wasserverfügbarkeit recht gut durch die modifizierte Lockhart-Gleichung beschrieben:

$$\frac{1}{V} * \frac{dV}{dt} = \Phi * (P - Y)$$

Dabei steht V für das Zellvolumen, t für die Zeit,  $\Phi$  für die Zellwand-Expansibilität, P für den Turgor und Y für den yield threshold; den Grenzwert des Turgors, ab dem eine Vergrößerung der Zelle eintritt. Der Term  $1/V \, dV/dt$  steht für die relative Wachstumsrate der Zelle (Kap. 1.4).

## *Turgor*

Der Turgor wird von vielen Autoren als regulatorisch wirksame Größe der biophysikalischen Kontrolle von Wachstumserscheinungen angesehen, insbesondere, wenn eine tageszeitliche Variation auftritt (z.B. Davies und Van Volkenburgh 1983). Dabei wird in der Argumentation oft auf Befunde an Einzelzellen, vor allem der Alge Chara, zurückgegriffen (Proseus et al. 1999).

Zwar können viele interessante Details von Wachstumskinetiken aus dem Expansionsverhalten von Einzelzellen abgeleitet werden; die Regulation des Wachstums eines komplexen Gewebes wird dadurch aber nur unzureichend beschrieben. Innerhalb der Wachstumszonen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Organe scheint der Turgor nicht regulatorisch auf die Ausprägung von Wachstumsmustern einzuwirken (ausführliche Diskussion in Kap. 11.2).

### ***Kontrolle der Zellwand-Dehnbarkeit***

Die Änderung der Zellwand-Dehnbarkeit wird in der aktuellen Literatur von der Mehrzahl der Autoren als kontrollierender Mechanismus der Wachstumsaktivität pflanzlicher Gewebe favorisiert (Cosgrove 1986, Tomos und Pritchard 1994, Schurr 1997).

Die pflanzliche Zellwand besteht aus ineinander vernetzten Gerüsten von Cellulose, Hemicellulose und Pektinen. Cellulose ist das häufigste organische Makromolekül der Biosphäre und hat eine vergleichbare Reißfestigkeit wie Stahl (Strasburger 1998). Die Dehnbarkeit der Zellwand kommt durch eine unvollständige Quervernetzung der verschiedenen Gerüstfibrillen zustande; nicht durch eine Spaltung der Makromoleküle. Eine Reihe von Regulationsmechanismen beeinflusst die Zellwand-Dehnbarkeit.

### *Ansäuerung der Zellwand (Acid Growth-Hypothese)*

Eine **Ansäuerung der Zellwand**, sei es durch externe oder interne Einflüsse, führt in verschiedensten Experimenten zu einer **verstärkten Expansionsaktivität** des untersuchten Gewebes (Edwards und Scott 1974, Virk und Cleland 1988). Die entsprechenden Versuche wurden jedoch oft an isoliertem Gewebe durchgeführt und sind oft nur von geringer Relevanz für natürliche Systeme (siehe hierzu Peters und Felle 1999, Walter et al. 2000), in denen der apoplastidäre pH in komplexer Weise aktiv gepuffert und reguliert wird (Gerendas und Schurr 1999).

### *Calcium-Gehalt der Zellwand*

Ein wesentlicher Bestandteil der pflanzlichen Zellwand ist das Pektin-Netzwerk. Es enthält negativ geladene Uronsäuregruppen, die von zweiwertigen Kationen, v.a. **Calcium**, komplexiert werden und so zu einer **Verfestigung des Pektin-Netzwerkes** und damit der gesamten Zellwand beitragen (Trewavas und Malhó 1997). Die Festigkeit der Zellwand hängt daher auch von deren Calcium-Gehalt ab. Alle Prozesse, die die apoplastidäre Calcium-Konzentration beeinflussen, wirken sich so auf die Dehnbarkeit der Zellwand aus.

### *Aktive enzymatische Kontrolle der Festigkeit von Zellwand-Bestandteilen*

Die Enzymklassen der **Expansine**, der **Endoglucanasen** und der **Xyloglucan-Transglycosylasen** wirken regulatorisch auf die Stabilität der pflanzlichen Zellwand ein (Cosgrove 1999). Die Expression der Gene aller genannten Enzyme wirkt **Zellwand-erweichend**. Durch die genannten Enzyme werden Quervernetzungen der Gerüstfibrillen aufgebrochen oder ihre Bildung unterbunden. Eine Verringerung ihrer Aktivitäten bewirkt im Gegenzug eine Verfestigung der Zellwand.

Der Grad der Quervernetzung kann auch aktiv gesteigert werden; wie am Beispiel des Einbaues eines Xyloglucan-Derivats (XXFGol) jüngst gezeigt werden konnte (Warneck et al. 1998).

Auch die Biosynthese und exocytotische Sekretion der **Zellwandbestandteile** kann aktiv reguliert werden. Hier ist vor allem der Zellulose-Stoffwechsel aufgrund der Abundanz dieses Makromoleküls in der Zellwand von Bedeutung (Delmer 1999).

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit findet eine eingehende Untersuchung der Expression eines **Expansin**-Gens (NtExp1) im Tabakblatt statt, da Expansine eine **Schlüsselrolle im regulatorischen Gefüge der Zellwand-Erweichung** spielen (ihre Wirkung wird von den übrigen Enzymen sekundär moduliert):

Expansine wurden 1992 erstmals isoliert (McQueen-Mason et al. 1992) und stellen nach derzeit vorherrschender Meinung die Mediatoren des 'Acid Growth'-Mechanismus dar. Die Expansin-induzierte Zellwand-Erweichung hat ein Optimum bei  $\text{pH} < 4$ ; im Bereich zwischen  $\text{pH} 4$  und  $\text{pH} 7$  wird eine monotone Abnahme der Expansin-Aktivität beobachtet. Die meisten Studien hierzu wurden an Zellwand-Material aus Gurken-Hypokotylen durchgeführt (Cosgrove 1998).

Expansine werden aufgrund ihrer Aminosäuresequenzen in zwei Familien eingeteilt (Alpha- und Beta-Expansine). Die besser untersuchte und für die Regulation von Wachstum wichtigere Gruppe der Alpha-Expansine besteht aus Proteinen einer Größe von ungefähr 25 kD. Nach ihrer primären Transkription tragen sie ein sekretorisches Signal von typischerweise 23 Aminosäuren. Die Proteine binden sich recht eng an Cellulosefibrillen der Zellwand und sorgen dort wahrscheinlich für eine Schwächung von Glucan-Glucan-Wechselwirkungen (McQueen-Mason und Cosgrove 1995). Bei externer Applikation zu lebenden Zellen wird eine zumindest kurzfristige Stimulation der Wachstumsaktivität berichtet (Link und Cosgrove 1998, Moore et al. 1995). In Arabidopsis sind derzeit 22 Gene bekannt, die Expansine codieren; bei anderen Pflanzen wird diese Anzahl vermutlich noch überschritten, ist aber noch nicht genau untersucht. Für Tabak sind derzeit sechs Expansin-codierende Gene bekannt (Cosgrove 2000).

Expansine werden auch mit der Musterbildung innerhalb des Spross-Apikalmeristems in Verbindung gebracht (Fleming et al. 1997, Reinhardt et al. 1998). Expansin-Gene werden lokal in Zellen exprimiert, die unterhalb von später auswachsenden Blatt-Primordien liegen und könnten so zu mechanischen Spannungen der meristematischen Tunica führen, die im Green'schen Modell als Auslöser für die Initiation von Blättern angesehen werden (Green 1997).

### **Weitere biomechanische Einflussgrößen, die nicht durch die Lockhart-Gleichung beschrieben werden, aber auf Gewebe-Ebene wirksam sind**

Neben den soeben beschriebenen Parametern und Mechanismen, die das Wachstum auf der Ebene von Zellen und Geweben regulieren können, gibt es weitere biomechanische Mechanismen, die für die Ausprägung von Wachstumsmustern von Bedeutung sind.

Seit langem ist bekannt, dass ein wachsendes Gewebe, das einem Zug oder Druck ausgesetzt wird, durch eine veränderte Ausbildung von Zellwandstrukturen und Wachstumsmustern auf diesen Einfluss reagiert (Kny 1902). Zuwachsende Organe unterliegen einer Vielzahl von auf sie einwirkenden Kräften, die daher ebenfalls als Regulatoren von sich ausbildenden Wachstumsmustern angesehen werden können.

Intern können sich **biomechanische Spannungen** innerhalb von Blättern durch den Aufbau aus **Geweben verschiedener Materialeigenschaften** ergeben. Die Blattkrümmungen und Blattrollungen von Maisblättern unter Trockenstress sind Beispiele für derartige Systeme (Moullia 2000,

Hay et al. 2000). Sie kommen durch einen U-förmigen Querschnitt des Blattfestigungsgewebes zustande und sind damit hydraulisch-passive Antworten des Gewebes auf Wasserverlust.

Das **Zusammenspiel von Epidermis und Zentralgewebe** im Keimlingshypokotyl ist ein anderes Beispiel, das in der Literatur in diesem Zusammenhang oft angeführt wird. Hier wird klassischerweise davon ausgegangen, dass die Epidermis wachstumslimitierend wirkt und das unter einer höheren Gewebespannung stehende innere Gewebe die treibende Kraft im Wachstumsprozess spielt (Kutschera 1992). Diese Sicht gerät in jüngster Zeit jedoch unter Kritik, da die Turgorverhältnisse des Gewebes in den entsprechenden Experimenten falsch interpretiert wurden (siehe Kap. 11.1, Peters und Tomos 2000).

### **Beeinflussung der genannten Regulationsmechanismen durch exogene oder endogene rhythmische Prozesse**

Zeitliche Wachstumsmuster in Pflanzen verlaufen oft rhythmisch; zumindest, wenn man sie auf einer genügend feinen Skala betrachtet. So fällt beispielsweise die Wuchsrate von Tabakblättern nach der Emergenz monoton ab, wenn man einen zeitlichen Abstand der Messungen von einem Tag zugrunde legt (Walter und Schurr 1999). Betrachtet man den Verlauf des Wachstums aber mit einer höheren Auflösung, so zeigen sich tagesrhythmische Erscheinungen (Walter und Schurr 2000). Ob dieses Phänomen lediglich eine Reaktion auf Änderungen externer Parameter darstellt – wie zum Beispiel die verminderte Transpiration von Pflanzen während der Nacht – oder ob es sich um einen endogenen Rhythmus der Pflanze handelt, der von den äusseren Bedingungen lediglich getriggert wird, ist der bisher publizierten Literatur nicht zu entnehmen und stellt eines der Ziele der vorliegenden Studie dar.

**Charakteristika endogener, circadianer Rhythmen** sind (Strasburger 1998):

- a) Der Vorgang läuft auch unter konstanten Aussenbedingungen noch wochenlang rhythmisch weiter ('endogener' Rhythmus)
- b) Die Periodenlänge beträgt unter konstanten Aussenbedingungen etwa 24 Stunden ('circadianer' Rhythmus)
- c) Der circadiane Vorgang kann durch ein einziges Signal in Gang gesetzt werden; z.B. durch eine einzige Nachtphase im Verlauf der Entwicklung
- d) Circadiane oszillierende Systeme können in ihrer Periode durch überlagernde äußere Schwingungen verstellt werden (Periodenlängen zwischen 6 und 36 Stunden)
- e) Circadiane Rhythmen sind abhängig vom oxidativen Stoffwechsel; sie werden nach einigen Stunden Sauerstoffabschluss eingestellt.
- f) Der Rhythmus ist von genetischen Merkmalen abhängig, die in Mutanten abgeändert werden können

Regulatorische Grundlage dieser Rhythmen ist die sogenannte '**physiologische Uhr**'. Sie ermöglicht es Organismen, regelmäßige physiologische Abläufe ohne die Hilfe externer Signale zeitlich koordiniert zu steuern.

## 1.4 Begriffe und Methoden der Wachstumsmessung

Nicht nur der Begriff des Wachstums selbst bedarf einer exakten Definition (siehe Kap. 1.1), sondern auch die zur Beschreibung von Wachstumsprozessen verwendeten Messgrößen. Im nachfolgenden Abschnitt werden in der Literatur verwendete Begriffe vorgestellt und Festlegungen für den weiteren Verlauf dieser Arbeit getroffen. Ferner wird eine Einführung in die wichtigsten Untersuchungsmethoden zur Bestimmung pflanzlichen Wachstums gegeben.

### Absolute und relative Wuchsrate

Die *absolute Wuchsrate* ( $dX/dt$ ) gibt an, um welchen Betrag  $dX$  die Größe  $X$  in einer bestimmten Zeit  $dt$  zugenommen hat. Eine absolute Wuchsrate ist beispielsweise die Wachstumsgeschwindigkeit, mit der sich eine Wurzelspitze durch das Substrat bewegt.

Die *relative Wuchsrate* ( $1/X dX/dt$ ) gibt an, um welchen Bruchteil von  $X$  die Größe  $X$  zugenommen hat. Als Einheit kann hier entweder [ $1/\text{Zeiteinheit}$ ] oder [ $\%/\text{Zeiteinheit}$ ] gewählt werden.

### Wuchsraten von Volumina, Flächen, Längen und Segmenten

Die Definitionen der absoluten und relativen Wuchsraten sind unabhängig davon, ob die betrachtete Größe  $X$  eine Masse, ein Volumen, eine Fläche oder eine Länge darstellt. Mit Wachstum im engeren Sinne wird jedoch üblicherweise stets eine Volumen- oder Massenzunahme bezeichnet. Man muss sich also im klaren darüber sein, dass z.B. die Längenzunahme eines Organs eigentlich nie eine Wuchsrate, sondern nur einen eindimensionalen Teilaspekt eines dreidimensionalen Wachstumsprozesses angibt. Es kann sogar sein, dass eine Längenzunahme gemessen wird, ohne dass das betrachtete Organ überhaupt zuwächst (im Sinne einer massen- oder Volumenzunahme). Das anschaulichste Beispiel hierfür wäre ein in die Länge gezogenes Kaugummi, das seinen Durchmesser proportional zu seiner Längenzunahme verringert.

Die Verteilung von Wuchsraten innerhalb eines Organs wird mit Hilfe von '*Element-Wuchsraten*' beschrieben: Im Zuge einer Messung mit einer gewissen räumlichen Auflösung werden diskrete Segmente oder Elemente eines Organs vermessen. Die einzelnen Wuchsraten der Organ-Abschnitte werden mit dem Begriff der 'Element-Wuchsrate' belegt.

Verringert man durch eine Grenzwertbildung die Größe der Elemente bis hin zu infinitesimal kleinen mathematischen Punkten, so erhält man ein kontinuierliches Feld von Wuchsraten. Dieser Prozess kann mit dem Bilden der ersten Ableitung einer mathematischen Kurve aus real vermessbaren Steigungen kleiner Kurvenelemente verglichen werden. Das bei dieser Grenzwertbildung erhaltene mathematische Gebilde ist ein Tensor (erster, zweiter oder dritter Ordnung), der die (ein-, zwei- oder dreidimensionalen) Verformungsraten des untersuchten Gebildes angibt. Dieser Tensor wird in den Materialwissenschaften '*strain rate*'- oder '*Verformungsraten*'-*Tensor* genannt (Silk 1984). Er entspricht der Divergenz des Geschwindigkeitsfeldes (Kap. 4.1).

Ortsaufgelöste Messungen an Wurzeln oder Blättern sind auf dem derzeitigen Stand der Technik nur über eine Vermessung der Oberfläche des untersuchten Organs möglich. Da die Wachstumszonen bei der Wurzel linear, beim Blatt aber flächig organisiert sind, werden in der Literatur unterschiedliche Begriffe zur ortsaufgelösten Beschreibung des Wachstums verwendet.

Die Verlängerung diskreter Segmente von **Wurzeln** wird in der Regel mit dem Begriff 'REGR' für 'relative elemental growth rate', also relative Element-Wuchsrate (z.B. Erickson und Sax 1956, Peters und Felle 1999) oder 'longitudinale Verformungsrate' (Silk 1984, Beemster und Baskin 1999) belegt; jedoch sind auch andere Begriffe zu finden, wie etwa RELEL, die 'relative elemental rate of elongation' (Buff et al. 1987) oder 'growth strain rate' (Pahlavanian und Silk 1988). Nur in wenigen Studien wurde die volumetrische Zunahme der Wurzel untersucht (z.B. Sharp et al. 1988) und dann mit dem Begriff 'rate of root volume increase' beschrieben. Die Verteilung des Volumenzuwachses war in dieser Studie zwar bei Auftragung gegen die Entfernung von der Wurzelspitze von derjenigen des Längen-Zuwachses deutlich verschieden; die Form und die Lage der Maxima der Verteilungsfunktionen unterschied sich jedoch nur geringfügig von den entsprechenden Werten der eindimensionalen Betrachtung.

Für die absolute Wuchsrate der Wurzel wird in keiner veröffentlichten Studie die volumetrische Zunahme des Organs angegeben, sondern stets nur die Verlängerung, die mit dem Begriff 'root elongation rate' (Sharp et al. 1988), 'elongation per time' (Souda et al. 1990) oder ' $v_{\text{tip}}$ ' für 'velocity of the root tip' (Walter et al. 2000) bezeichnet wird.

Für das **Blatt** wurden bisher nur wenige ortsaufgelöste Studien veröffentlicht. Hier ist der Begriff der 'relative elemental rate of increase in area' vorherrschend (Maksymowych 1973, Erickson 1976). Diese Größe wird durch Bildung der Divergenz des Geschwindigkeitsfeldes berechnet (Richards und Kavanagh 1943, Gandar und Hall 1988).

Für die Zwecke der vorliegenden Arbeit wurden daher folgende **Konventionen** gewählt:

- Die **absolute Wuchsrate der Wurzel** wird durch die Geschwindigkeit der Wurzelspitze ' $V_{\text{Spitze}}$ ' (Einheit mm/h) charakterisiert, also durch ihre eindimensionale Verlängerungsrate.
- Die **relative Wuchsrate des kompletten Blattes** wird mit dem Begriff '**RGR**' oder einfach 'Wuchsrate' bezeichnet (Einheit %/h).
- Im Zusammenhang mit **Wuchsraten von Flächenelementen des Blattes bzw. Längensegmenten der Wurzel** wird von 'Element-Wuchsraten' oder '**REGR**' (Einheit %/h) gesprochen. Die REGR von Wurzel (Längen-Wuchsraten) und Blatt (Flächen-Wuchsraten) sind dabei deutlich voneinander zu unterscheiden!

## Koordinatensysteme des Wachstums

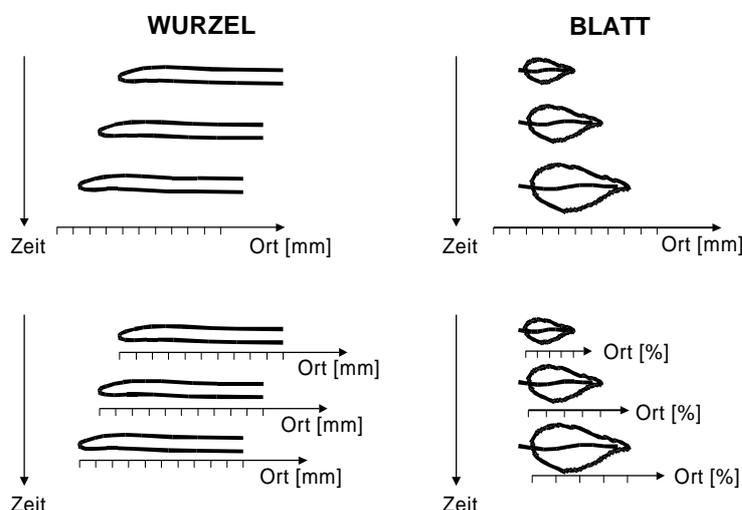
Für die Charakterisierung raum-zeitlicher Wachstumsmuster muss neben der Intensität der untersuchten Wachstumserscheinungen auch das räumliche und zeitliche Referenzsystem klar definiert sein.

### Räumliche Achse(n) des Koordinatensystems

Verteilungen von Wuchsraten entlang der **Wurzel** werden üblicherweise gegen die Entfernung von der Wurzelspitze (Einheit: mm) aufgetragen (Abb. 1.1). Diese Konvention (sog. '*natürliches Koordinatensystem*') wird für die Zwecke der vorliegenden Arbeit übernommen.

In vielen Studien wurde nachgewiesen, dass die Ausdehnung der Wachstumszone über eine relativ lange Zeit hinweg konstant bleibt. Ein zeitlich konstantes Muster kann analysiert werden, wenn man die Wurzelspitze – genauer das ruhende Zentrum des Apikalmeristems – als Koordinatenursprung der Raumachse betrachtet. Im Laborkoordinatensystem oder im Koordinatensystem einer unbewegten, die Wurzel filmenden Kamera, bewegt sich dieses Bezugssystem mit der Geschwindigkeit der Wurzelspitze.

Würde man die Prozesse in der Wurzelwachstumszone nicht nur eindimensional, sondern volumetrisch betrachten, so wäre ein krummliniges Koordinatensystem, dessen Ursprung ebenfalls in der Wurzelspitze sitzt und dessen Hauptachsen entlang der Zell-Linien im Inneren der Wachstumszone verlaufen, das Koordinatensystem der Wahl (z.B. Hejnowicz und Karczewski 1993).



**Abb. 1.1 Koordinatensysteme der Wachstumsanalysen**

Links Wurzel, rechts Blatt.

Oben Laborkoordinatensysteme, unten natürliche Koordinatensysteme

Bei der Wurzel liegt der Ursprung in der Wurzelspitze; die Position wird als Entfernung von der Wurzelspitze [mm] angegeben.

Beim Blatt liegt der Ursprung an der Blattbasis; die Position wird als Entfernung von der Blattbasis [% der Blattlänge] angegeben.

Beim **Blatt** vergrößert sich die wachsende Zone ständig. Die Verwendung eines absoluten Längenmaßstabes mit einem an der Blattbasis (oder –spitze) fixierten Ursprung würde hier zu Fehlinterpretationen führen, wie das folgende Beispiel illustriert (vergleiche Abb. 1.1):

Eine zeitlich monoton abfallende Wuchsratenverteilung, die einen linearen Basis-Spitze-Gradienten aufweist, würde in diesem System dazu führen, dass an gewissen Stellen eine zeitlich ansteigende Wachsraten festgestellt würde, weil sich stärker expandierende Blattregionen mit der Zeit in Regionen des Koordinatensystems bewegen, an denen vorher gering zuwachsende Blattregionen lokalisiert waren. Am einfachsten kann dieses Argument an einer Position nachvoll-

zogen werden, die zu Beginn der Messung etwas apikal der Blattspitze liegt und im Verlauf der Messung von der Blattspitze überstrichen wird. Dort würde man anfänglich keine Wachstumsaktivität registrieren. Ab dem Zeitpunkt, an dem die Blattspitze vom Wachstum des restlichen Blattes über diesen Punkt hinweggeschoben wird, würde die Wachstumsrate jedoch ansteigen.

Für die Zwecke der vorliegenden Arbeit wurde daher ein **mit dem wachsenden Blatt expandierendes natürliches Koordinatensystem** (Abb. 1.1) gewählt, dessen Ursprung in der Blattbasis liegt und dessen Koordinaten die Entfernung des betrachteten Flächenelementes in Relation zur jeweiligen Blattlänge angeben (Einheit: Prozent der Gesamtlänge; Walter und Schurr 1999).

Theoretisch wäre eine Auftragung von Element-Wachsraten gegen die **Position auf dem Ader-system** hier die adäquate Darstellungsform, da nur das zuwachsende Adersystem zu jedem Zeitpunkt die räumlichen Beziehungen von Segmenten des Blattes zueinander korrekt wiedergibt. Da eine derartige Darstellung jedoch völlig neue Begrifflichkeiten erfordern würde (als Einheit könnten beispielsweise Ordnungszahlen von Aderkreuzungspunkten dienen) und da die für die Zwecke der vorliegenden Arbeiten benötigte Präzision der räumlichen Beschreibung durch die gewählte Konvention gegeben ist, wird hier keine derartige Beschreibung vorgenommen.

### ***Zeitachse des Koordinatensystems***

Als Zeitkoordinate wird in der vorliegenden Arbeit die **reale Zeit** (Einheit: h) verwendet.

Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Entwicklung verschiedener Blätter zeitlich unterschiedlich verlaufen kann und auch Aussenfaktoren Einfluss auf den zeitlichen Ablauf der Entwicklung nehmen können. In der Literatur werden daher oft sogenannte **'Entwicklungsindices'** verwendet, die beispielsweise den Einfluss der Temperatur berücksichtigen (thermal time; Granier und Tardieu 1998), den relativen zeitlichen Abstand zur vorausgegangenen Blattanlage (leaf plastochron index, Erickson und Michelini 1957) oder den Entwicklungszustand der Blattspreite (relative Blattfläche, Walter 1997; absolute Blattfläche, Roggatz et al. 1999).

### **Untersuchungsmethoden zur Bestimmung pflanzlichen Wachstums**

Die verwendeten Untersuchungsmethoden können erhebliche Konsequenzen für die Aussagekraft von Versuchen haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals im biologischen Bereich die Technik der digitalen Bildsequenzanalyse zur Bestimmung von Wachstumsmustern eingesetzt. Deshalb erfolgt an dieser Stelle ein kurzer Vergleich mit bisher verwendeten Methoden.

Wachstum kann mit Hilfe destruktiver oder nicht-destruktiver Techniken erfasst werden (für eine ausführliche Diskussion siehe Kap. 8). Die Erfassung von Längenveränderungen mit Hilfe von **Maßstäben** wird von je her praktiziert und findet auch in der aktuellen Literatur als eine schnelle Methode zur Evaluation großer Pflanzenbestände Verwendung (z.B. McDonald et al. 1992, Walter und Schurr 1999).

Eine Vermessung von räumlich aufgelösten Wachstumsmustern wird in der Literatur für die Wurzel erstmals durch Sachs (1887) beschrieben; für das Blatt durch Avery (1933). Dabei wurden Tintenpunkte auf die Organe aufgebracht. Methoden, die ohne Applikation externer Marken

arbeiteten, wurden jeweils etwa 60 Jahre später erstmals beschrieben (Wurzel: Brumfield 1942; Blatt: Schmundt et al. 1998).

Zeitlich hoch aufgelöste Methoden stehen seit den 70er Jahren zur Verfügung, als in größerem Maßstab elektronische Hilfsmittel einsetzbar wurden (Watts 1974); *LVDTs* (linear variable differential transducers) registrieren dabei die Positionsveränderung der zuwachsenden Blattspitze mit Hilfe eines an sie befestigten Regulierungselementes eines Verschiebewiderstandes. Nach einem ähnlichen Prinzip gelang bereits etwa 100 Jahre zuvor Sachs (1887) die Vermessung der Zuwachsrate einer Sprossachse.

Methoden, die zeitlich und räumlich eine hohe Auflösung bieten, standen bislang nicht zur Verfügung; auch war die Auswertung der Daten selten in automatisierter Form möglich, sodass nur wenige Datensätze im Verlauf einer Studie erhoben werden konnten.

### **Bildverarbeitungsmethoden**

Der große Nutzen bildverarbeitender Methoden für die Vermessung pflanzlicher Wachstumsmuster wurde in den 50er Jahren erstmals anhand der Aufnahme von Tintenpunkten auf einer Wurzelwachstumszone mit Hilfe einer Spalt-Kamera demonstriert (Erickson und Sax 1956): Die zeitlich nebeneinander gelegten Spaltenbilder der Tintenpunkt-Verteilung entlang der Wurzelwachstumszone liefern ein sogenanntes '*Streifenbild*'; eine Schar von divergenten Trajektorien, deren Steigung die Geschwindigkeit des jeweiligen zellulären Elements angibt.

Nach dem gleichen Prinzip funktioniert auch **die in dieser Arbeit eingesetzte Methode**, die Wachstumsmuster mit Hilfe digitaler Bildsequenzverarbeitung (*digital image sequence processing, DISP*) erfasst. Eine detaillierte Beschreibung der Methode erfolgt später (Kap. 4). Das Messprinzip basiert auf der Berechnung von lokalen Orientierungen, die in Bildstapeln durch die Bewegung von Grauwertmustern entstehen und mit Hilfe der sogenannten Strukturtenormethode analysiert werden können (Bigün und Granlund 1987, Schmundt et al. 1998, Haußecker und Spies 1999).

Die **Vorteile dieser Methode** gegenüber den bis dahin verwendeten sind:

- Gleichzeitig erreichbare hohe **zeitliche und räumliche Auflösung**
- **Skalierbarkeit**: Die Methode kann auf Wachstumsprozesse verschiedenster räumlicher und zeitlicher Dimensionen angewendet werden
- **Automatisierung** von Aufnahme und Auswertung
- Effiziente Möglichkeiten für **data mining**: die hohe Datendichte kann durch verschiedene Hilfsfunktionen auf ein einfach interpretierbares Maß sinnvoller Parameter reduziert werden

## Zielsetzung

**Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun,**

- (a) die Wachstumsaktivität von pflanzlichen Organen zu kartieren,
- (b) charakteristische Muster der kartierten Wachstumsverteilungen zu erkennen und diese
- (c) vor dem Hintergrund der Struktur und Funktion des untersuchten Organs
- (d) mit Hilfe parallel durchgeführter Messungen von internen und externen Parametern
- (e) im Hinblick auf die physiologische Aktivität des Organs, bzw. die Ökophysiologie der Pflanze zu interpretieren sowie
- (f) möglicherweise beteiligte Regulationsprozesse vor dem Hintergrund raum-zeitlicher Dynamik zu evaluieren.

# Material und Methoden

## 2 Wurzelwachstum

### 2.1 Pflanzenanzucht

Als **Pflanzenmaterial** diente für die Zwecke der Wurzelwachstumsanalyse vorwiegend Mais (*Zea mays* cv. Alexandra). Bei einzelnen Versuchen wurde auch Tabak kultiviert (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun).

Die **Kultivierung der Pflanzen** erfolgte in einem speziellen Anzucht-Aufbau, dem sogenannten Durchfluss-Rhizotron (Abb. 2.1). Die Maiskeimlinge wurden nach 2-3 Tagen Inkubation der Samen in gut gewässertem Sand in das Rhizotron überführt. Die Samen waren zu diesem Zeitpunkt gekeimt und wiesen eine etwa ein cm lange Koleoptile sowie eine 2-3 cm lange Primärwurzel auf. Beobachtete Tabakpflanzen wurden in hydroponischer Kultur angezogen (siehe Kap. 3.1) und dann zu gegebener Zeit in das Rhizotron überführt.

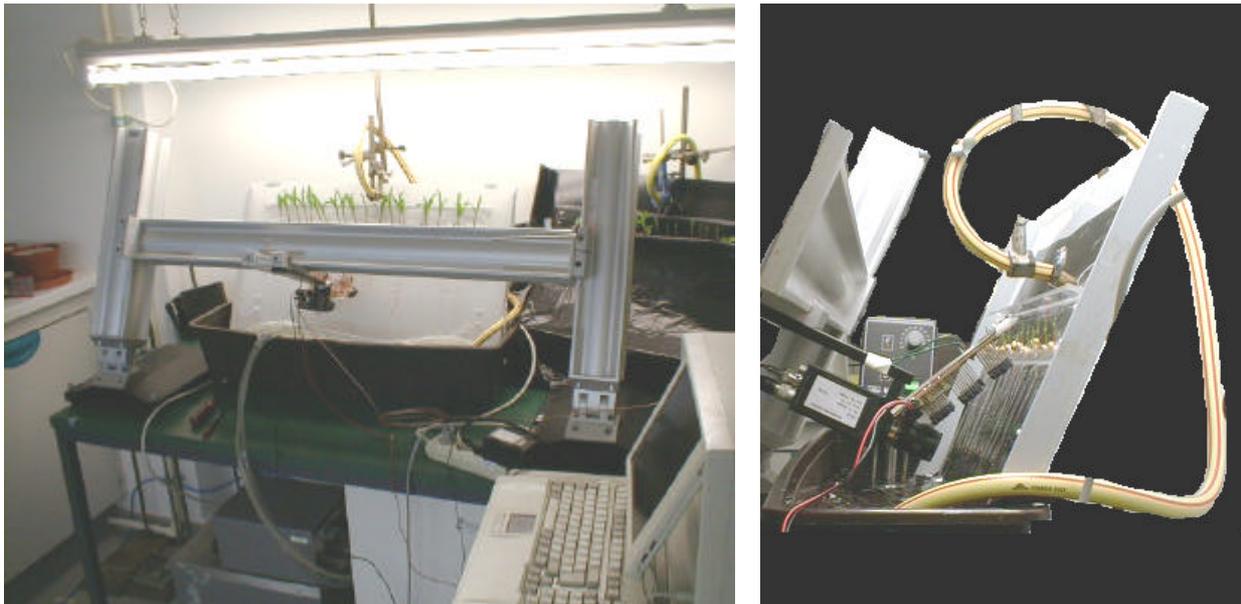


Abb. 2.1 Durchfluss-Rhizotron zur Beobachtung von Maiswurzeln (Frontal- und Seitenansicht)

Im **Durchfluss-Rhizotron** finden jeweils etwa 20 Maiskeimlinge Platz. Diese werden mit Hilfe eines Plexiglas-Halters an der Grundplatte des Aufbaus befestigt. Die Grundplatte des Aufbaus besteht aus Kunststoff und weist eine Neigung (Inklination) von  $68^\circ$  gegen die Horizontale auf. In einem geschlossenen Kreislauf werden die Keimlingswurzeln je nach Versuchsansatz von bidestilliertem Wasser oder von Ingestad-Nährlösung (siehe unten) umspült (Abb. 2.2). Die Flüssigkeit wird am Grund der Platte in einem Kunststoff-Behälter (Fa. Dehner, Rain am Lech, Volumen: 15 l) gesammelt und mit einer Tauchpumpe an die obere Flanke der Grundplatte gepumpt. Der Flüssigkeitsstrom wird dort durch den als Keimlingshalter dienenden Plexiglas-Halter aufgeweitet und fließt als weitgehend laminarer Strom von weniger als ein mm Dicke zwischen Grundplatte und Haushalts-Plastikfolie, die die Keimlingswurzeln bedeckt (Fläche ca.  $60 * 30$  cm), in den Kunststoff-Behälter zurück.

## Standard-Klimabedingungen

Das Rhizotron befand sich standardmäßig in einem klimatisierten Raum bei Temperaturen von 21 oder 26 °C (je nach Versuch), 40 % relativer Luftfeuchte und 150  $\mu\text{E}$  Lichtintensität bei Lichtwechselbedingungen von 12 h hell / 12 h dunkel.

## Ingestad-Nährlösung

Als Nährlösung wurde eine Ingestad-Nährlösung verwendet (Ingestad 1982). In dieser Lösung liegen die Nährstoffe in folgendem Verhältnis vor (Angaben bezüglich der Stickstoffmasse):  $\text{NO}_3^-$  61,5 %,  $\text{NH}_4^+$  38,5 %,  $\text{K}^+$  65 %,  $\text{PO}_4^{3-}$  13 %,  $\text{Ca}^{2+}$  7%,  $\text{Mg}^{2+}$  8,5 %,  $\text{SO}_4^{2-}$  9 %, Fe 0,7 %, Mn 0,4 %, Cu 0,03 %, Zn 0,06 %, B 0,2 %, Mo 0,07 %,  $\text{Na}^+$  0,034 %,  $\text{Cl}^-$  0,033 %. Falls keine andere Angabe erfolgt, wurde die aus zwei Stammlösungen herzustellende Nährlösung mit bidestilliertem Wasser auf eine Konzentration von 10 mM Stickstoff eingestellt.

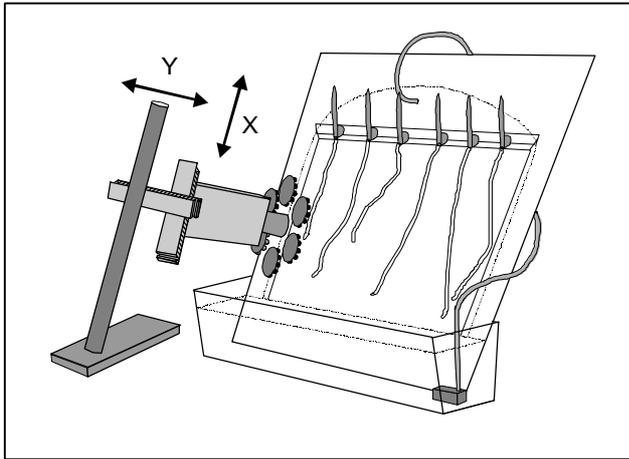


Abb. 2.2 Schematisierte Zeichnung des Rhizotrons



Abb. 2.3 Sand-Rhizotron aus Davis für pH-Versuch

In einem anderen Aufbau, dem sogenannten **Sand-Rhizotron**, wurde in Davis, USA ein Versuch zur Abhängigkeit des Wurzelwachstums von externen pH-Bedingungen durchgeführt. Dieser Aufbau bestand aus einer mit Sand gefüllten Plexiglasbox, an deren Seitenfläche Maiswurzeln gut sichtbar entlangwuchsen (Abb. 2.3). Durch in die Seitenfläche eingebrachte, verschließbare Fenster konnten den Wurzelspitzen mittels einer Zeichenfeder feine Tuschepunkte in Abständen von 1 mm aufgebracht werden. Das im Rhizotron befindliche Substrat wurde mit Flüssigkeit eines definierten pH-Wertes (siehe Kap. 6.3) bis zum Erreichen eines Wasser-Sättigungsgrades von 70 % getränkt und mit Haushaltsfolie luftdicht abgeschlossen, nachdem die Keimlinge eingesetzt waren. Die Keimlingsanzucht erfolgte hier nach Oberflächensterilisation der Samen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und 9-stündiger Samenquellung in Wasser für 2 Tage in Vermiculit. Das Rhizotron befand sich in einem abgedunkelten Inkubationsschrank bei 26 °C und wurde nur zur Markierung, zum Abmessen und zur Ernte der Wurzeln herausgeholt.

## 2.2 Wachstumsbestimmung mit konventionellen Mitteln

### Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelspitze

Die Verlängerung der Wurzeln aller im Rhizotron befindlichen Keimlinge wurde täglich durch Aufbringen von Punkten auf der Schutzfolie kontrolliert. Hierzu wurde an der aktuellen Position der Wurzelspitze mit einem Faserschreiber oder mit TipEx ein Punkt aufgebracht; die Distanzen zwischen sukzessiven Punkten wurden mit Hilfe eines Lineals vermessen. Mit Hilfe dieser Technik konnten auch grob aufgelöste Tagesgänge des Wurzelwachstums erfasst werden (alle vier bis sechs Stunden eine Markierung).

### Wachstumsverteilung entlang der Wurzelspitze

Die klassische und bis heute weltweit in vielen Labors verwendete Methode, um Wachstumsverteilungen auf der Wurzelspitze zu untersuchen ist die **Markierungsmethode** (Sachs 1887; Erickson und Sax 1956, Beemster und Baskin 1998, Walter et al. 2000). Hierbei werden auf der Rhizodermis in gewissen Abständen dunkle Markierungen aufgebracht. Die Wurzel wird in regelmäßigen zeitlichen Abständen zusammen mit einem Kalibrationsmaßstab fotografiert. Als Markierungen dienen bei den Experimenten in Sandanzucht Tintenpunkte (Abb. 2.4 links).

Bei den Experimenten im Durchfluss-Rhizotron fanden kleine Aktivkohlepartikel Verwendung (Abb. 2.4 rechts). Diese wurden auf die Wurzel aufgebracht, indem die Schutzfolie kurz angehoben und die Wurzelspitze für kurze Zeit in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (E-Cup) mit wässriger Suspension der Aktivkohlepartikel getaucht wurde.

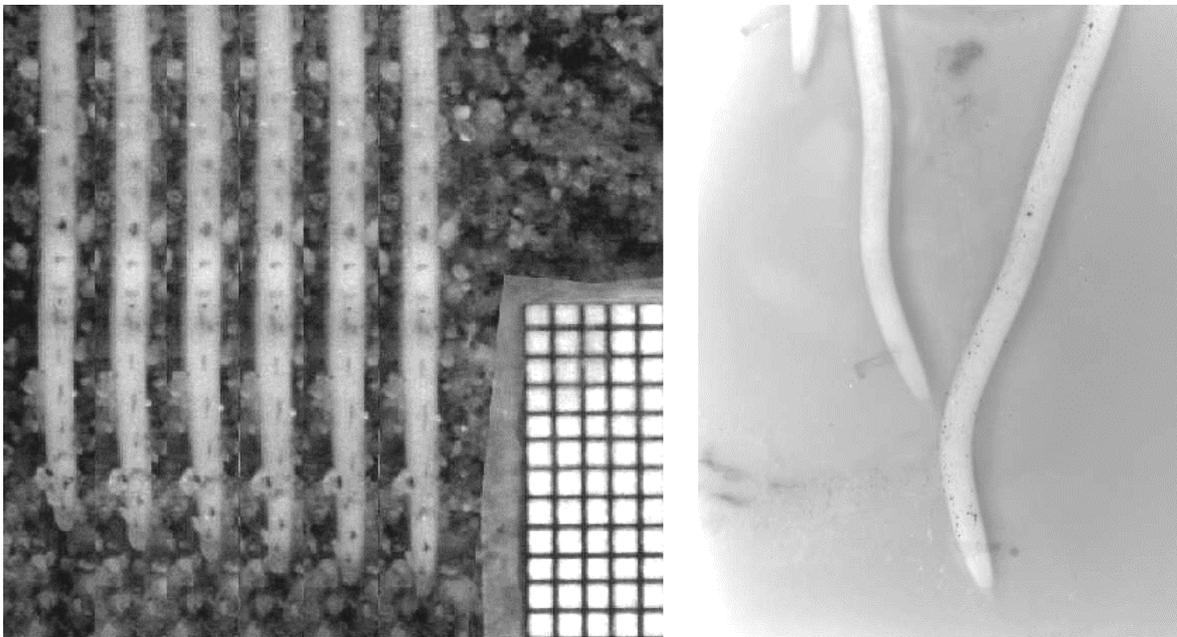


Abb. 2.4 Markierte Wurzelspitzen

**Links:** Fotomontage einer Wurzelspitze in Sandanzucht aus sechs Bildern mit einem zeitlichen Abstand von je 15 min. Referenzmaßstab: Gitterabstand 1 mm.

**Rechts:** Drei Wurzelspitzen im Durchfluss-Rhizotron; die rechte davon ist mit Aktivkohle markiert. Bildgröße: 12 \* 16 mm. Knapp hinter den Wurzelspitzen sind schemenhaft die Faserschreibermarkierungen der Vermessung des Gesamtzuwachses auf der Haushaltsfolie zu erkennen. Der Farbstoff ist im Infraroten nahezu durchsichtig.

Bei den Sandanzuchtexperimenten wurden die markierten Wurzeln im Abstand von einer Stunde mit einer Spiegelreflexkamera fotografiert und die Bilder zur Vermessung eingescannt. Bei Versuchen im Durchfluss-Rhizotron wurden stets Aufnahmen im Abstand von einer Minute mit Hilfe einer CCD-Kamera (Sony XC 75, Fa. Linos, Göttingen) gemacht. Diese Aufnahmen dienten der Erstellung von Filmen des zuwachsenden Organs, die nicht von Beginn der Arbeit an hinsichtlich der Wachsratenverteilungen untersucht werden konnten. Ausgewertet wurden lediglich zwei Bilder mit einem Abstand von einer Stunde.

Zur Auswertung wurden die Bilder in Corel Draw (Corel Corporation; Ottawa, Kanada) oder Sigma Scan (Fa. Jandel Scientific, Corte Madera, USA) importiert. Mit Hilfe der Grafiksoftware und der Kalibration der Bilder wurden entweder die Abstände zwischen einzelnen Punkten, die typischerweise im ersten der beiden Bilder einen Abstand von einem mm hatten, oder die jeweiligen Abstände zwischen diesen Punkten und der Wurzelspitze, vermessen. Aus den anfänglichen Abständen (erstes Bild) der Punkte von der Wurzelspitze ( $x_i$ ) und den finalen Abständen (zweites Bild) der Punkte von der Wurzelspitze ( $x_f$ ) konnte die **Geschwindigkeit**  $v(x_a)$ , mit der sich die Punkte von der Wurzelspitze entfernten (Einheit: mm/h), berechnet werden ( $x_a$  ist der mittlere Abstand eines Punktes von der Wurzelspitze:  $x_a = (x_i + x_f)/2$ ):

$$v(x_a) = \frac{x_f - x_i}{1 \text{ Stunde}}$$

Die Verteilung der **Wachstumsgeschwindigkeiten**  $v(x)$  wurde dann mittels einer flexiblen **logistischen Funktion angefitzt** (Morris und Silk 1992):

$$v(x) = \frac{v_0 * v_f}{[v_0^n + (v_f^n - v_0^n) * e^{-k(x-x_0)}]^{1/n}}$$

Hierbei gibt  $v_0$  die Geschwindigkeit an einem willkürlich gewählten Ort  $x_0$  an (als numerische Werte wurden gewählt:  $v_0 = 0,01$  mm/h;  $x_0 = 0,1$  mm),  $v_f$  steht für die Geschwindigkeit an der Basis der Wachstumszone (entspricht der jeweiligen Geschwindigkeit der Wurzelspitze) und die Parameter  $k$  und  $n$  sind Formfaktoren der Kurve, die durch Anfitzen der Daten (Software Sigma Plot; Jandel Scientific, Corte Madera, USA) erhalten wurden.

Die räumliche analytische Ableitung dieser Gleichung liefert einen Ausdruck  $r(x)$ , der die Wachsraten oder genauer gesagt, die **Elongationsrate** der Wurzel in Abhängigkeit vom Abstand zur Wurzelspitze liefert:

$$r(x) = \frac{\partial v}{\partial x} = \frac{k * v(x) * (v_f^n - v(x)^n)}{n * v_f}$$

### 2.3 Bestimmung von Depositionsraten

Depositionsraten geben an, welche Menge eines bestimmten Stoffes in ein definiertes Segment eines wachsenden Organs in einer bestimmten Zeiteinheit netto hineintransportiert wird. Die Depositionsrates einer Substanz wird mit Hilfe der **Kontinuitätsgleichung** (z.B. nach Silk et al. 1986) errechnet:

$$D(x) = \frac{\partial C(x)}{\partial t} + \frac{\partial(C(x) * v(x))}{\partial x}$$

Hierbei ist  $D(x)$  die lokale Depositionsrates der Substanz an der Stelle  $x$  in der Einheit  $\text{nmol}/\text{mm}$  Wurzellänge/h;  $C(x)$  ist die lokale Dichte der Substanz [ $\text{nmol}/\text{mm}$  Wurzellänge],  $t$  ist die Zeit,  $x$  die Entfernung von der Wurzelspitze [mm] und  $v(x)$  ist die wie oben definierte Wachstumsgeschwindigkeit [mm/h]. Falls  $D(x)$  auf Frischgewichtsbasis ausgedrückt werden soll, ist es durch das spezifische Frischgewicht des entsprechenden Wurzelsegments zu dividieren. Falls die Dichte oder Konzentration des zu untersuchenden Stoffes sich mit der Zeit nicht ändert, wird der erste Term der obigen Gleichung zu Null und fällt damit weg.

### 2.4 Ernteverfahren

Sowohl in Davis als auch in Heidelberg fanden mehrere Ernten der Maiskeimlinge statt, bei denen vor allem die Inhaltsstoff-Verteilung der Wurzelwachstumszone von Interesse war. Weiterhin wurde von den geernteten Pflanzen das Frisch- und Trockengewicht bestimmt.

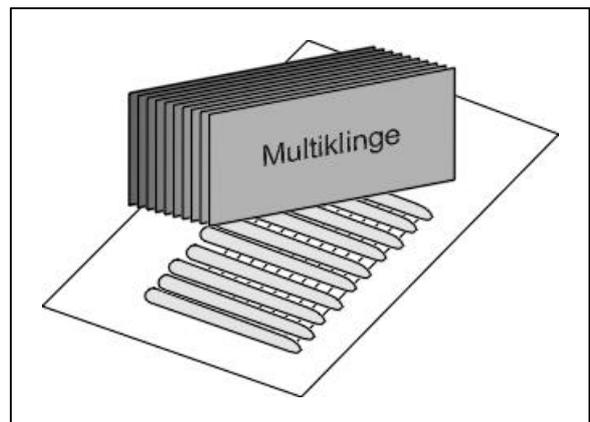


Abb. 2.5 Ernte von Maiswurzelsegmenten

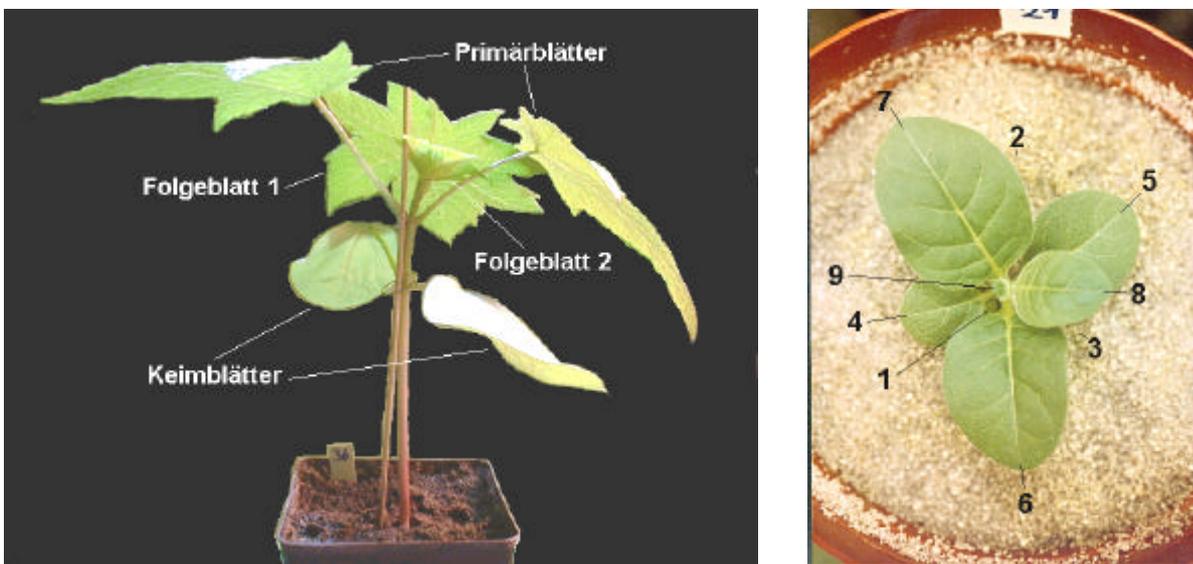
Zwei bis drei Tage nach Inkubation der Keimlinge im Rhizotron wurden diese entnommen und mit ihren Wurzelspitzen auf eine mit einem Millimetergitter markierte Kunststoffplatte gelegt. Dabei wurden je 10 Keimlinge unmittelbar nebeneinander positioniert (Abb. 2.5). Mit Hilfe einer Multiklinge bzw. unter Einsatz des Millimeter-Gitters wurden die vordersten 10 mm der Wurzelspitze in 1-mm-Segmente geschnitten. Dabei wurden die Segmente von je 10 oder 20 Pflanzen gemeinsam in ein E-Cup überführt, gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei minus 80 °C gelagert. Die Calyptra der Wurzel (etwa die vordersten 0,5 mm der Wurzel) wurde verworfen. Sofern bei den Versuchsbeschreibungen in Kapitel 6 nichts anderes angegeben ist, wurden die Pflanzen um 15 Uhr geerntet.

**Frischgewichte** wurden mittels einer elektronischen Feinwaage (Fa. Sartorius Göttingen, Typ Basic, Auflösung 0,1 mg) bestimmt. **Trockengewichtsbestimmungen** wurden mit derselben Waage nach Inkubation des Pflanzenmaterials für mindestens 48 h bei 80 °C durchgeführt.

## 3 Blattwachstum

### 3.1 Pflanzenanzucht

Blattwachstum wurde an Pflanzen der Art *Ricinus communis* cv. Carmencita (Rizinus) sowie *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun (Tabak) bestimmt (Abb. 3.1). Beide Arten weisen in den ersten Wochen ihrer Entwicklung hohe relative Wuchsraten von bis zu 30 %/d auf und verfügen über große (Länge bis über 20 cm) wechselständige und nicht gefiederte Blätter, die an monopodialen Sprossachsen stehen. Die Morphologie, Physiologie und Molekularbiologie von Tabak ist seit langem Gegenstand vieler Studien (z.B. Avery 1933, Hannam 1968, Scheible et al. 1997b). Auch Rizinus wurde in der Literatur intensiv untersucht (z.B. Schurr und Gollan 1990, Roggatz et al. 1999).



**Abb. 3.1 Pflanzen von Rizinus und Tabak**

**Links:** Rizinuspflanze. Von unten nach oben sind an der Pflanze zwei gegenständige Keimblätter, zwei gegenständige Primärblätter sowie des erste und zweite Folgeblatt zu sehen. Die Folgeblätter sind wechselständig, peltat und bestehen aus sieben bis acht gesägten Blattlappen. Sie werden von unten nach oben durchnummeriert (erstes Folgeblatt: F1, zweites: F2 usw.)

**Rechts:** Tabakpflanze. Die wechselständigen, eiförmig-ganzrandigen Blätter werden von unten nach oben durchnummeriert; beginnend mit den Keimblättern.

### Methoden zur Pflanzenanzucht

Die meisten Experimente wurden an Pflanzen in Erdanzucht durchgeführt, die in den sogenannten ‚Plexikammern‘ kultiviert wurden (Abb. 3.2). Sofern im weiteren Verlauf des Textes von ‚Standardbedingungen‘ der Kultivierung die Rede ist, bezieht sich dies auf eine Erdanzucht in den Plexikammern. Die Anzucht der Pflanzen konnte aufgrund der unterschiedlichen experimentellen Ansätze jedoch nicht stets unter Standardbedingungen erfolgen. Die verwendete Anzuchtform ist den jeweiligen Versuchsbeschreibungen der Experimente (Kap. 7) zu entnehmen.



**Abb. 3.2 Anzucht in den Plexikammern (Standard-Anzuchtmethode für DISP-Untersuchungen)**

**Links:** Plexikammern während einer DISP-Messung. Die Plexikammern sind klimatisierbare, transportable Anzuchtträume mit weitgehend Infrarotlicht-freier Neonröhrenbeleuchtung.

**Rechts:** Erdanzucht-Tabkpflanzen während einer DISP-Messung in der geöffneten Plexikammer



**Abb. 3.3 Weitere Anzuchtformen und -orte**

**Links:** Rizinusanzucht im Freiland. Hier entwickeln die Pflanzen wesentlich größere, rötlicher gefärbte Blätter als unter Laborbedingungen.

**Mitte:** Erdanzucht von Tabak und Rizinus im Rollwagen. Hier fand in der Regel die Voranzucht von Pflanzen statt, die später in die Plexikammern überführt wurden, da Beleuchtungs- und Klimabedingungen weitgehend identisch sind.

**Rechts:** Hydrokulturanzucht von Tabak. Die Kultivierung fand unter Einsatz einer Ingestad-Nährlösung statt.

Im einzelnen wurden folgende **Anzuchtverfahren** durchgeführt:

**Keimung der Pflanzen.** Sie fand in Kunststoff-Töpfen (Fa. Pöppelmann, Löhne) statt, die mit Sand (Fa. Dorsilit, Mannheim; 1:1-Gemisch aus Korngröße 0,6-0,8 mm und 0,6-1,2 mm) gefüllt waren. Die Töpfe wurden mit Ingestad-Nährlösung (Stickstoffgehalt: 1 mM) gegossen. Rizinuspflanzen wurden eine Woche nach erfolgter Keimung pikiert; Tabakpflanzen drei bis vier Wochen nach erfolgter Keimung.

**Erdanzucht.** Hierbei wurden ein Gemisch aus Fruhstorfer Erde, Kompost und Sand, sowie gleichartige Töpfe wie für die Keimung verwendet. Die Pflanzen wurden mit Leitungswasser gegossen.

**Hydrokultur.** Tabakpflanzen wurden bei dieser Kultivierungsmethode in Kunststoff-Behälter (Fa. Dehner, Rain am Lech, Volumen 10 l) pikiert. Die Fixierung der Pflanzen im Deckel des Hydrokulturgefäßes erfolgte mittels Schaumstoffpölsterchen, in die die Keimlinge eingesetzt wurden. Die verwendete Ingestad-Nährlösung (Stickstoffgehalt sofern nicht anders angegeben 10 mM) wurde mit Hilfe einer Membranpumpe stetig belüftet.

Dabei standen folgende **Räumlichkeiten bzw. Orte zur Anzucht** zur Verfügung:

**Plexikammern.** Die Pflanzen standen hier unter folgenden klimatischen Bedingungen: Temperatur konstant 25 °C, relative Luftfeuchte konstant 60 %, 12 h hell / 12 h dunkel (Licht von 8 Uhr bis 20 Uhr), Lichtintensität auf Höhe der wachsenden Blätter  $150 \pm 50 \mu\text{E}$ . Die Beleuchtung erfolgte mittels Neonröhren, da diese im Spektralbereich des nahen Infrarot nur eine minimale Emission aufweisen. Dadurch wurden die DISP-Aufnahmen (Kap. 4) weniger beeinträchtigt als bei Beleuchtung mit anderen Lichtquellen.

**Rollwagen.** Hier herrschten identische klimatische Bedingungen wie in den Plexikammern.

**Klimakammer.** Hier herrschten identische klimatische Bedingungen wie in den Plexikammern; die Lichtintensität lag jedoch auf Höhe der wachsenden Blätter bei  $300 \pm 100 \mu\text{E}$  (Lampentyp: Osram HQI-400).

**Freiland.** Auf den Versuchsflächen des Botanischen Institutes der Universität Heidelberg wurde im Juni 1999 ein Experiment durchgeführt.

### 3.2 Wachstumsbestimmung mit konventionellen Mitteln

Mit Hilfe von Lineal und Schieblehre fanden in der vorliegenden Arbeit bei vielen Versuchen Vermessungen charakteristischer Größen der Pflanze statt:

- **Gesamtblattfläche.** Hierunter versteht man die Summe aller einzelnen Blattflächen einer Pflanze. Die Gesamtblattfläche ist ein nicht-destruktiv messbarer Parameter, der sehr gut das Wachstum der kompletten Pflanze widerspiegelt (Walter und Schurr 1999). Die einzelnen Module der Gesamtblattfläche, die Einzelblattflächen, verhalten sich zeitlich synchron, weswegen die Dynamik von Gesamt- und Einzelblattfläche eng korreliert ist.

- **Einzelblattflächen.** Die Vermessung der Wachstumsmuster von einzelnen Blättern mit Hilfe der DISP-Methode stellte das zentrale Untersuchungsziel der vorliegenden Arbeit dar. Einzelblattflächen klassisch zu vermessen, war daher als Kontrollmethode unabdingbar.
- **Längen von Blattmittelrippen.** Die zeitliche Verteilung der Elongationsaktivität der Mittelrippe kann mit Hilfe einer im Verlauf dieser Arbeit entwickelten Methode auch im Tagesgang vermessen werden. Die Längenentwicklung der Blattmittelrippe ist recht gut mit der Flächenentwicklung des Blattes korreliert (Walter und Schurr 1999).
- **Längen von Blattmittelrippen-Segmenten.** Durch diese Messung kann der Basis-Spitze-Gradient des Blattwachstums klassisch ermittelt werden

### Bestimmung der Fläche von Blattspreiten

Bei *Tabak* errechnet sich die Blattfläche aus Länge  $L$  und Breite  $B$  (Abb. 3.4) nach folgender biometrischer Formel:

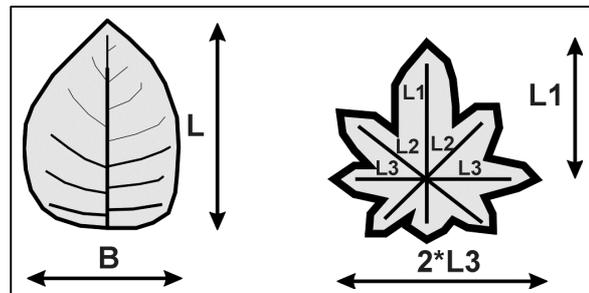
$$\text{Fläche} = 0,75 * L * B$$

Obwohl sich die Form junger und alter Tabakblätter erheblich voneinander unterscheidet und jedes Blatt während seiner Entwicklung eine deutliche Formänderung durchmacht, kann für alle Blätter derselbe Formfaktor von 0,75 verwendet werden (Walter 1997). Entspräche die Blattform einer Ellipse oder einem Kreis, hätte der Formfaktor den Wert  $\pi/4 = 0,785$ .

**Abb. 3.4 Charakteristische Längen von Tabak- und Rizinusblättern**

**Links:** Tabak; Länge und Breite des Blattes

**Rechts:** Rizinus; Länge der Rippe des mittleren vorderen Blattlappens ( $L_1$ ) und Längen der senkrecht dazu verlaufenden Blattlappen-Rippen ( $L_3$ )



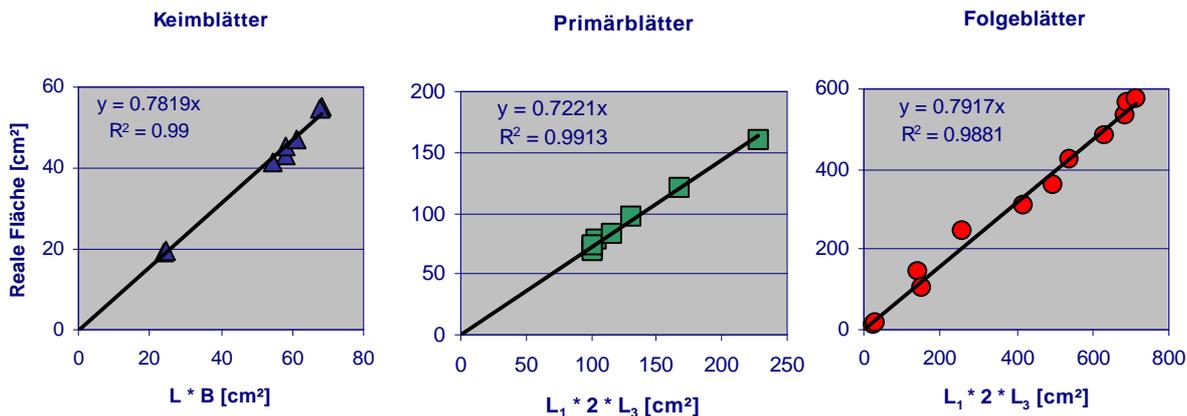
Bei *Rizinus* liegen die Verhältnisse etwas komplizierter, da sich Keimblätter, Primär- und Folgeblätter in ihrer Form stark voneinander unterscheiden. Zur Ermittlung von biometrischen Bezügen wurden Blätter verschiedener Entwicklungszustände gerettet (Keimblätter bis F4), die Längen der Rippen vermessen und die Blätter auf Papier abgezeichnet. Aus der bekannten Dichte des Papiers und der Masse der ausgeschnittenen Papier-Blattumrisse konnte die reale Fläche dieser Eichblätter ermittelt und gegen verschiedene charakteristische Größen der Blätter (Abb. 3.4) aufgetragen werden (gegen  $L_1$ , gegen das Produkt aus  $L_1$  und  $2*L_3$ ; gegen das Produkt von  $L_1$  und maximaler Breite, das bei Primärblättern nicht  $2*L_3$  entspricht). Die Auftragung gegen  $L_1$  führte stets zu nichtlinearen Korrelationen von wesentlich schlechterem Bestimmtheitsmaß.

Die Vermessung von sieben Keimblättern, sieben Primärblättern und zwölf Folgeblättern führte hier zu folgenden biometrischen Bezügen zwischen der Blattfläche und charakteristischen Längen der Blätter (Abb. 3.5):

$$\text{Keimblätter:} \quad \text{Fläche} = 0,78 * L * B$$

$$\text{Primärblätter:} \quad \text{Fläche} = 0,72 * L_1 * 2 * L_3$$

$$\text{Folgeblätter:} \quad \text{Fläche} = 0,79 * L_1 * 2 * L_3$$



**Abb. 3.5 Biometrische Bezüge zur Ermittlung von Rizinus-Blattflächen**

$L_1$  stellt die Länge der Rippe des mittleren Blattlappens dar (oft auch  $L_{MB}$  genannt);  $2 * L_3$  steht für die Summe der Längen der beiden senkrecht zu  $L_1$  stehenden Blattlappen

### Bestimmung der relativen Wachstumsrate von Blattflächen

Die relative Wachstumsrate (RGR; Einheit: %/d) wurde unter der üblichen Annahme einer exponentiellen Blattflächenentwicklung ( $A(t_2) = A(t_1) * e^{RGR * (t_2 - t_1)}$ , z.B. Walter und Schurr 1999) errechnet:

$$RGR = \frac{1}{t_2 - t_1} * \ln \frac{A(t_2)}{A(t_1)}$$

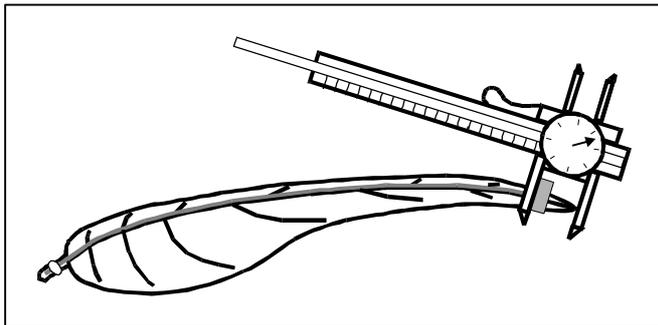
$A(t_1)$  und  $A(t_2)$  bezeichnet die Blattfläche zu den Zeitpunkten  $t_1$  und  $t_2$ .

### Vermessung des Rippen-Längenwachstums

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die sogenannte ‚*Faden-Methode*‘ als manuelle Kontrollmethode für die Wachstums-Messungen mit Hilfe der DISP-Technik erarbeitet (Abb. 3.6). Die Faden-Methode hat gegenüber der DISP-Methode und anderen automatisierten Methoden, wie z.B. Messungen mit LVDTs den Vorteil, dass das zu untersuchende Blatt nicht fixiert werden muss und es so die arttypischen nyctinastischen Bewegungen weiterhin durchführen kann.

Diese Messmethode dient so als Referenzmethode, um eventuell durch die Blattfixierung bedingte Artefakte anderer Methoden analysieren zu können. Ferner kann mit Hilfe dieser Methode rasch eine große Anzahl von Blättern auf ihren RGR-Tagesgang untersucht werden.

Bei dieser Messung wird ein Polyamidfaden mittels Parafilm und Klebeband am Blattstiel einer Pflanze fixiert (Abb. 3.6, oben rechts). Der Faden wird entlang der Mittelrippe des Blattes gelegt und einige Millimeter proximal der Blattspitze mit einem geradkantigen, rechteckigen, 3-lagigen Stück Klebeband versehen (Abb. 3.6, unten rechts). Dieses Klebeband-Stück dient als Marke, an der ein Messfinger einer Schieblehre eingehängt werden kann. Die im Verlauf der Blattentwicklung größer werdende Distanz zwischen der Hinterkante des Klebebandes und der Blattspitze kann so sehr exakt vermessen werden (Abb. 3.6 oben links). Bei gut wachsenden Blättern konnte mit dieser Technik von Hand alle 2 h eine Messung der Mittelrippenlänge durchgeführt werden.



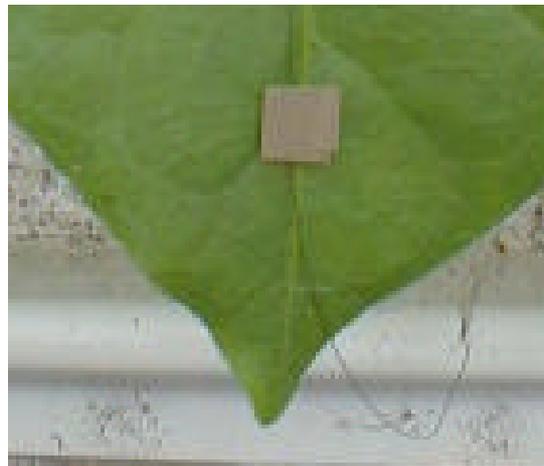
**Abb. 3.6 Messprinzip der Fadenmethode**

Rechts oben: Ein Polyamidfaden (Durchmesser 100  $\mu\text{m}$ ) wird mittels Parafilm und Klebeband am Blattstiel einer Pflanze fixiert (Durchmesser ca. 4 mm).

Rechts unten: Der Faden wird entlang der Mittelrippe des Blattes gelegt und einige Millimeter proximal der Blattspitze mit einem geradkantigen, rechteckigen, dreilagigen Stück Klebeband versehen (3 \* 3 mm).

Links oben: Dieses Klebeband-Stück dient als Marke, an der der Messfinger einer Schieblehre eingehängt werden kann. Die im Verlauf der Blattentwicklung größer werdende Distanz zwischen der Hinterkante des Klebebandes und der Blattspitze kann so sehr exakt vermessen werden.

Im Bild rechts unten beträgt die Distanz zwischen Klebeband-Hinterkante und Blattspitze 15 mm.



### Vermessungen von Mittelrippen-Segmenten

In einigen Versuchen wurden Gradienten der Wachstumsverteilung anhand von Schieblehrenmessungen des Zuwachses von Mittelrippen- oder  $L_1$ -Segmenten bestimmt. Hierzu wurde die Rippe in Segmente unterteilt, die von abzweigenden Seitennerven begrenzt waren (Abb.3.7). Der Seitennerv-Ansatz wurde entweder mit Hilfe von TipEx oder einem Tintenpunkt markiert.

### 3.3 Ernteverfahren

Pflanzen wurden für die Bestimmung von Inhaltsstoffen sowie zur Ermittlung der Anteile verschiedener Gewebetypen geerntet. Je nach Zielsetzung des Experiments wurden verschiedene Techniken, Messungen sowie Ernteprotokolle verwendet. Nachfolgend werden die allgemeinen Aspekte dieser Punkte beschrieben; Detailinformation wird in den Versuchsbeschreibungen der jeweiligen Experimente gegeben (Kap. 7).

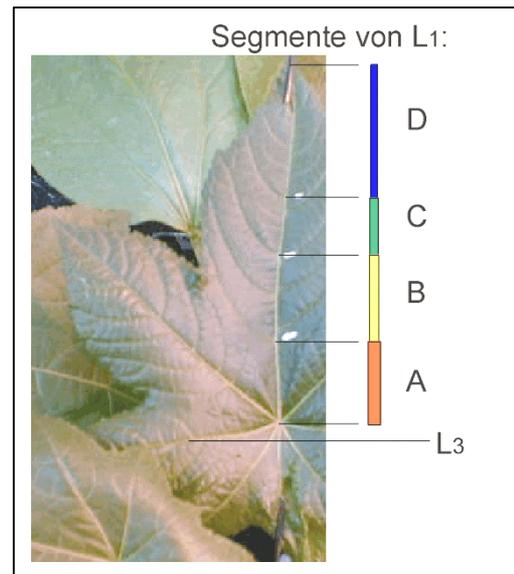


Abb. 3.7: Rippenabschnitte von Rizinus

#### Ermittlung von Frisch- und Trockengewichten

Frischgewichte von abgetrennten Pflanzenteilen wurden mittels einer elektronischen Feinwaage (Sartorius Basic; Auflösung 0,1 mg) bestimmt. Trockengewichtsbestimmungen wurden nach Inkubation des Pflanzenmaterials für mindestens 48 h bei 80 °C durchgeführt.

#### Entnahme von Blattscheiben

Blattscheiben wurden mittels Korkbohrern (verwendete Durchmesser: 4 bis 20 mm) entweder auf Styropor oder auf einem Haushalts-Kunststoffbrett ausgestanzt. Falls die Blattscheiben einer Inhaltsstoff-Analyse zugeführt werden sollten, wurde sofort ihr Frischgewicht bestimmt und das Material anschließend in E-Cups in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### Expansibilitätsmessung

Die Expansibilität oder Dehnbarkeit von Blattmaterial wurde für die Zwecke dieser Arbeit gemessen, indem die Basis des zu untersuchenden Blattes mit der Hand fixiert und die Spitze des Blattes mit der Lastklemme einer Federwaage versehen wurde (Abb. 3.8). Die Federwaage wurde von Hand bis zur Anzeige einer Zuglast von 100 g (entspricht einer Kraft von 1 N) gedehnt; die dadurch erzielte Längenzunahme des Blattes wurde mittels eines Lineals vermessen.



Abb. 3.8 Expansibilitätsmessung mittels Federwaage

Das Blatt wird mit einer Kraft von 1 N (entspricht einer Masse von 100 g) gedehnt und seine Längenzunahme registriert.

#### Bestimmung des Interzellularanteils

Hierfür wurde zunächst das Frischgewicht ( $m_{FG}$ ) eines soeben von der Pflanze abgetrennten Blattes oder Blatteils bestimmt. Sodann wurde das Blatt in eine mit Wasser gefüllte Kunststoff-spritze überführt und durch manuelles Anlegen eines Unterdruckes Vakuum-infiltriert. Nach dreimaligem sukzessiven Entspannen und Anlegen des Vakuums war der Interzellularraum des Blattes vollständig mit Wasser gefüllt, was optisch dadurch kontrolliert werden konnte, dass das Blatt nahezu durchsichtig erschien (Abb. 3.9). Üblicherweise werden Lichtstrahlen im Blatt an den Grenzen zwischen Interzellularraum und Zellverband wegen der unterschiedlichen optischen Dichte dieser Gewebe gebrochen. Ist der Interzellularraum mit Wasser gefüllt, so erscheint das Blatt dagegen viel durchsichtiger.

Nach dieser Prozedur wurde das Blatt der Spritze entnommen, vorsichtig ohne großen Druck trockengetupft und nochmals gewogen ( $m_{IF}$ ). Die Differenz zwischen beiden Messungen resultiert aus infiltriertem Wasser; der Interzellularanteil ergibt sich als prozentualer Volumenanteil des Blattes aus:

$$\text{Interzellularanteil} = 100 * \frac{m_{IF} - m_{FG}}{m_{IF}}$$



**Abb. 3.9 Bestimmung des Interzellularanteils**

Die mit Wasser infiltrierte Blatthälfte (unten) ist durchscheinender als die nicht infiltrierte Blatthälfte (oben).

### Bestimmung des Rippenanteils

Auch hierfür wurde zunächst das Blattfrischgewicht ( $m_{FG}$ ) bestimmt. Anschließend wurde mit einem scharfen Skalpell die Blatt-Mittelrippe vom Rest der Blattspreite abgetrennt und gewogen ( $m_{MR}$ ). Es wurde darauf geachtet, das Blatt auf die Oberseite zu legen, sodass der Rand der nach unten herausstehenden Rippe klar zu erkennen war.

Der Rippenanteil ergibt sich als prozentualer Gewichtsanteil des Blattes aus:

$$\text{Rippenanteil} = 100 * \frac{m_{MR}}{m_{FG}}$$

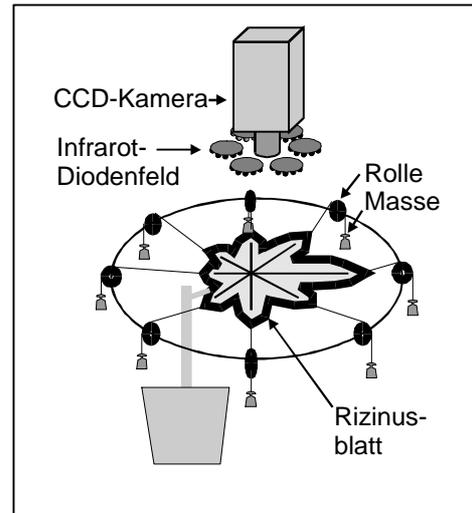
## 4 Wachstumsbestimmung mit Hilfe digitaler Bildsequenzverarbeitung

Die Etablierung, Verbesserung und Überführung der ‚DISP-Methode‘ (digital image sequence processing) in den botanischen Routinebetrieb stellte das Herzstück des methodischen Teils dieser Arbeit dar. Entwickelt wurde das Messverfahren in einer Reihe vorangehender Arbeiten, die sich der bildanalytischen Entwicklung der Methodik widmeten (v.a. Schmudt 1999). In der vorliegenden Arbeit kam die Technik erstmals zum Einsatz, um botanische Fragestellungen zu bearbeiten und eine nennenswerte Anzahl von Replikaten zu untersuchen.

### 4.1 Messprinzip

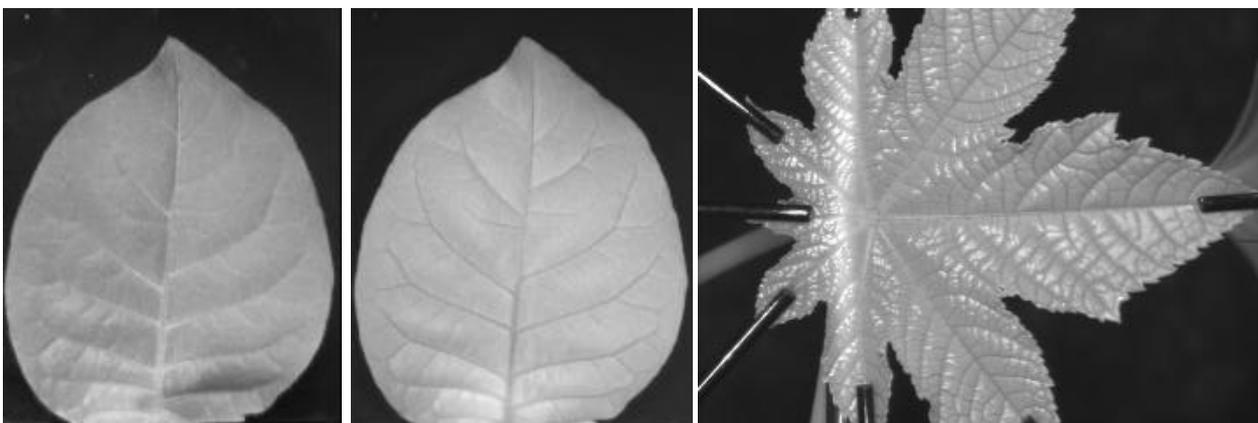
Eine mit Infrarot-Diodenfeldern und entsprechenden Filtersätzen versehene CCD-Kamera (Sony XC 75, Fa. Linos, Göttingen) weist senkrecht auf das zu untersuchende Objekt (Abb. 4.1). In regelmäßigen Zeitabständen wird ein Grauwert-Bild (640\*480 Pixel; 256 Grauwerte) des Objektes aufgenommen (Abb. 4.2).

Nach Abschluss der Aufnahme wird die Bildsequenz mit Hilfe von Algorithmen ausgewertet, die z.T. in der Programmiersprache C++, z.T. mit Hilfe des Bildverarbeitungs-Interpreters Heurisko (Aeon-Verlag, Hanau) programmiert wurden. Bei der Auswertung werden Wachsraten für jede Stelle des Blattes sowie für jeden Zeitpunkt berechnet. Für diese Berechnung werden kleine räumliche und zeitliche Nachbarschaftsregionen betrachtet. Die quasi-punktuellen Wachsraten können räumlich und zeitlich gemittelt sowie als Zeitreihen und farbcodierte Bilder ausgegeben werden



**Abb. 4.1** Schema des DISP-Aufbaus

Die optische Achse einer Kamera weist senkrecht auf ein Objekt, hier ein Rizinusblatt. Es muss sichergestellt sein, dass das Objekt sich nicht zur Kamera hin oder von ihr wegbewegt. Die Szene wird mit Infrarotlicht beleuchtet.



**Abb. 4.2** Grauwert-Bilder von Tabak- und Rizinusblättern

**Von links nach rechts:** Tabakblatt in sichtbarem Licht, Tabakblatt in Infrarotlicht, Rizinusblatt in Infrarotlicht. Der Ader-Intercostalfeldkontrast tritt im Infraroten deutlicher zutage, da sichtbares Licht im Wesentlichen an der Cuticula reflektiert wird, infrarotes dagegen zu einem großen Teil an den Luft-Zell-Übergängen im Schwammparenchym.

Die punktuelle Berechnung von Wuchsraten erfolgt mit Hilfe der **Strukturtenormethode** (Bügün und Granlund 1987, Haußecker und Spies 1999):

Jedes **Grauwertmuster eines Bildes** führt in einem Bildstapel zu einem dreidimensionalen virtuellen Gebilde (Abb. 4.3). Anschaulich gesprochen stellt die Oberfläche dieses Gebildes die Grenzfläche zwischen dunklen und hellen Bereichen der betrachteten Umgebung dar. Die Gesamtheit aller, auf den verschiedenen Stellen dieser Oberfläche senkrecht stehenden Vektoren bildet die Gesamtheit der Grauwertgradienten der betrachteten Umgebung. Diese Gesamtheit (mathematisch gesehen eine Kovarianzmatrix) wird auch ‚*Strukturtensor*‘ genannt. Berechnet man den auf allen Gradienten möglichst senkrecht stehenden Vektor (den Eigenvektor zum kleinsten Eigenwert der Kovarianzmatrix), dann entspricht dies der Orientierung des Gebildes. Entlang dieses Vektors bewegt sich der Schwerpunkt der realen Grauwertstruktur durch den dreidimensionalen Bildstapel. Da er senkrecht auf allen Grauwertgradienten steht und somit die Richtung der geringsten Grauwertänderungen innerhalb der betrachteten Umgebung angibt, bezeichnet man ihn als ‚*Vektor der konstanten Helligkeit*‘.

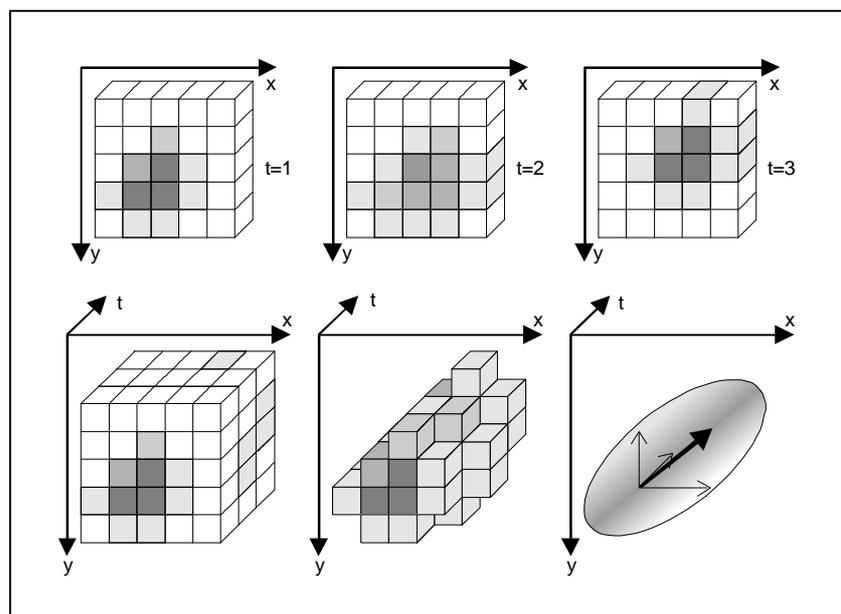
Die **x- bzw. y-Komponente der Geschwindigkeit** der Grauwertstruktur (Abb. 4.3 und Abb. 4.4) entspricht den beiden Quotienten von x-Komponente und zeitlicher Komponente beziehungsweise von y-Komponente und zeitlicher Komponente des Vektors der konstanten Helligkeit.

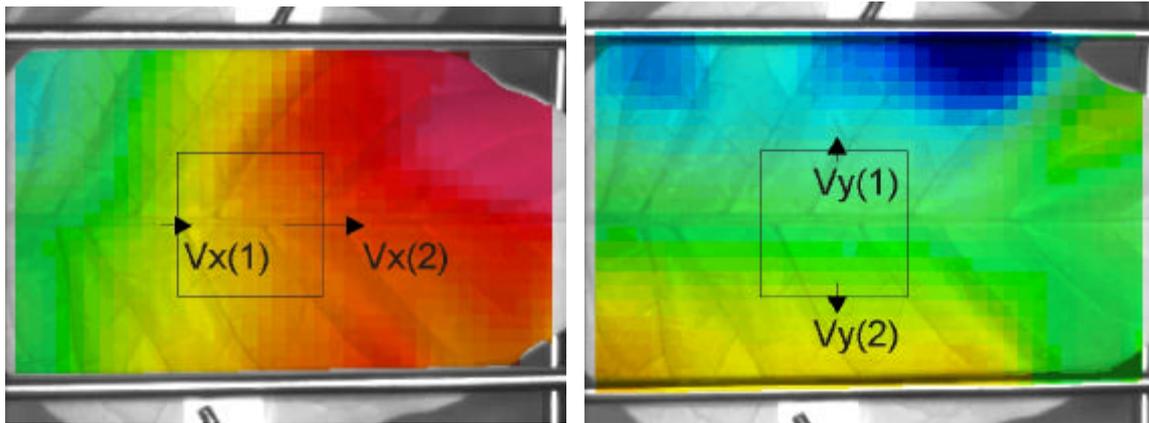
Die **Wuchsrate** eines Blattbereiches entspricht der ‚*Divergenz*‘ des Geschwindigkeitsfeldes des entsprechenden Bildbereiches (Abb. 4.4 und Abb. 4.5). Die Divergenz ist definiert als die Summe der Komponenten der räumlichen Ableitungen. Anschaulich gesprochen werden zu ihrer Berechnung die vier Randlinien des betrachteten Bildbereichs herangezogen: Es wird der mittlere  $v_x$ -Wert der rechten und linken Randlinie berechnet sowie der mittlere  $v_y$ -Wert der oberen und der unteren Randlinie. Die Werte von rechter und linker Randlinie sowie von oberer und unterer Randlinie werden voneinander subtrahiert; man erhält  $dv_x$  und  $dv_y$ . Beide Größen werden durch den Abstand des jeweiligen Randlinienpars dividiert und schliesslich addiert.

#### Abb. 4.3 Orientierungsbestimmung

Eine sich bewegende Grauwertstruktur führt in einem Bildstapel zu einem virtuellen Gebilde, aus dessen Orientierung (Vektor der konstanten Helligkeit) die Geschwindigkeit der Struktur errechnet werden kann:

Hat der Vektor der konstanten Helligkeit die Komponenten  $g_x$ ,  $g_y$  und  $g_t$ , so liegt dem virtuellen Gebilde eine reale Geschwindigkeit der Grauwertstruktur mit den Komponenten  $v_x = g_x/g_t$  und  $v_y = g_y/g_t$  zu Grunde.





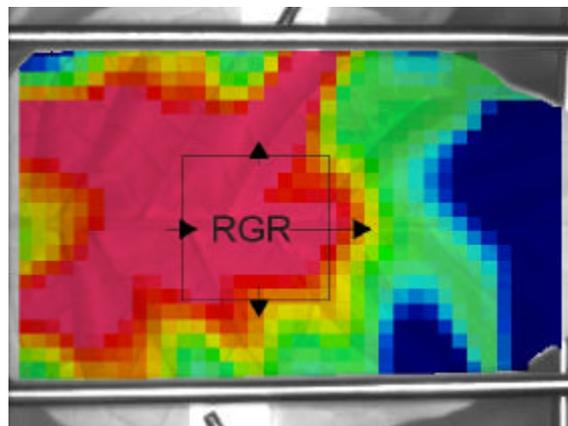
**Abb. 4.4 Geschwindigkeitsfelder in x- und y-Richtung**

Die Geschwindigkeiten in die entsprechende Richtung des Bild-Koordinatensystems sind farbcodiert dargestellt: Hohe Geschwindigkeiten sind rot, niedrige blau codiert. Die Aufnahmen geben Geschwindigkeitsfelder auf kleinen Blattregionen für einen kurzen Zeitabschnitt wider.

**Abb. 4.5 Wuchsratenverteilung auf einem Tabakblatt**

Dargestellt ist die zu den Geschwindigkeitsverteilungen von Abb. 4.4 zugehörige farbcodierte Wuchsratenverteilung. (rot: hohe, blau: niedrige Werte). Die relative Wuchsrate entspricht der Divergenz des Geschwindigkeitsfeldes ( $dv_x = v_x(2) - v_x(1)$ ;  $dv_y = v_y(2) - v_y(1)$ ):

$$RGR = \text{div}(v) = \frac{dv_x}{dx} + \frac{dv_y}{dy}$$



## 4.2 Technische Durchführung: Blattwachstum

Die Auswahl von Blättern aus einer zur Verfügung stehenden Pflanzenpopulation geschah aufgrund ihrer mittels einer Linealmessung bestimmten Wuchsrate. Für DISP-Messungen wurden ausschliesslich Blätter verwendet, die bei Start der Messung eine Wuchsrate von  $40 \pm 10$  %/d aufwiesen. Die durchgeführte Messprozedur zur Ermittlung von Wachstumsmustern umfasste acht verschiedene Schritte:

1. Fixieren der Blätter in der optischen Ebene
2. Aufbau des Bildaufnahmesystems
3. Aufnahme einer Bildsequenz
4. Begutachten der Sequenz
5. Abspeichern der Rohdaten
6. Auswertung
7. Interpretation und grafische Aufarbeitung der Resultate
8. Abspeichern der Resultate

### 1. Fixieren der Blätter in der optischen Ebene (Abb. 4.6)

Diese Fixierung ist notwendig, da eine auf- oder abwärts gerichtete Bewegung des Blattes von der DISP-Messung als Wachsen oder Schrumpfen interpretiert werden würde. Zu Artefakten führen auch lokale Änderungen des Winkels zwischen der Oberfläche eines Blattbereichs und der optischen Achse, die etwa durch Verkrümmungen oder Aufwellungen des Blattes hervorgerufen werden können.

Das Blatt wird an jedem Fixierungspunkt mit einem kleinen Streifen Gewebeband verstärkt (0,5 cm<sup>2</sup>). Bei Rizinus wird jede der acht Blattlappen-Spitzen fixiert (Abb. 4.6 links). Bei Tabak wird die Blattspitze sowie die Mitte des rechten und linken Blattrandes fixiert (Abb. 4.6 rechts). Der Stiel wird mit Parafilm an der Blatthalterungs-Ringkonstruktion fixiert, die wiederum an einem Laborstativ befestigt ist. Die Zugmassen (12 g schwere, wassergefüllte Kunststoffbehälter) werden über die Rollen der Ringkonstruktion geführt und mit den über Nylonfäden an ihnen befestigten Haarklammern an den Blattfixierungspunkten befestigt.

Falls die Sprossachse noch stark zuwächst, wird die Pflanze auf ein höhenverstellbares Stativ gestellt. Dadurch kann sie während längeren Aufnahmen abgesenkt werden und es kann ein Hochdrücken der Blatthalterung in Richtung Kamera durch die Elongation der Sprossachse verhindert werden.

Schließlich ist dafür Sorge zu tragen, dass im Verlauf der Aufnahme das Messblatt nicht von jüngeren Blättern oder von Blättern anderer Pflanzen überdeckt oder zur Seite gedrückt werden kann. Dies wird durch Fixierungen der potentiell störenden Blätter erreicht.



Abb. 4.6 DISP-Aufbau und Blattfixierung bei Aufnahme von Rizinus (links) bzw. Tabak (rechts)

## 2. Aufbau des Bildaufnahmesystems

Die Bildaufnahme wird mit Hilfe einer schwarz-weiß-CCD-Kamera (Sony XC 75) realisiert. Zentrales Bauteil einer CCD (charge-coupled device)-Kamera ist ein rechteckiger Chip (ca. 12\*16 mm), der das einfallende Licht in einer Pixelmatrix von 640 \* 480 Bildelementen (Pixel) aufnimmt. Die Kamera kann mit verschiedenen Objektiven und Zwischenringen versehen werden, so dass mit variablen Objektdistanzen und Bildausschnitten gearbeitet werden kann. Die meisten Aufnahmen wurden mit einem 25-mm-Objektiv (Blende 1,4-16; Schärfebereich 17 cm bis unendlich, Fa. Cosmicar), einer Objektdistanz von 30 cm und einer Bildgröße von 10 \* 7 cm aufgenommen. Die Kamera wird über ein in alle drei Raumrichtungen verstellbares Halterungssystem an X-förmige Präzisions-Aluminiumgussprofile (X-95-Profil, Fa. Linos, Göttingen) befestigt. An der Kamera befindet sich ein System von sechs separat in ihrem Abstrahlungswinkel verstellbaren, mit je 15 Dioden ausgestatteten, Infrarot-Beleuchtungssystemen (940 nm, Fa. Conrad Electronic, Hirschau). Durch Verstellen der Abstrahlwinkel kann die Bildhelligkeit optimiert und homogen eingerichtet werden.

## 3. Aufnahme einer Bildsequenz

Nach erfolgter Positionierung von Blatt und Kamerasystem wird die Kamera mit dem Rechner verbunden und der Bildverarbeitungs-Interpreter ‚Heurisko‘ gestartet. Durch Aufruf des ‚Workspaces‘ (Unterprogramm) ‚**Bildeinrichtung**‘ erhält man eine Livebildanzeige auf dem Monitor des Rechners, mit deren Hilfe das Bild in Schärfe und Helligkeit optimiert wird (Abb. 4.7).

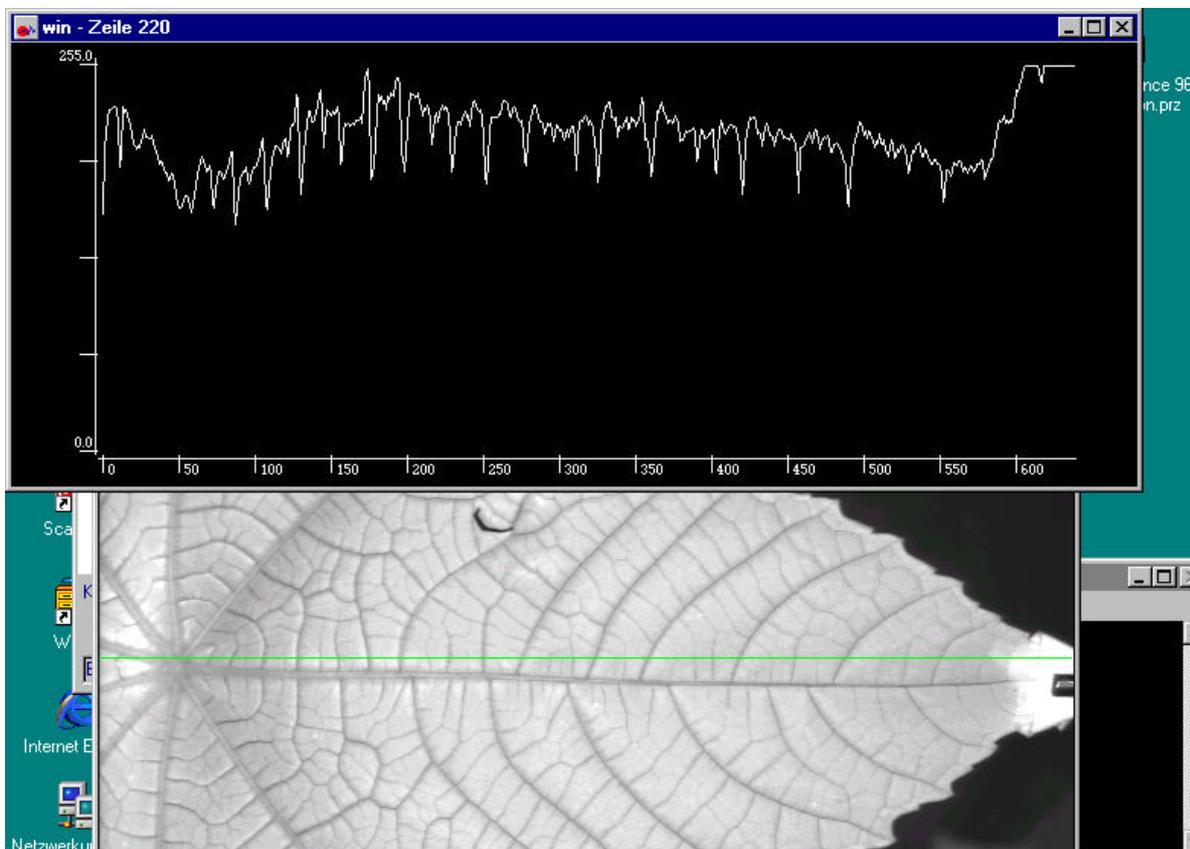


Abb. 4.7 Grauwert-Zeilenprofil eines Rizinusblattes

Die mittlere Helligkeit der Intercostalfelder wird auf etwa 190 Grauwerte, keinesfalls aber über 220 Grauwerte, einreguliert. Adern erscheinen stets dunkler.

Nach erfolgter Bildeinrichtung wird das optische System durch Aufnahme eines auf dem Blatt positionierten Maßstabs kalibriert. Dies ermöglicht die Umrechnung von Pixel-Einheiten in cm. Ebenso wird das Blatt vor Beginn (und am Ende) der DISP-Messung mit einem Lineal in Länge und Breite vermessen. Diese Vermessung dient der Verifikation der vom DISP-System bestimmten Gesamtwachstumsrate des Blattes.

Nun wird der Workspace ‚*Acquisition*‘ gestartet (Abb. 4.8). Der Experimentator wird aufgefordert, die erforderlichen Parameter der Sequenz (Name der Sequenz, Bildanzahl, zeitlicher Abstand zwischen zwei Bildern,...) einzugeben; die Aufnahme beginnt.

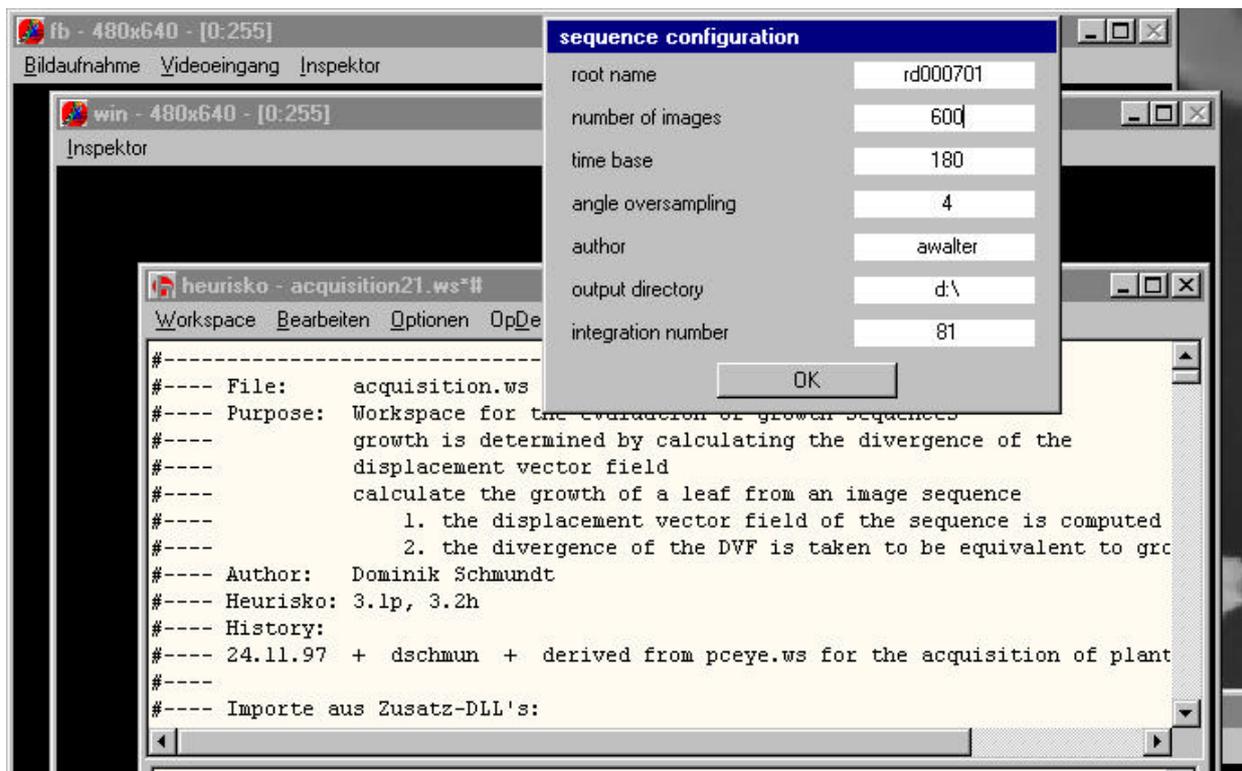


Abb. 4.8 Eingabemaske des Heurisko-Workspaces ‚*Acquisition*‘

#### 4. Begutachten der Sequenz

Nach dem Ende der Bildaufnahme ist es notwendig, die Sequenz zu begutachten. Dies geschieht mit Hilfe des Programms ACDSee (Fa. ACDSee Systems, Victoria, Kanada). Ein Zeitrafferfilm wird durch Auswahl jedes zehnten Bildes hergestellt und angeschaut, um zu entscheiden, ob die Sequenz einer weiteren Auswertung zugeführt werden kann oder nicht. Bisweilen treten trotz getroffener Sicherheitsvorkehrungen Probleme mit störenden Blättern auf, die das Messblatt zeitweilig überdecken. Weitere Störquellen sind abrutschende Befestigungsklammern der Zugmassen sowie (höchst selten) umherirrende Fliegen.

### 5. Abspeichern der Rohdaten

Die Rohdaten werden auf CD gebrannt; die Parameter der Bildsequenz und Besonderheiten der Aufnahme im Laborbuch protokolliert.

### 6. Auswertung

Auch die Auswertung der Daten geschieht mit Hilfe spezieller Heurisko-Workspaces. Zunächst berechnet der Workspace *„Evaluation“* in der in Kap. 4.1 beschriebenen Weise das Geschwindigkeitsfeld der Bildsequenz (Abb. 4.9). Mit dem zur Verfügung stehenden Rechner (Pentium III, 450 MHz, 128 MB RAM) werden etwa 30 Bilder pro Minute bearbeitet; eine 24-h-Sequenz von 480 Bildern Länge wird also in etwa 16 min ausgewertet.

Danach wird der Workspace *„Compact“* auf die Resultate angewendet (etwa zehnmal schneller als *„Evaluation“*), um die Datenmenge der Resultate zu komprimieren.

Schließlich wird mit Hilfe des Workspaces *„Display“* eine farbcodierte Anzeige der Resultate durchgeführt (Abb. 4.10).

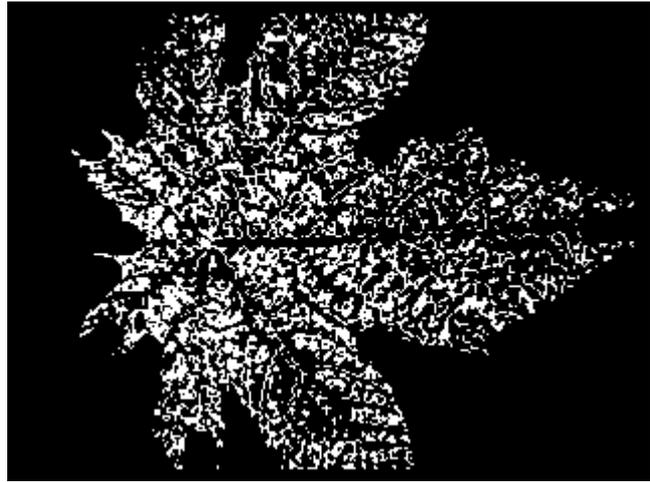


Abb. 4.9 Punktmaske detektierter Geschwindigkeiten

Die weissen Punkte stehen für Stellen, an denen der Workspace *„Evaluation“* im zugrunde liegenden Zeitintervall eine Geschwindigkeit bestimmen konnte.

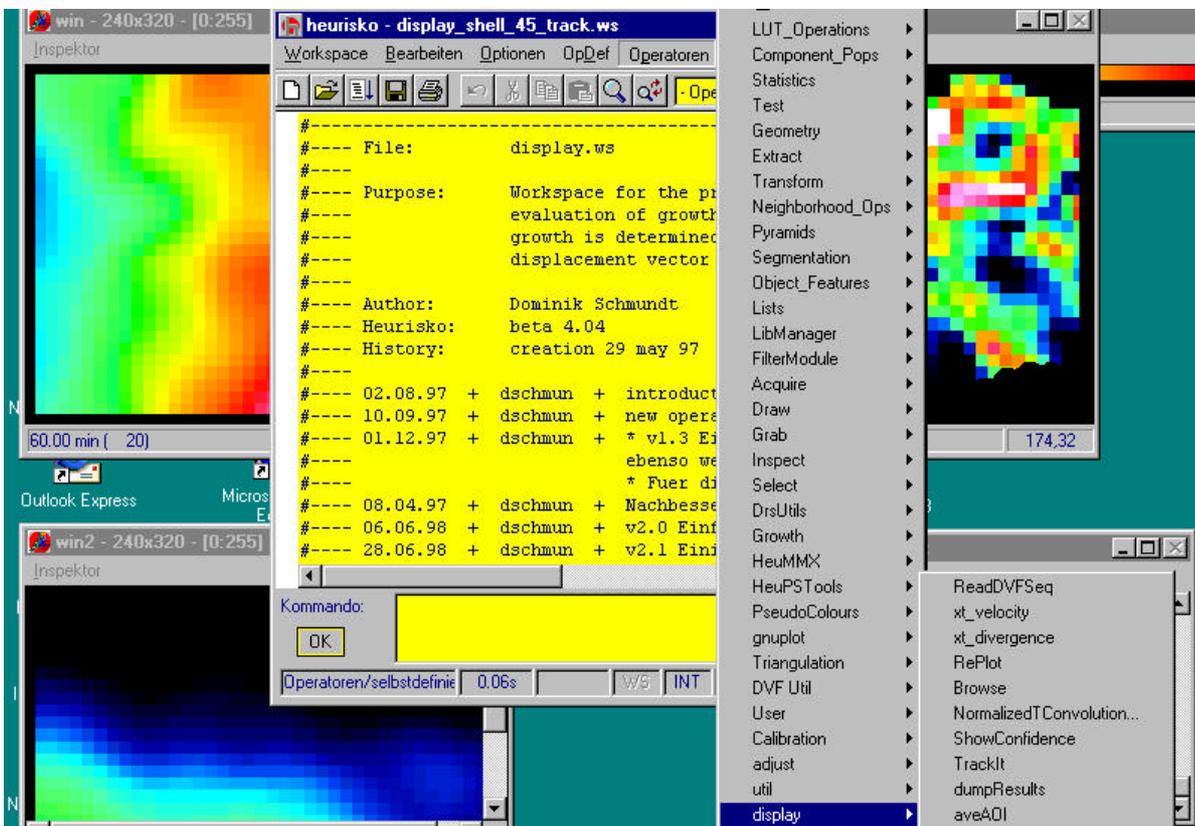


Abb. 4.10 *„Display“*-Workspace zur Generierung und Darstellung von Zeitreihen der RGR-Verteilung

In diesem Unterprogramm werden auch die Wachsraten berechnet sowie Zeitreihen von Wachsraten mit der Möglichkeit der zeitlichen und räumlichen Mittelung über Rechteckflächen hinweg ausgegeben.

Zur Geschwindigkeitsbestimmung wurden für die Zwecke der vorliegenden Arbeit raum-zeitliche Umgebungen von  $7 \times 7$  Pixeln und 5 Bildern gewählt. In der auszuwertenden Bildsequenz erfolgte die Berechnung der Geschwindigkeiten sequentiell für jedes Pixel. Typischerweise führte die Orientierungsberechnung für 20 bis 30 % aller Pixel-Umgebungen zu einer erfolgreichen Geschwindigkeitsbestimmung.

### 7. Interpretation und grafische Aufarbeitung der Resultate

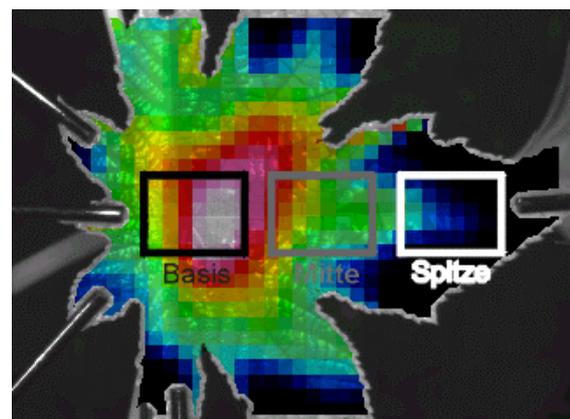
Farbcodierte Bilder der Wachstumsverteilung liefern jeweils nur eine Momentaufnahme des Geschehens. Die Kombination von räumlicher und zeitlicher Verteilung des Wachstumsverlaufs erhält man, indem man die Momentaufnahmen zu Filmen aneinanderreihet (im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Filme aus farbcodierten Wachstumskarten erstellt), oder indem man Zeitreihen von verschiedenen Positionen auf dem Blatt kombiniert. Für eine übersichtliche Darstellung der Resultate (siehe Kap. 7) darf die Anzahl der hierfür ausgesuchten Positionen jedoch nicht zu groß sein. Eine einfache Darstellung der Wachstumsverteilung entlang der Blattmittellrippe gelingt, indem verschiedene Rechtecke an Basis, Mitte und Spitze des Blattes ausgewählt und von diesen Rechtecken die räumlich gemittelte Zeitreihe der Wachsrates ausgegeben wird (Abb. 4.11).

### 8. Abspeichern der Resultate

Jede Auswertung wird mit dem Abspeichern von mindestens vier Zeitreihen abgeschlossen: Den Zeitreihen der mittleren Wachsrates des Blattes, der Blattbasis, Blattmitte und Blattspitze.

#### Abb. 4.11 Flächenauswahl zur Ermittlung der Wachstumsverteilung bei einem Rizinusblatt

Die Auswahl mehrerer disjunkter Flächen entlang der Mittelrippe stellt die einfachste Möglichkeit dar, um Zeitreihen von Wachsrates verschiedener Blattbereiche zu einem raum-zeitlichen Bild des Wachstums zu kombinieren.



### Streifenlichtprojektor

Durch den Einsatz von strukturiertem Licht gelang es in ersten Versuchen im Rahmen der vorliegenden Arbeit, Blattbewegungen und Wachsrates von einigen frei wachsenden Rizinusblättern dreidimensional zu erfassen und mit Hilfe von Tiefenkarten eine Fehlerabschätzung der (zweidimensional arbeitenden) oben vorgestellten DISP-Methode durchzuführen (Kap. 7.2.3).

## Messprinzip

Ein **Projektor** wirft nacheinander einige Muster aus jeweils zueinander parallelen, gleich breiten Lichtstreifen auf ein Messobjekt. Die verschiedenen Muster bestehen aus verschiedenen breiten Streifen. Eine **CCD-Kamera** nimmt bei jeder Streifenprojektion ein Bild des Messobjekts auf. Eine Analyse des dabei entstehenden zeitlichen Grauwertmusters ermöglicht die exakte Zuordnung von Positionen und damit wiederum eine Rekonstruktion der dreidimensionalen Oberflächenstruktur mittels geometrischer Triangulation: Es entsteht eine **Tiefenkarte** der Entfernung jedes Bildpunktes von der CCD-Kamera. Wichtig ist hierfür eine vorherige Kalibration des optischen Systems. Dies wird durch eine Serie von Aufnahmen realisiert, bei denen die Streifen einem flachen, mit Markierungen versehenen Kalibrierkörper aufprojiziert werden, der in mehreren definierten Abständen von der Kamera positioniert wird.

Zusätzlich entsteht für jeden Messzeitpunkt ein **Grauwertbild der Oberfläche**, indem die Helligkeiten der Licht- und der Schattenstreifen nach Aufnahme der ‚gestreiften‘ Einzelbilder herausgemittelt werden und nur die natürlicherweise existierenden Grauwertkontraste der Oberfläche übrig bleiben.

Durch **Iteration der Streifenprojektionssequenz** entstehen schliesslich zwei Bildsequenzen (für Tiefen und Grauwerte).

## Technische Durchführung:

In der Plexikammer wurden sowohl frei wachsende (Abb. 4.12) als auch in die horizontale fixierte Rizinusblätter aufgenommen. Anhand der Tiefenkarten der fixierten Blätter konnte die Veränderung der dreidimensionalen Struktur des Blattes und die sich daraus ergebenden Messfehler für die DISP-Methode errechnet werden.

Mit Hilfe der Kombination aus Sequenzen von Tiefenkarten und Grauwert-Sequenzen ist es prinzipiell möglich, das Wachstum frei beweglicher Blätter zu vermessen (Dissertation H. Spies, in Vorbereitung).

### Abb. 4.12 Streifenlichtprojektor-Aufnahme eines Rizinusblattes

Die Krümmung des Blattes am Ende der Nachtphase bedingt eine starke Verformung des aufprojizierten Streifenmusters. Die Analyse der Krümmung und der Breite der Streifen liefert ein Maß für die räumliche Orientierung des Blattes



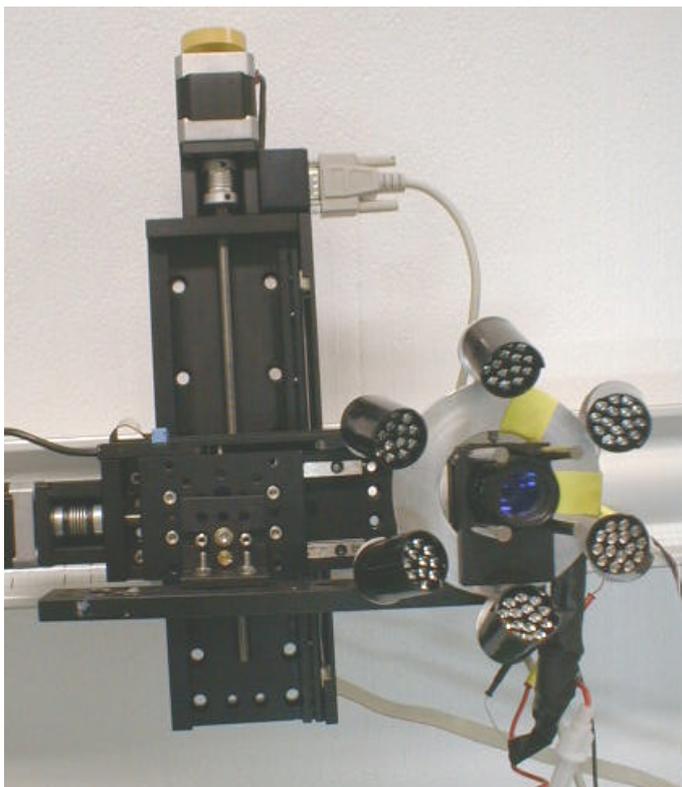
### 4.3 Technische Durchführung: Wurzelwachstum

Die automatische Bestimmung von raum-zeitlichen Wachstumsverteilungen entlang Wurzelspitzen geschieht prinzipiell in der gleichen Art wie für Blätter. Es ergeben sich jedoch einige Änderungen im DISP-Aufnahme- und Auswerteverfahren, auf die nachfolgend eingegangen wird.

#### Aufbau

Die CCD-Kamera wurde inklusive der Beleuchtungsmodule an ein X-95-Profil befestigt, das denselben Inklinationswinkel wie die Rhizotron-Basisplatte aufwies (siehe Kap. 2.2). Typischerweise wurde auch hier ein 25-mm-Objektiv verwendet, jedoch mit einem 5-mm-Zwischenring, sodass ein Bildausschnitt von etwa 18\*13 mm in einer Objektdistanz von 9 cm beobachtet werden konnte. Da die Wurzelwachstumszone von Mais einen Bereich von 10 bis maximal 12 mm überdeckt und die Wurzeln sich mit 2 bis 3 mm pro Stunde verlängern, bedeutet dies, dass die komplette Wurzelwachstumszone mit dieser Konfiguration nicht länger als 2 bis 4 Stunden beobachtbar ist.

Dieses Problem wurde im Zuge einer physikalischen Diplomarbeit gelöst (R. Küsters, in Vorbereitung), die sich mit automatischen Nachführungseinrichtungen zur Bildaufnahme beweglicher Objekte beschäftigte. Es wurde ein sogenannter ‚Wurzelfolger‘ konstruiert. Dieses Gerät besteht aus zwei zueinander gekreuzten Verschiebetischen, an denen eine CCD-Kamera angebracht ist (Abb. 4.13). Das Gerät ist am X-95-Profil des Durchfluss-Rhizotrons befestigt. Nähert sich die Wurzelspitze während der laufenden Aufnahme dem Bildrand, so wird die Kameraposition automatisch so verschoben, dass die Wurzelspitze wieder näher an der Bildmitte zu liegen kommt.



Mit Hilfe dieser Zusatzeinrichtung, die gegen Ende der vorliegenden Arbeit zur Verfügung stand, konnten kontinuierliche Maiswurzelaufnahmen von mehreren Tagen Dauer realisiert werden.

**Abb. 4.13 Wurzelfolger**

Kamera und Beleuchtung sind an zwei gekreuzten Verschiebetischen befestigt, die das System mit der wachsenden Wurzelspitze mitbewegen. Der Wurzelfolger wird am üblichen X-95-Profil-Aufbau des Durchfluss-Rhizotrons (Abb. 2.1 und Abb. 2.2) befestigt.

## Bildaufnahme

Die Aufnahme einer Bildsequenz wurde durch den Workspace ‚*Acquisition\_Wurzeltracker*‘ gesteuert. Bilder wurden typischerweise mit Zeitabständen von einer Minute aufgenommen. Neue interaktiv einzugebende Parameter des Algorithmus sind die Mindestdistanz der Wurzelspitze vom Bildrand sowie die Verschiebung der Kameraposition bei Erreichen dieser Position.

Im nahen Infrarot zeigen Wurzelspitzen bei Auflicht-Beleuchtung einen vergleichbaren Kontrast wie Blätter (Abb. 4.14; vergleiche Rizinusblatt Abb. 4.7). Dieser ist über die gesamte Länge der Wachstumszone hinweg deutlich ausgeprägt, sodass die Maiswurzel einer Wachstumsbestimmung mit Hilfe der DISP-Techniken sehr gut zugänglich ist.

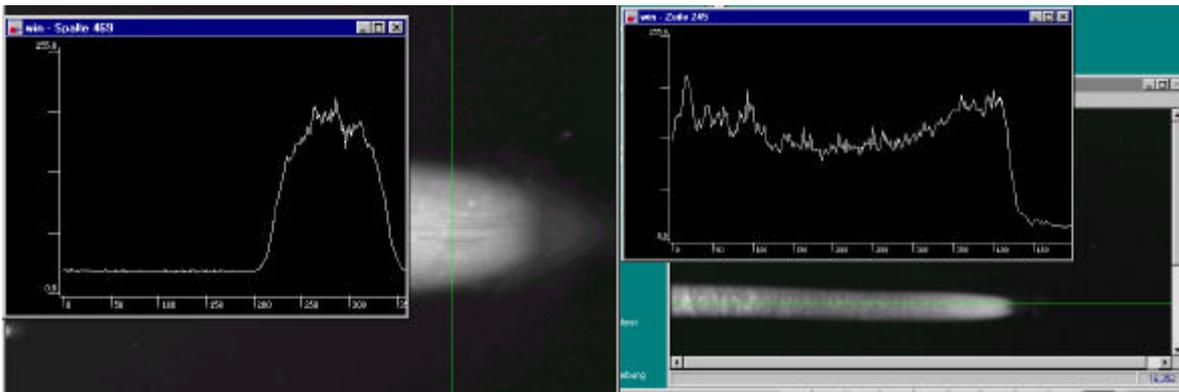


Abb. 4.14 Spaltenprofil (links) und Zeilenprofil (rechts) der Grauwertverteilung einer Maiswurzel

## Auswertung einer Sequenz (Abb. 4.15)

Die Auswertung einer Bildsequenz erfolgte ebenfalls mit den Workspaces ‚*Evaluation*‘ sowie ‚*Compact*‘; der Workspace ‚*Display*‘ wurde jedoch zeitgleich mit der Einführung des Wurzeltrackers auf die Erfordernisse der Wurzelmessung optimiert:

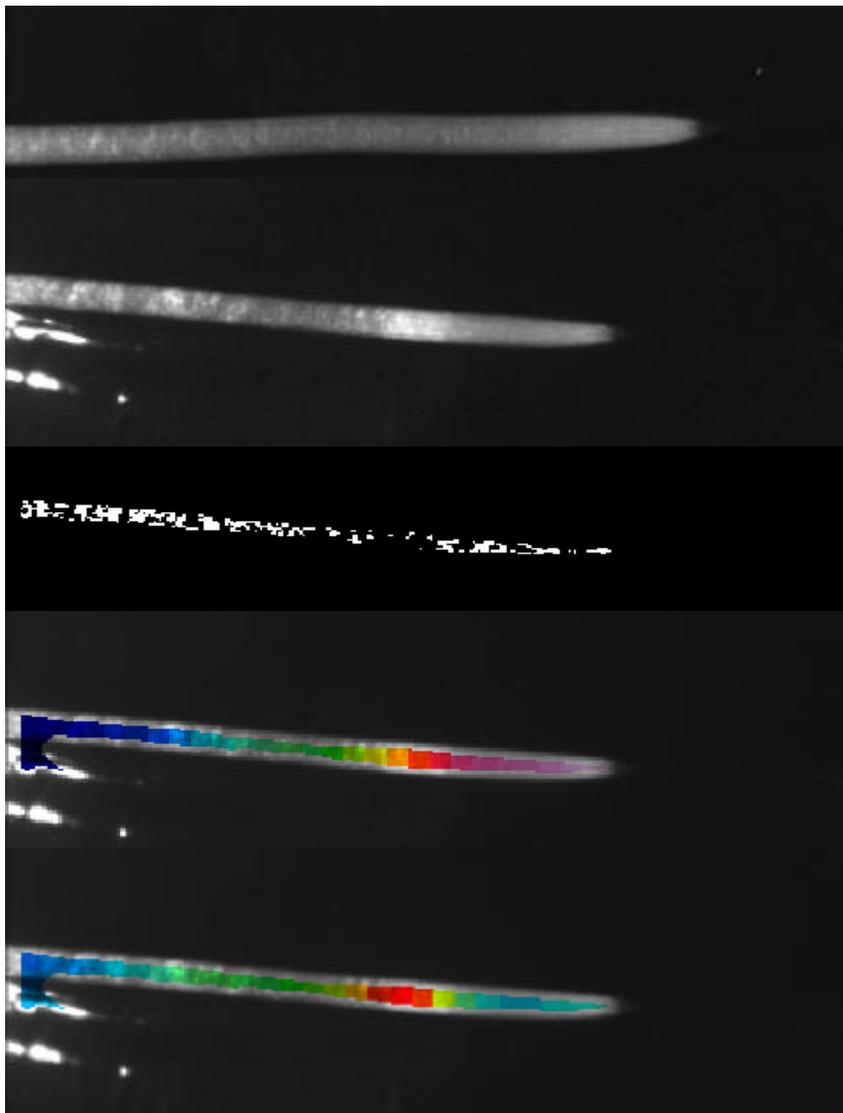
Mit Hilfe einer Zusatzfunktion lassen sich im Wurzel-Display-Algorithmus **gemittelte Profile der  $v_x$ -Verteilung** entlang der Wurzelwachstumszone automatisch generieren. Der Algorithmus definiert dabei den ersten Punkt des Bildes, an dem er eine Geschwindigkeit registrieren konnte, als Wurzelspitze, mittelt über alle  $v_x$ -Geschwindigkeiten der in derselben Bildspalte darüber und darunter liegenden Pixel und fährt iterativ nach hinten mit diesem Mittelungsverfahren fort.

So lange die Wurzel gerade und parallel zur x-Achse des Bildes wächst, erhält man mittels dieser Funktion die reale axiale Geschwindigkeitsverteilung innerhalb der Wurzelwachstumszone; bei abweichender Wachstumsrichtung ergeben sich jedoch Artefakte: Sobald die Wurzel nicht mehr in X-Richtung des Bildes wächst, müsste eigentlich die Y-Komponente der Geschwindigkeit mit berücksichtigt werden, um die axiale Geschwindigkeit zu berechnen. In diesem Fall müsste dann jedoch über Pixel senkrecht zur axialen Richtung und nicht in der Y-Richtung des Bildes gemittelt werden. Diese Mittelung kann erst durchgeführt werden, wenn ein stabiles Verfahren zur automatisierten Auffindung der Mittellinie der Wurzel vorliegt (Dissertation N. Kirchgessner, in Vorbereitung).

Die axiale ( $v_x$ -)Geschwindigkeits-Verteilung wird bei Aufruf einer entsprechenden Funktion differenziert und liefert so eine **Wuchsratenverteilung** entlang der Wachstumszone, die nicht auf Basis von Fitprozessen an eine vorgegebene Funktion (wie in Kap. 4.2) entstanden ist.

Mit Hilfe einer weiteren Funktion lässt sich eine beliebige Anzahl der so **erhaltenen  $v_x$ - und RGR-Verteilungen zeitlich mitteln**; bei Aufruf dieser Funktion wird für jedes Pixel entlang der Wachstumszone ein Mittelwert sowie eine Standardabweichung der entsprechenden  $v_x$ - bzw. RGR-Werte ausgegeben. Die Pixelwerte werden dabei auf den Abstand zur Wurzelspitze bezogen und nicht auf ihre Lage im Bild-Koordinatensystem.

Die Mittelwertbildung selbst geschieht in einem iterativen Verfahren: Ausreisser, die mehr als fünf Standardabweichungen vom berechneten Mittelwert aller Messungen entfernt liegen, werden verworfen; der Mittelwert und die Standardabweichung wird neu berechnet. Dieses Verfahren wird insgesamt dreimal wiederholt. Dadurch fallen unter anderem Artefakt-Messungen direkt vor und nach dem Verschieben der Kameraposition automatisch heraus.



**Abb. 4.15 DISP-  
Maiswurzeltaufnahmen**

Von oben nach unten:

- Infrarot-Originalbild A
- Infrarot-Originalbild B
- Bildmaske der zuverlässig ermittelten Geschwindigkeiten der zeitlichen Umgebung von Originalbild B
- Farbcodierte  $V_x$ -Geschwindigkeitsverteilung der zeitlichen Umgebung von Originalbild B (violett: hohe Geschwindigkeit; blau: niedrige Geschwindigkeit)
- Farbcodierte REGR-Verteilung der zeitlichen Umgebung von Originalbild B (rot: hohe Wuchsrates; blau: niedrige Wuchsrates)

## 5 Inhaltsstoffbestimmungen

### 5.1 Ethanolische Extraktion

Lösliche Kohlenhydrate (Glucose, Fructose und Saccharose), Aminosäuren und Anionen wurden in ethanolischen Extrakten von Blattscheiben- und Wurzelsegment-Material bestimmt. Diese Extrakte wurden wie folgt hergestellt.

Das gefrorene Pflanzenmaterial wurde in ein 1,5-ml-Safelock-E-Cup überführt, das sich im 80-°C-Heizblock befand und mit 400 µl 80-%igem EtOH (mit 2 mM HEPES) gefüllt war. Mit geschlossenem Deckel wurde für 20 min extrahiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der auf Eis abgekühlte Überstand in ein entsprechend nummeriertes 1,5-ml-E-Cup überführt. Diese Prozedur wurde so lange wiederholt, bis auch das Blatt-Material weitgehend farblos war. Dies war nach vier weiteren Schritten mit folgenden Mengen EtOH der Fall:

200 µl 50 %iger EtOH (2 mM HEPES)

200 µl 50 %iger EtOH (2 mM HEPES)

100 µl 80 %iger EtOH (2 mM HEPES)

100 µl 80 %iger EtOH (2 mM HEPES)

Zur Extraktion der Wurzelsegmente wurden jeweils nur die halben Mengen eingesetzt. Die vereinigten Teilextrakte wurden für 30 s bei 14000 U/min zentrifugiert, um eventuell im Deckel befindliche Tröpfchen mit dem Extrakt zu vereinigen. Schließlich wurde entsprechend der Markierung auf dem E-Cup mit 80 %igem EtOH auf 1 ml aufgefüllt. Der Extrakt und die für die Stärkebestimmung ebenfalls in 1,5-ml-E-Cups verbliebenen Blattscheiben konnten nun bei -20 °C gelagert werden.

### 5.2 Lösliche Kohlenhydrate

Die Bestimmung der Kohlenhydrate erfolgte **photometrisch bei 334 nm** (Spektrophotometer Uvikon 930, Firma Kontron, Eching) durch einen **gekoppelten Enzym-Test**, bei dem die Umsetzung von NADP zu NADPH<sub>2</sub> quantitativ verfolgt wurde (Jones et al. 1977). Vier Enzyme wurden dabei sukzessive zugegeben:

1. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
2. Hexokinase
3. Phosphoglucoisomerase
4. Invertase

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase katalysiert als Startenzym die Reaktion von Glucose-6-Phosphat +  $\text{NADP}^+$  zu 6-Phosphoglukonat +  $\text{NADPH}_2$ .

Nach ca. 2 min kann Hexokinase zugegeben werden. Sie katalysiert die Umsetzung von Glucose in Glucose-6-Phosphat und von Fructose in Fructose-6-Phosphat. Glucose-6-Phosphat wird in diesem Schritt mit Hilfe des ersten Enzyms nachgewiesen: Pro vorhandenem Molekül Glucose wird dabei ein Molekül  $\text{NADP}$  in  $\text{NADPH}_2$  umgewandelt, was sich in einer charakteristischen Erhöhung des Wertes der optischen Dichte (OD) widerspiegelt:

**1  $\mu\text{mol NADPH}_2$  / ml entspricht 6,22 OD**

Nachdem die optische Dichte auf einen neuen konstanten Wert angestiegen ist, wird Phosphoglucose-Isomerase zugegeben. Sie setzt das zuvor gebildete Fructose-6-Phosphat in Glucose-6-Phosphat um, das dann wiederum über die bereits zugegebenen Enzyme nachgewiesen wird.

Schließlich kann Invertase zugegeben werden, sobald die optische Dichte wieder einen konstanten Wert erreicht hat. Dadurch wird die in der Küvette befindliche Saccharose in Glucose und Fructose gespalten; diese werden von den in der Lösung befindlichen beiden vorher zugegebenen Enzymen wie gehabt verarbeitet und quantitativ erfasst. Man beachte, dass ein Saccharosemolekül die Bildung von zwei Molekülen  $\text{NADPH}_2$  verursacht.

Die Enzyme (Fa. Sigma, München) wurden wie folgt aus Stammlösungen angesetzt:

1. **Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase** aus Hefe: 40  $\mu\text{l}$  (1,4 Units) wurden bei 14000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand, der aus Ammoniumsulfat zur Lagerung des Enzyms besteht, wurde verworfen. Das Pellet wurde in 100  $\mu\text{l}$  Trispuffer (100 mM; pH 8,1; 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) wieder aufgenommen und auf Eis gestellt.
2. **Hexokinase:** Hiervon wurden 60  $\mu\text{l}$  (3 Units) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100  $\mu\text{l}$  Trispuffer aufgenommen.
3. **Phosphoglucoisomerase:** 30  $\mu\text{l}$  (5 Units) wurden abzentrifugiert; das Pellet wurde ebenfalls in 100  $\mu\text{l}$  Trispuffer aufgenommen.
4. **Invertase:** Ein 1,5-ml-E-Cup wurde zu einem Viertel mit kristallisierter Invertase gefüllt (etwa 5 Units). Diese wurde in 100  $\mu\text{l}$  Imidazolpuffer aufgenommen.

Folgender Ansatz wurde zur Messung jeweils in eine Küvette pipettiert:

- 730  $\mu\text{l}$  100 mM Imidazolpuffer, pH 6,9 (mit 5 mM  $\text{MgCl}_2$ )
- 10  $\mu\text{l}$  ATP-Lösung (20 mg/ml)
- 10  $\mu\text{l}$  NADP-Lösung (12 mg/ml)
- 50  $\mu\text{l}$  Extrakt (nach dem Auftauen 3 min bei 14000 U/min abzentrifugiert)
- 2  $\mu\text{l}$  Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Lösung

Während der Messung wurden je 2 µl der Enzyme in der oben beschriebenen Reihenfolge mit Hilfe eines Vielfachspatels gleichzeitig in alle fünf verwendeten Küvetten zugegeben.

Nachdem die Aufzeichnung der Werte der optischen Dichte beendet war, wurden die Differenzen zwischen den Plateauwerten am Ende der enzymatischen Reaktionen mit Hilfe des Programms LIKON (L. Hill) errechnet. Anhand dieser Werte ( $\Delta OD$  in mUnits) waren die Hexosekonzentrationen folgendermaßen zu berechnen:

$$\text{Hexosen}[\text{mmol} / \text{gFG}] = \frac{\Delta OD[\text{mU}] / 1000 \cdot 0,8 \text{ml} \cdot 1000[\text{ml}] / 50[\text{ml}] \cdot 1000[\text{mg} / \text{g}]}{6,22[\text{ml} / \text{mmol}] \cdot \text{Masse pflanzlichen Materials}[\text{mg}]}$$

### 5.3 Stärke

Der quantitative Nachweis von Stärke erfolgte an Blattmaterial, das seit der ethanolischen Extraktion bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert worden war.

Die Stärke wurde durch ein Gemisch von Amylase und Amyloglucosidase ('Inkubationspuffer', siehe unten) enzymatisch in Glucose gespalten. Diese wurde wie im vorigen Abschnitt beschrieben durch die ersten beiden Enzyme des **gekoppelten Enzym-Ansatzes** photometrisch qualitativ nachgewiesen. In der Küvette fand bei dieser Messung Tris- anstelle von Imidazolpuffer Verwendung, da dessen pH-Wert von 8,1 die Wirkung der ersten beiden Enzyme stärker begünstigt als pH 6,9 des Imidazolpuffers.

#### Trispuffer:

100 mM Tris, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 8,1 wurde mit ca. 3 ml  $\text{HCl}_{\text{konz}}$  auf 500 ml Puffer eingestellt

#### Inkubationspuffer:

50 mM Na-Acetat pH 4,9 mit 1,4 U Amyloglucosidase und 1 U  $\alpha$ -Amylase

Zur Herstellung von 25 ml dieses Puffers wurden eingesetzt:

- 1,25 mmol NaAc
- 7 Tropfen 50 %ige Essigsäure
- 500 µl Amyloglucosidase
- 5 µl  $\alpha$ -Amylase

Die Enzyme wurden wieder abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im Puffer gelöst (löst sich nur schwer; das E-Cup muß ca. zehnmal gefüllt und geleert werden).

Die Blattscheiben wurden in 1 ml bidestilliertem Wasser gewaschen und im selben E-Cup gemörsert, in dem sie bisher aufbewahrt wurden:

300 µl bidestilliertes Wasser wurde dazupipettiert und mit dem konischen Aufsatz einer Standbohrmaschine bei geringer Drehzahl zwischen dem rotierenden Aufsatz und der Wand des 1,5-ml-E-Cups durch kräftiges Anpressen zermahlen. Die nach dem Mahlen am Aufsatz verbliebenen Blattreste wurden mit weiteren 200 µl bidestilliertem Wasser abgespült und mit den 300 µl Blattsuspension im E-Cup vereinigt.

Die 500-µl-Suspension wurde für mindestens 2 h bei 121 °C autoklaviert.

Nach dem Abkühlen wurde ein Aliquot von 50 µl mit schräg abgeschnittener Pipettenspitze der zuvor gut geschüttelten Suspension (Vortexer) entnommen. Das Aliquot wurde mit 450 µl Inkubationspuffer versetzt, gut gemischt und über Nacht für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Mit 50 µl dieses Extraktes erfolgte nun wie oben beschrieben die Glucosebestimmung.

Der Stärkegehalt der Probe wurde in der Einheit µmol Hexosen pro g Frischgewicht berechnet:

$$\text{Hexosen}[\text{mmol} / \text{gFG}] = \frac{\Delta OD[\text{mU}] / 1000 \cdot 0,8 \text{ml} \cdot (500[\text{ml}] / 50[\text{ml}])^2 \cdot 1000[\text{mg} / \text{g}]}{6,22[\text{ml} / \text{mmol}] \cdot \text{Masse pflanzlichen Materials}[\text{mg}]}$$

Man beachte den geänderten Verdünnungsfaktor: Es wurde nicht von 1000 µl EtOH-Extrakt, sondern von 500 µl Blattsuspension ausgegangen, von der nochmals 50 µl zum Stärkeverdau entnommen wurden.

## 5.4 Aminosäuren

Die Aminosäuren werden mittels **HPLC** nach Derivatisierung mit o-Phtalsäuredialdehyd (OPA) an der primären Aminogruppe zu einer fluoreszierenden Verbindung am Fluoreszenzdetektor (SFM, Fa. Kontron, Eching) nachgewiesen. Die Derivatisierung erfolgt mittels eines automatischen Probengebers (465, Fa. Kontron, Eching) durch Zugabe von 35 µl Derivatisierungsreagenz (siehe unten) auf 35 µl Probe. Die Probe besteht aus im Verhältnis 1:1 mit bidestilliertem Wasser versetztem ethanolischen Extrakt. Nach Ablauf von exakt einer Minute Reaktionszeit wurden 20 µl der derivatisierten Probe injiziert.

Die einzelnen Aminosäuren werden nach ihrer Polarität aufgetrennt, indem die Polarität des Laufmittelgemischs mit der Zeit verändert wird: Laufmittel B (siehe unten) ist unpolarer als Laufmittel A (siehe unten) und wird diesem in immer höherem Anteil dazugemischt. Dadurch werden zunächst die polaren, später die unpolaren Aminosäuren eluiert und detektiert.

Die vom Fluorometer erfaßten Fluoreszenzsignale (Excitation: 330 nm; Emission: 450 nm) wurden mit dem Datenverarbeitungssystem D 450 (Fa. Kontron, Eching) ausgewertet.

**Derivatisierungsreagenz:**

Mischung von 5 % (m/v) OPA in Methanol, 0,8 M Boratpuffer (mit KOH auf pH 10,4 eingestellt) und 3-Mercaptopropionsäure im Verhältnis von 10:90:1 (v,v,v).

**Trennbedingungen der Aminosäuren-HPLC:**

Laufmittel

**A:** 12 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 6,8 (mit 40 %iger H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> eingestellt); 0,24 % THF

**B:** 46,73 % 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 6,8 (40 %ige H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>); 32,71 % Methanol; 20,56 % Acetonitril

Durchfluß: 0,8 ml/min

Gradient:	0 - 2 min:	0 % Laufmittel B
	2 - 11 min:	lineare Erhöhung auf 10 % B
	11 - 17,25 min:	10 % B
	17,25 - 27,3 min:	lineare Erhöhung auf 50 % B
	27,3 - 38,3 min:	lineare Erhöhung auf 60 % B
	38,3 - 44,3 min:	lineare Erhöhung auf 100 % B
	44,3 - 46,3 min:	100 % B
	46,3 - 48 min:	lineare Absenkung auf 0 % B
	48 - 60 min:	0 % Laufmittel B

Trennsäule: Hypersil-ODS (3 µm; 150\*4,6 mm, Fa. Knauer, Berlin)

**5.5 Anionen und Kationen**

Die Konzentrationen von Anionen und Kationen wurden mittels **Kapillarelektrophorese** (Spectra Phoresis 1000, Fa. ThermoSeparation, Darmstadt-Arheiligen) nach Bazzanella et al. (1997) analysiert. Das Analyseprinzip basiert auf unterschiedlichen Laufzeiten der verschiedenen Ionenspezies durch eine Glaskapillare hindurch, an der eine Hochspannung anliegt.

Zur Analyse von **Anionen** fanden die zuvor hergestellten ethanolischen Extrakte Verwendung. Der Elektrolyt zur Anionenbestimmung enthielt 7,5 mM Salicylsäure, 15 mM Trispuffer, 500 µM DoTAOH sowie 0,6 mM Ca(OH)<sub>2</sub>. Die Trennung wurde in einer Glaskapillare (innerer Durchmesser 75 µm, Länge 76 cm) bei 28 kV und einer Kapillartemperatur von 25 °C mit 3-5 Minuten Injektionszeit durchgeführt.

Die Analyse von **Kationen** erfolgte an separat gesammeltem Blattmaterial, das in vier Schritten extrahiert wurde (Werte in Klammern geben die für die Wurzeln verwendeten Mengen an):

1. In einem 2-ml-E-Cup wurde das Material mit 400 (150)  $\mu\text{l}$  bidestilliertem Wasser homogenisiert; das Homogenisierungspistill wurde mit 2\* 400 (150)  $\mu\text{l}$  bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Suspension wurde im Thermoblock für 1 h bei 95 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Extrakt wurde üblicherweise 1:10 verdünnt und gemessen.
2. Das Pellet wurde mit 600 (400)  $\mu\text{l}$  NaCl (1 M) versetzt, 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt und abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde anschließend dreimal mit je 100  $\mu\text{l}$  bidestilliertem Wasser gewaschen; die Überstände vereinigt und in einer Verdünnung von 1:50 gemessen.
3. Im nächsten Schritt wurde das Material mit 600 (300)  $\mu\text{l}$  2 %iger Essigsäure versetzt und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach abzentrifugieren wurde es dreimal mit je 100  $\mu\text{l}$  bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt und in einer Verdünnung von 1:10 gemessen.
4. Im letzten Schritt wurde das Material mit 600 (300)  $\mu\text{l}$  5 %iger HCl versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach abzentrifugieren wurde es dreimal mit je 100  $\mu\text{l}$  bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt, ein Aliquot von 100  $\mu\text{l}$  wurde bei 80 °C zur Trockne eingedunstet und in bidestilliertem Wasser wieder aufgenommen. Die Messung erfolgte in einer Verdünnung von 1:5.

Der Elektrolyt zur Kationenbestimmung enthielt 6 mM Imidazolpuffer (pH 4,5) und 2 mM 18-Krone-6-Ether. Die Trennung wurde in einer Glaskapillare (innerer Durchmesser 75  $\mu\text{m}$ , Länge 43 cm) bei 20 kV und einer Kapillartemperatur von 20 °C mit 3-5 Sekunden Injektionszeit durchgeführt.

Elektropherogramme wurden mittels indirekter UV-Detektion bei 214 nm erhalten und durch ein spezielles Datenverarbeitungssystem (Fa. ThermoSeparation, Darmstadt-Arheiligen) analysiert.

### **Kationenbestimmung in Wurzel-Segmenten von Mais aus dem Sandanzucht-Rhizotron**

Bei dem in Davis durchgeführten Versuch zum Einfluss des externen pH stand keine Kapillarelektrophorese zur Verfügung. Dort kam ein **Flammen-Atom-Absorptions-Spektrometer** bei der Messung von Kalium, Calcium und Magnesium zum Einsatz.

Hierfür wurden die gesammelten Wurzelsegmente 2 d bei 65 °C getrocknet und in 10 ml 0,5 M HCl für 2 d unter stetigem Schütteln inkubiert (Hunt 1982). 300  $\mu\text{l}$  einer CsLa-Mischung (50 ppm Cs; 100 ppm La) wurden für Zwecke der quantitativen Analyse zugegeben. Calcium und Magnesium wurden im Messmodus der Absorptionsspektroskopie, Kalium im Messmodus der Emissionsspektroskopie gemessen.

Bei diesem Versuch wurden auch Proben des Sand-Anzucht-Substrates nach Zugabe von Wasser, 30-minütiger Inkubation und Vakuumextraktion der Lösung auf Kalium, Calcium und Magnesium untersucht. Drei bis fünf Standardlösungen wurden aus Stammlösungen (je 1000 ppm des jeweiligen Elements) angesetzt. Die Konzentration der Standardlösungen überdeckte den Bereich der gemessenen Konzentrationen des jeweiligen Elements.

## 5.6 Transkriptmengen des Expansin-Gens NtExp1

### Extraktion von Gesamt-RNA

Tabakblätter wurden hierfür mit Hilfe eines Skalpells in Intercostalfelder, Seitennerven 1. Ordnung und Mittelrippen aufgeteilt. Gewebeproben von je 300 +/-100 mg FG wurden in Safelock-E-Cups überführt und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C aufbewahrt.

Für die Extraktion von Gesamt-RNA (Logemann et al. 1987, modifiziert) wurden die Gewebeproben nach Zugabe einer Stahlkugel in einer Schüttelmühle (Firma Retsch, Göppingen) für 2 min gemörsert. Nach Zugabe von 600 µl Extraktionspuffer (6 M Guanidin-HCl, 20 mM EDTA, 20 mM MES, pH 7,0; 140 mM β-Mercaptoethanol) wurden die Proben gemischt und auf Eis gestellt. Nach 15 min wurden 300 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:24:1, v:v:v) zugegeben und wieder gut durchmischt. Die Stahlkugel wurde nun entfernt; die Suspension zentrifugiert (3000 g, 3 Minuten bei 20 °C). Die in der wässrigen Phase enthaltenen Nukleinsäuren wurden nun mit 0,7 Volumina 96 %igem EtOH und 0,05 Volumina 1 M Essigsäure 20 min bei Zimmertemperatur gefällt und anschließend 15 min bei 16000 g unter 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde zunächst mit 3 M Natriumacetat, pH 5,4 und anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation (15 min bei 16000 g, 4 °C) wurde der Überstand abgehoben, das Pellet kurz an der Luft getrocknet und in reinem Formamid aufgenommen.

Durch Messung der Extinktion bei 280 nm (Absorption Protein) und 260 nm (Absorption Nukleinsäure) wurden Reinheit (für reine RNA gilt  $OD_{260} / OD_{280} > 1,8$ ) und Menge (1  $OD_{260}$  entspricht einer RNA-Menge von 40 mg/ml) der erhaltenen RNA bestimmt. Die RNA-Präparationen wurden auf eine Konzentration von 1 mg/ml RNA verdünnt und bei -80 °C aufbewahrt.

### Herstellen Digoxigenin-markierter Sonden mittels DNA-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Als Ausgangsplasmid zur Herstellung der Digoxigenin-markierten Sonde diente ein pBlueskript II-Plasmid, welches das **Expansin-Gen NtExp1** (Fragmentgröße 1,3 kbp) aus Tabak-Suspensionskultur enthielt (Link und Cosgrove 1998). Das Plasmid lag als getrocknete cDNA vor (1 µg, von Bruce M. Link und Daniel J. Cosgrove, PennState University, Pennsylvania, USA zur Verfügung gestellt). Es wurde in 5 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen und 1:1000 verdünnt.

Für die **PCR** wurde folgender **Ansatz** gewählt (Endkonzentrationen):

- 5 µl DNA-Templat (ca. 1 ng)
- 5 µl Primer SK (1 µM)
- 5 µl Primer KS (1 µM)
- 5 µl Inkubationspuffer(100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>)
- 5 µl dATP, dCTP, dGTP, dTTP (250 µM)
- 24,8 µl Wasser
- 0,2 µl Goldstar DNA-Polymerase

Am PCR-Thermocycler wurden folgende Einstellungen gewählt:

1.) Denaturierung bei 95 °C für 4 min

2.) 30 Zyklen von

Denaturierung: 45 Sekunden bei 95 °C

Primerbindung: 45 Sekunden bei 45 °C

Extension: 80 Sekunden bei 72 °C

3.) Extension bei 72 °C für 5 min

Anschließend wurde auf Eis abgekühlt und die erfolgreiche Markierung der Sonde durch Gelelektrophorese überprüft.

### **Northern Blot**

4 µg Gesamt-RNA wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer (10 \* MOPS-Puffer (200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7,0), 0,1 µg/ml Ethidiumbromid, 0,5 % (v/v) Bromphenolblau) versetzt, 15 min bei 65 °C denaturiert, sofort auf Eis abgekühlt und in einem 1 %igen Agarosegel (10 % (v/v) Formaldehyd, 1 \* MOPS-Puffer) unter Verwendung von 1 \* MOPS-Puffer als Laufpuffer bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach der Auftrennung wurde unter UV-Licht überprüft, ob die Auftrennung der Proben gleichmäßig war. Die RNA wurde per Kapillarblot mit 5 \* SSC (0,75 M NaCl, 75 mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat, pH 7,0) über Nacht auf eine Nylonmembran (Duralon-UV, Stratagene) transferiert.

### **Hybridisierung und Detektion mittels Chemilumineszenz**

Die Membranen wurden nach dem Kapillartransfer kurz in 5 \* SSC gewaschen und anschließend auf ein feuchtes 3MM-Whatmanpapier gelegt. Die Fixierung der RNA an die Membran erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 366 nm (Auto-crosslink-Modus des Stratalinker 1800, Stratagene).

Die Nylonmembran wurde eine Stunde in Dig Easy Hyb (Boehringer, Mannheim) bei 45 °C vorhybridisiert. Nach Zugabe der Sonde (20 ml des PCR-Ansatzes zur Digoxigenin-Markierung in 40 ml Dig Easy Hyb) wurde über Nacht bei 55 °C hybridisiert. Unspezifisch gebundene DNA wurde durch zweimaliges Waschen mit 2\*SSC, 0,1 % SDS bei 55 °C für 15 min und anschließend 2\* 10 min mit 0,1 SSC, 0,1 % (g/v) SDS bei 55 °C entfernt.

Die Membran wurde kurz mit bidestilliertem Wasser abgespült. Zur Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membran wurde diese mit Puffer 1 (1 % (g/v) Blocking (Boehringer, Mannheim) in Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure, pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,3 % (v/v) Tween-20) für 30 bis 45 min inkubiert. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem an alkalische Phosphatase konjugierten Anti-Digoxigenin-Antikörper (Verdünnung 1:10000 in Puffer 1; Boehringer, Mannheim).

Nach viermaligem Waschen mit TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20) für je 10 min bei 30 °C und anschließender Inkubation mit Detektionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl) für 10 min, erfolgte eine erneute Inkubation mit Detektionspuffer, der das Chemilumineszenz-Substrat für die alkalische Phosphatase (250 µM CDP-Star; Promega, Mannheim) beinhaltet.

### Quantifizierung der Expression

Die Nylonmembran wurde luftblasenfrei in Plastikfolie eingeschweisst. In der Dunkelkammer wurde in einer Filmkassette ein Hyperfilm ECL (Amersham, Braunschweig) aufgelegt, der nach einer Expositionszeit von 2 bis 5 min entwickelt wurde.

Die Schwärzung des Röntgenfilms an der Stelle der jeweiligen, zu den Proben gehörigen Banden konnte nach Abfotografieren des Films (Kamera vom Typ OM 900, Fa. Olympus, München) mit Hilfe des Bildverarbeitungs-Programms Heurisko quantifiziert werden, indem die Differenz zwischen dem mittleren Grauwert einer Bande und dem Grauwert des Blothintergrunds für jede Probe ermittelt wurde. Die Grauwerte der Proben eines Blots konnten dann miteinander verglichen, bzw. als Perzentile der maximalen Grauwertdifferenz eines Blots ausgedrückt werden.

## 5.7 Gaswechselfmessungen

Unter Verwendung eines offenen Gaswechselsystems (Porometer CQP-130, Fa. Walz, Effeltrich) wurde der Gasaustausch zwischen Rizinusblättern und der Umgebungsluft in einer Blattküvette bestimmt (von Caemmerer und Farquhar 1981). Hierfür wurde eine Differenzmessung der CO<sub>2</sub> und Wasserdampf-Gehalte von Mess- und Referenzgas durchgeführt. Messgas strömte durch die Blattküvette und änderte dabei seine Zusammensetzung durch Assimilation und Transpiration der Pflanze. Referenzgas wurde durch einen Ausgleichsbehälter geführt. Die Messungen erfolgten mit Hilfe eines Infrarot-Gasanalysators (BINOS 4 P, Fa. Heraeus) bei vorgegebener Durchflussrate. Assimilation  $A$  [ $\mu\text{mol CO}_2 * \text{s}^{-1} * \text{m}^{-2}$ ] und Transpiration  $T$  [ $\text{mmol H}_2\text{O} * \text{s}^{-1} * \text{m}^{-2}$ ] wurden nach folgenden Formeln berechnet (BF: in der Küvette befindliche Blattfläche):

$$A = DCO_2[\text{ppm}] * \text{Fluss}[\text{ml}/\text{min}] / 60 / 22,4 [\text{ml}/\text{mmol}] / 1000 / BF [\text{cm}^2] * 10000$$

$$T = DH_2O [\text{ppm}] * \text{Fluss}[\text{ml}/\text{min}] / 60 / 22,4 [\text{ml}/\text{mmol}] / 1000000 / BF [\text{cm}^2] * 10000$$

Es wurden Versuche unter Standard-Azuchtbedingungen (Kap. 7.2) sowie unter Dauerlicht (Kap. 7.8) durchgeführt.

# Ergebnisse

## 6 Wurzelwachstum

In der apikalen Wachstumszone einer Wurzel finden sich stets Zellen, die in Teilung begriffen sind und Zellen, die sich in der Streckungsphase befinden. Die Zellen verschiedener Entwicklungsstadien befinden sich dabei in räumlich getrennten Regionen, deren Übergänge zueinander fließend sind (Kap. 1.3). Aus dem klaren anatomischen Aufbau der Zone ergibt sich ein räumliches Muster der Wachstumsverteilung, das klarer mit Regionen verschiedener cytologischer Entwicklungszustände korreliert, als es zum Beispiel bei Blättern dikotyler Pflanzen der Fall ist. Unter 'Wachstum' wird dabei für die Zwecke dieser Arbeit der Volumenzuwachs einer Region verstanden; unabhängig davon, welche Entwicklungsprozesse im Gewebe dieser Region momentan stattfinden (Zellteilung, Zellstreckung, parallele Differenzierungsprozesse; siehe Kap. 1.1).

Wachstum, genauer gesagt das Zustandekommen räumlicher oder zeitlicher Wachstumsmuster (Kap. 1.2) wurde in Versuchsansätzen untersucht, die durch Aussenbedingungen von entweder konstanter oder variabler Natur charakterisiert waren. Im nachfolgenden Ergebnisteil sind zu Beginn jedes Abschnitts daher kurz die Rahmenbedingungen genannt, unter denen die Ergebnisse des jeweiligen Abschnitts erhalten wurden. Wachstumsmuster konnten anhand von **vier Parametern der Dynamik der Wurzelwachstumszone** erhalten werden, die zwar getrennt voneinander aufgelöst werden können, sich jedoch stets wechselseitig beeinflussen:

1. **Zeitliche Dynamik des Gesamtwachstums** der Wurzelwachstumszone. Dieses manifestiert sich in der Geschwindigkeit der Wurzelspitze;  $V_{\text{Spitze}}$ .
2. **Länge der Wurzelwachstumszone**
3. **Räumliche Verteilung von Wuchsraten** über die Wurzelwachstumszone hinweg
4. **Transversale Oszillationen** der Wurzelspitze

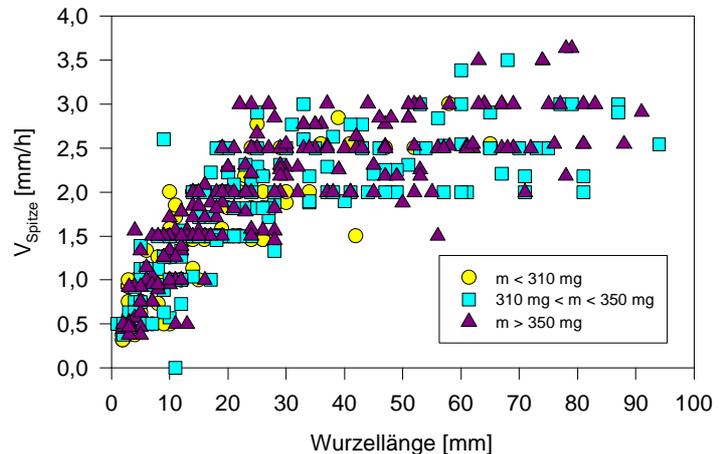
Die Resultate der vorliegenden Arbeit wurden vorwiegend durch Untersuchungen an Maiswurzeln erhalten; einige Untersuchungen konnten auch an den wesentlich kleineren Wurzeln von Tabak durchgeführt werden. Aus der Literatur liegen keine Hinweise darauf vor, dass sich die Organisation der Wachstumszonen von monokotylen und dikotylen Pflanzen voneinander unterscheidet.

Eine ausführliche Charakterisierung des Pflanzenmaterials ist eine wesentliche Voraussetzung für Untersuchungen der Wachstumsdynamik. Bevor Reaktionen der Pflanze hinsichtlich ihrer Wachstumsdynamik auf Änderungen externer Parameter und deren regulatorische Funktion untersucht werden können, muss der Ausgangszustand des wachsenden Organs sehr genau bekannt sein. Um die Charakterisierung dieses Ausgangszustandes, der eher ein Fließgleichgewicht als einen statischen Zustand darstellt, geht es im nächsten Abschnitt.

## 6.1 Wachstum unter Standardbedingungen

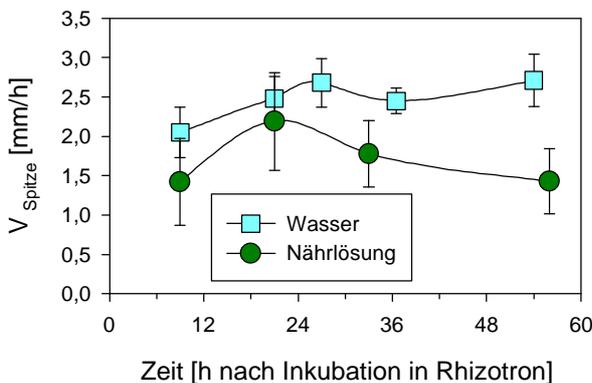
Als *Standard-Aussenbedingungen* bei der Untersuchung von Maiswurzel-Wachstum wurden konstante Temperaturverhältnisse (in der Regel 26 °C), konstante Luftfeuchte ( $50 \pm 10 \%$ ), 12 h hell / 12 h dunkel (Lichtintensität: 120  $\mu\text{E}$ ; Licht an von 8 bis 20 Uhr) und eine Anzucht in Nährstoff-freiem Aussenmedium gewählt.

Unter diesen Bedingungen beschleunigt sich die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelspitze ( $V_{\text{Spitze}}$ ) und erreicht einige Tage nach der Keimung bei einer Länge der Primärwurzel von etwa 5 cm einen Plateauwert (Abb. 6.1). Diese absolute Wuchsrate wird über einige Tage hinweg konstant bei 2 bis 3 mm/h gehalten (Abb. 6.2). Der Plateauwert von  $V_{\text{Spitze}}$  hängt dabei nicht von der Ausgangsmasse des Samens ab (Abb. 6.1), wie vielleicht erwartet werden könnte, da die Pflanze bei den gewählten Standardbedingungen auf die Nährstoffreserven ihres Speichergewebes angewiesen ist.  $V_{\text{Spitze}}$  unterscheidet sich aber stark von Individuum zu Individuum (Abb. 6.1 und 6.3): Bei einem Versuch im Sandanzucht-Rhizotron (Abb. 6.1) wurde die absolute Wuchsrate von Keimlingen mit verschiedenen Samenmassen (3 Klassen mit je 20 Individuen: leicht, mittel und schwer) verfolgt. Der erreichte Plateauwert schwankte unabhängig von der Samenmasse zwischen 2 und 3 mm/h. Im Durchfluss-Rhizotron wurde bei einer Population von 40 Keimlingen eine noch höhere Variationsbreite der absoluten Wuchsraten festgestellt (Abb. 6.3). hier wurden für  $V_{\text{Spitze}}$  Werte zwischen 1 und 2,5 mm/h gefunden. Aufgrund dieser hohen **intraspezifischen Variabilität** der Wachstumsgeschwindigkeiten ist die Bildung von Wachstums-Mittelwerten aus Daten verschiedener Individuen immer mit einer hohen Varianz verbunden.

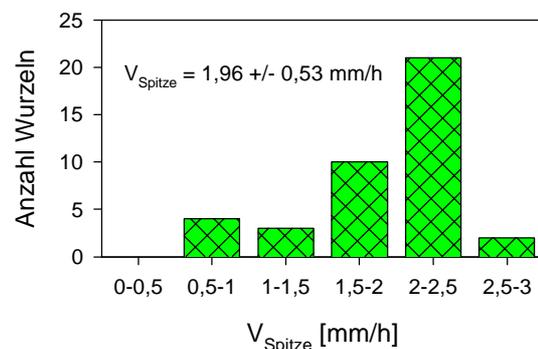


**Abb. 6.1 Zunahme von  $V_{\text{Spitze}}$  im Verlauf der Entwicklung**

Die Daten wurden im Sand-Rhizotron an Keimlingen verschiedener Ausgangsmassen (siehe Legende) erhoben. Je Klasse lagen 20 Keimlinge vor.



**Abb. 6.2  $V_{\text{Spitze}}$  nach Inkubation im Durchfluss-Rhizotron**  
Daten von 2 Populationen; dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen



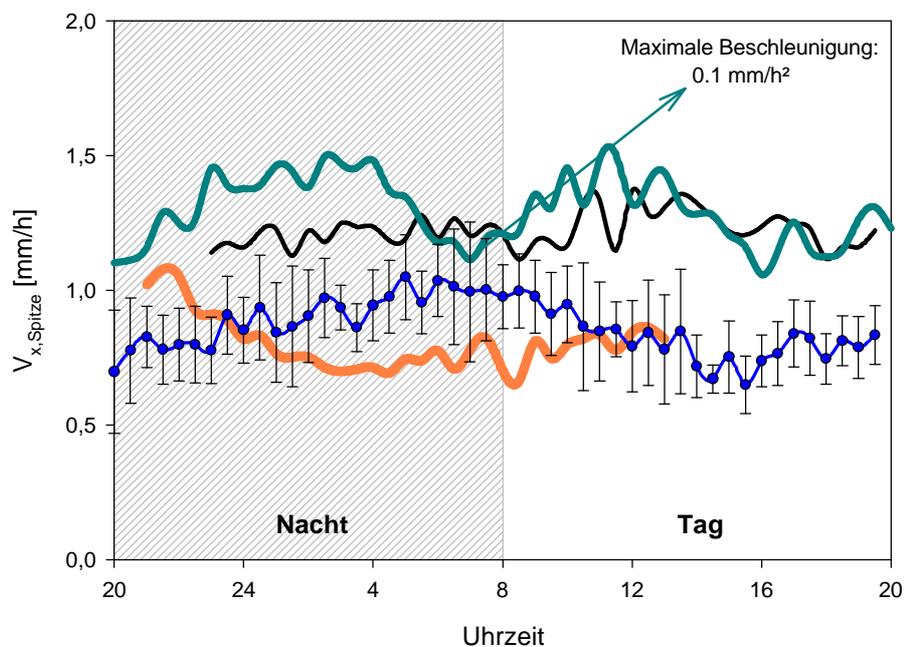
**Abb. 6.3 Intraspezifische Variabilität von  $V_{\text{Spitze}}$**   
Daten von 40 Keimlingen eines Experimentes im Durchfluss-Rhizotron

Die Nährstoffversorgung aus dem Samen heraus ermöglicht es der Primärwurzel des Maiskeimlings bei Anzucht in bidestilliertem Wasser bis zu einer Länge von etwa 30 cm heranzuwachsen. Dabei wird über vier bis fünf Tage hinweg ein konstanter Wert von  $V_{\text{Spitze}}$  gehalten (Daten nicht gezeigt). Der Samen wiegt vor der Keimung im Mittel 330 mg; die Pflanze wiegt zehn Tage nach der Keimung etwa 2 g, hat dann also etwa das fünffache ihres Ausgangsgewichts an Wasser und Kohlendioxid aufgenommen. Während dieser Zeit kann an der Primärwurzel von Mais studiert werden, wie die Reservestoffe des Samens für die Ansprüche des konstant zuwachsenden sink-Gewebes der Wurzelspitze mobilisiert werden.

### 6.1.1 Tagesgang

In mehreren Versuchen zeigte sich, dass kein deutlicher Tagesgang vorhanden ist (Abb. 6.4). Zwar treten kurzfristige Schwankungen von  $V_{\text{Spitze}}$  auf; diese können jedoch nicht mit bestimmten Tageszeiten korreliert werden. Die während eines Tages auftretenden Schwankungen der absoluten Wuchsrates einzelner Individuen sind wesentlich geringer (für die vier untersuchten Individuen ergeben sich maximale Differenzen von 0,4 mm/h; zweimal 0,3 mm/h und 0,2 mm/h) als die intraspezifische Variabilität des untersuchten Parameters (0,8 mm/h bei den vier Pflanzen von Abb. 6.4; bis über 1,5 mm/h bei den Pflanzen von Abb. 6.3).

Dieses Resultat konnte mit Hilfe einer Serie von klassischen Punktvermessungen an einer kompletten Population bestätigt werden (Abb. 6.5). Auch bei den hierauf untersuchten Tabakwurzeln ist kein Tagesgang im Wachstumsverhalten zu erkennen (siehe Kap. 7.2.8; Abb. 7.44).



**Abb. 6.4 DISP-Messung von  $V_{\text{Spitze}}$  bei vier Maiswurzeln im Tagesgang**

Die Linien verschiedener Farben gehören zu verschiedenen Pflanzen. Die Daten wurden bei einer Anzucht unter 21 °C erhoben. Die blaue Kurve zeigt die Standardabweichungen von  $V_{\text{Spitze}}$  dieser Wurzel während einer halben Stunde.

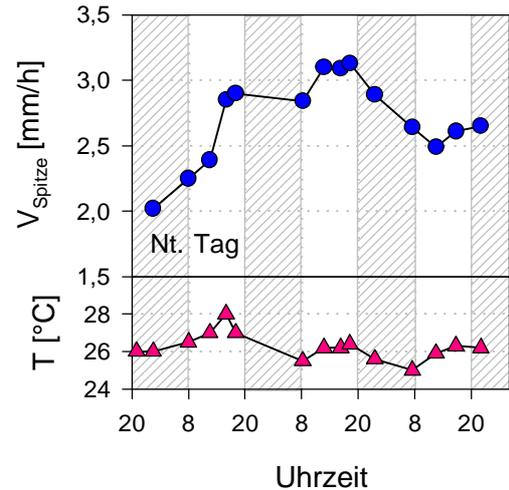
### Aussagekraft der Messungen an Einzelpflanzen

Dieses Resultat hat über seine Aussage bezüglich des Tagesganges hinaus noch eine weitere, für die Argumentation der vorliegenden Arbeit sehr relevante Bedeutung bezüglich der Frage, wie aussagekräftig die Resultate von Einzelpflanzen sind. In Experimenten, die zu dynamischen Änderungen der absoluten Wachsraten führen, stellt die Varianz der Population kein Maß dar, um die Signifikanz der Veränderung zu quantifizieren, weil die intraspezifische Variabilität des Ausgangszustandes (und damit auch des Endzustandes) sehr hoch ist. Die Varianz der zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen Wachsraten eines Individuums ist hierfür aussagekräftiger, da davon ausgegangen werden kann, dass sich dessen absolute Wachsraten in engeren Grenzen als der Variationsbreite der Population ändert.

Diese Aussage gilt analog auch für die weitere Betrachtungen der vorliegenden Arbeit, in denen Parameter untersucht werden, die einer hohen intraspezifischen Varianz unterliegen. Sie impliziert, dass die Angabe einer Varianz oder Standardabweichung für den Vergleich zweier Populationen hinsichtlich eines Parameters, dessen zeitliche Dynamik betrachtet wird, nicht aussagekräftiger ist, als der Vergleich von Ergebnissen zweier Individuen, die mit hoher zeitlicher Auflösung untersucht wurden. Dennoch wurden die jeweiligen Untersuchungen falls möglich mehrfach repliziert.

### 6.1.2 Räumliche Verteilung von Wachsraten in der Wachstumszone

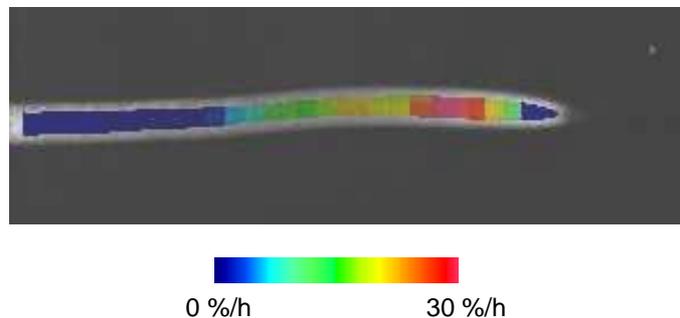
In der meristematischen Region der Wurzelspitze findet sich nur eine sehr geringe Element-Wachsraten (REGR; Kap. 1.4). In basaler Richtung schließt sich die Region der Wurzelstreckungszone an, in der die Wachsraten deutlich ansteigt. Das Maximum der Verteilung ist einige Millimeter hinter der Wurzelspitze lokalisiert; etwa 1 cm hinter der Wurzelspitze ist die Wachsraten dann wieder auf Null abgesunken (Abb. 6.6 und 6.7). Jede im Meristem produzierte Zelle durchläuft dieses Wachstumsfeld im Verlauf ihrer Entwicklung.



**Abb. 6.5** Linealvermessung von  $V_{\text{Spitze}}$  an 20 Pflanzen im Verlauf mehrerer Tage

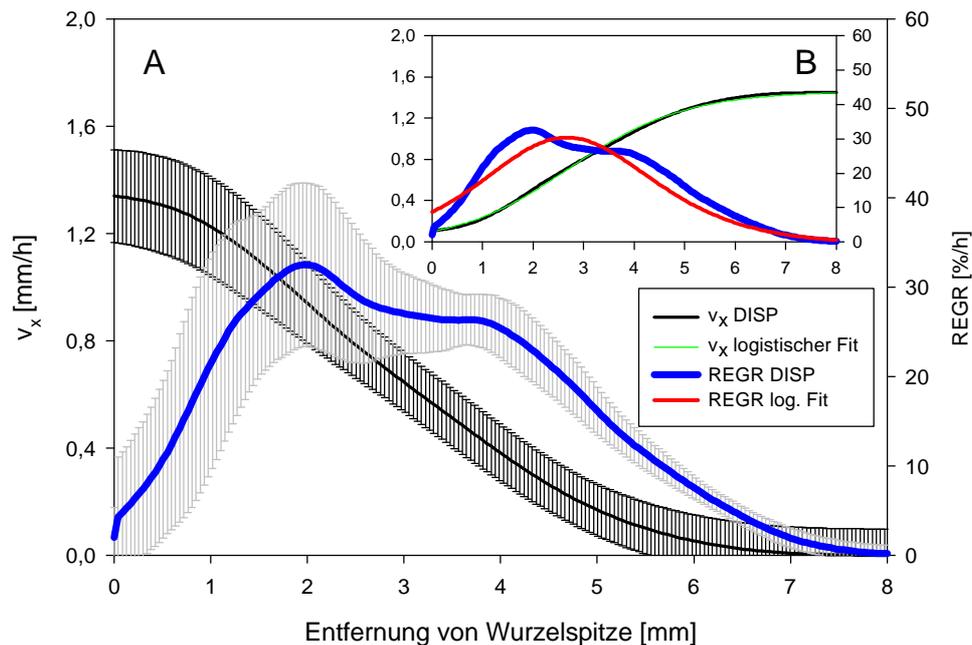
Dargestellt sind die Populationsmittelwerte; die absolute Standardabweichung liegt bei jeweils etwa 0,5 mm/h.

Der unten dargestellte Temperaturverlauf deutet bereits eine gewisse Abhängigkeit der absoluten Wachsraten von der Aussentemperatur an.



**Abb. 6.6** Farbcodierte Darstellung der Wachsratenverteilung entlang einer Wurzelspitze von Mais

Bildgröße ca. 17\*5 mm; REGR farbcodiert dargestellt



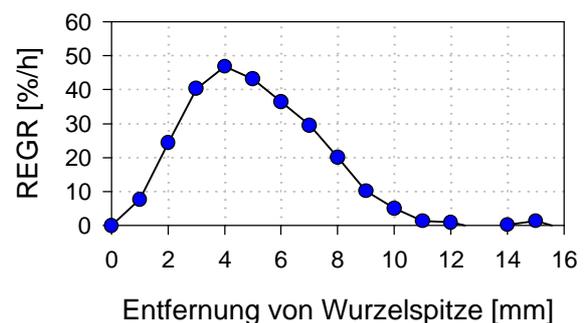
**Abb. 6.7 Wuchsraten (REGR) und Geschwindigkeitsverteilung ( $v_x$ ) entlang der Wachstumszone**

**A:** Resultate einer DISP-Messung incl. Standardabweichungen innerhalb von 60 min

**B:** Anfitzen dieser Resultate mit logistischen Fitfunktionen (Morris und Silk 1992)

Im Gegensatz zu bisher in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen konnten in der Zone maximaler Wachstumsaktivität aufgrund der höheren räumlichen Auflösung der DISP-Messmethode gegenüber bisher verwendeten Methoden zwei Aktivitätspeaks voneinander getrennt werden (Abb.6.7). Diese Aktivitätspeaks pulsieren in ihrer Höhe und ihrer relativen Lage zueinander (Details siehe weiter unten; Kap. 6.4).

Mittelt man die Wachstumsverteilungen entweder über lange Zeiträume oder über eine Anzahl verschiedener Individuen hinweg, so verschmelzen die beiden Maxima (Abb. 6.8). Da mit den bislang gebräuchlichen Vermessungstechniken eine starke räumliche oder zeitliche Mittelung unvermeidbar war, sowie darüber hinaus die pulierten Wuchsratenverteilungen oft Mittelungen über eine gewisse Anzahl von Individuen darstellten, überrascht es nicht, dass über die Existenz zweier getrennter Peaks bislang nicht berichtet wurde.



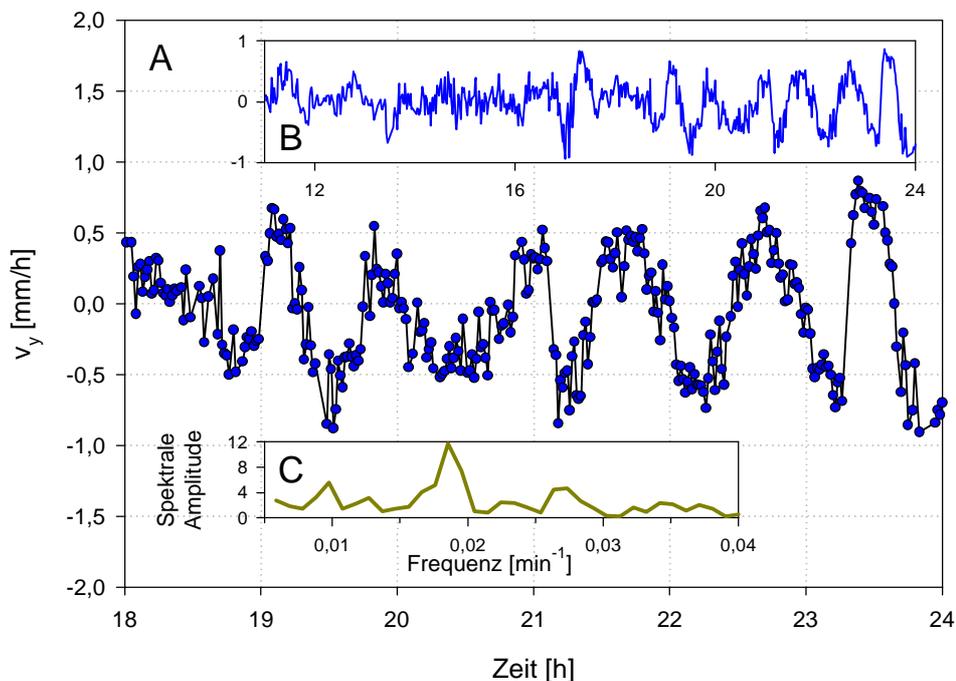
**Abb. 6.8 Mittelung aller verwendbaren REGR-Profile unter Standardbedingungen**

Datenbasis: sechs DISP-Messungen bei 26 °C

Die funktionelle Relevanz dieser beiden Peaks wird auch durch die unterschiedlichen Wachstumsreaktionen der beiden Aktivitätszentren bei dynamischen Änderungen der Umweltbedingungen belegt (siehe Kap. 6.2 und 6.4).

### 6.1.3 Transversal-Oszillationen der Wurzelspitze

Der beobachtete Wachstumsprozess läuft in Verbindung mit räumlichen Oszillationen der Wurzelspitze von zum Teil erheblicher Amplitude ab. Die Wurzelspitze wird dabei oft um 2 mm gegenüber der gedachten Achse der Wurzelwachstumszone ausgelenkt und bewegt sich dabei mit Geschwindigkeiten von bis zu 1 mm/h senkrecht zur Elongationsrichtung der Wachstumszone (Abb. 6.9). Die auftretende Schwingungsbewegung der Wurzelspitze wird im weiteren Verlauf der Arbeit ‚*Transversal-Oszillation*‘ genannt. Es könnte sich hierbei um Circumnutationen der Wurzelspitze handeln (Kap. 9.3). Da die Wurzel während ihres Wachstumsprozesses durch die Geometrie des Aufbaus in eine Ebene gezwungen ist, kann nicht entschieden werden, ob es sich bei den Transversal-Oszillationen um helikale (dreidimensionale) oder pendelnde (zweidimensionale) Bewegungen handelt. Unter Standardbedingungen wurden Periodenlängen von 40 bis 70 min gemessen; die Transversal-Oszillationen waren nicht zu jedem Zeitpunkt deutlich ausgeprägt.



**Abb. 6.9** Transversal-Oszillation der Wurzelspitze unter Standardbedingungen

**A:** Geschwindigkeitskomponente der Bewegung der Wurzelspitze in Y-Richtung ( $v_y$ ) während sechs Stunden deutlich ausgeprägter oszillatorischer Aktivität (DISP-Messung).

**B:** Aktivität der Transversal-Oszillationen der Wurzelspitze aus der gleichen Bildsequenz während 13 Stunden. In der ersten Hälfte des Experiments ist keine deutliche Periodizität zu erkennen.

**C:** Fourieranalyse der Zeitreihe von Teilabbildung A (Software Origin, Fa. Microcal Software, Northampton, USA). Eine Fourieranalyse fittet den gemessenen Kurvenverlauf an eine Schar von Sinusfunktionen mit verschiedenen Frequenzen an und ermöglicht so eine Frequenzanalyse. Die ermittelten Daten zeigen einen Peak bei einer Frequenz von  $0,0188 \text{ min}^{-1}$  (Periodenlänge: 53 min).

Die transversale Bewegung ist beim Auftreten dieses Wachstumsmusters nicht auf die Wurzelspitze beschränkt. Die Oszillation ist über die gesamte Länge der Wurzelwachstumszone hinweg deutlich ausgeprägt (Abb. 6.10).

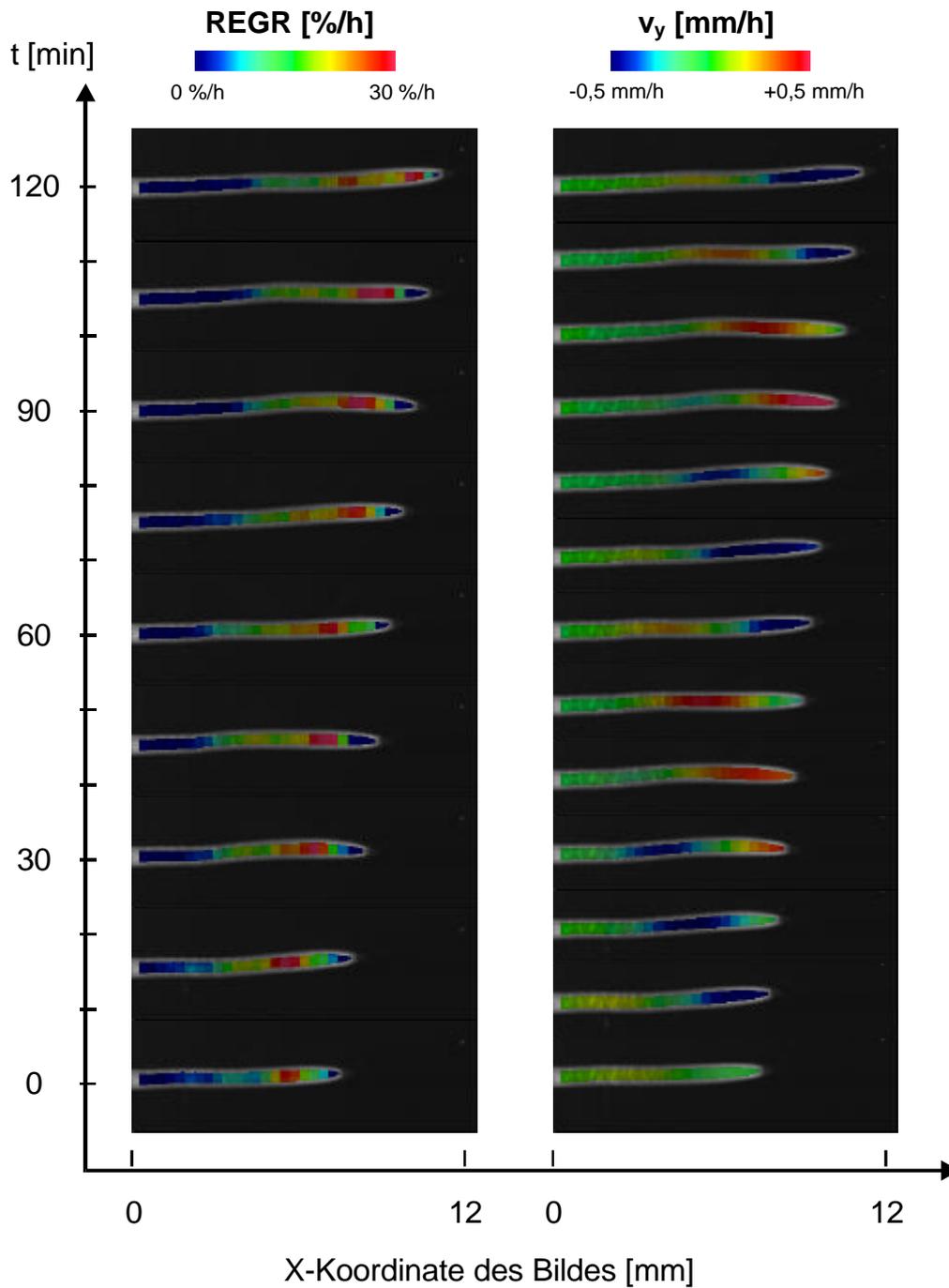


Abb. 6.10 Farbcodierte Darstellung von Wuchsraten- (links) und  $v_y$ -Verteilung (rechts)

### 6.1.4 Inhaltsstoffverteilung

In diesem Abschnitt werden die Resultate von Konzentrations- und Depositionsratenverteilungen wichtiger Inhaltsstoffe in der Wurzelwachstumszone dargestellt. Ziel ist nicht eine umfassende, detaillierte Darstellung, sondern eine Klassifizierung der Stoffe bezüglich ihrer auftretenden Verteilungsmuster unter Standard-Anzuchtbedingungen.

#### Zeitliche und räumliche Konzentrationsverteilungen

Für Kohlenhydrate, Aminosäuren und Anionen wurden Ernten zu vier Zeitpunkten des Tages durchgeführt, die neben der Information über die räumliche Verteilung der Inhaltsstoffe in der Wurzelwachstumszone auch einen ersten Anhaltspunkt über die Existenz von Tagesgängen der fraglichen Inhaltsstoffverteilungen geben können. Die Differenzen zwischen den Messungen zu verschiedenen Zeiten sind allgemein recht gering.

Für Glucose beispielsweise betragen sie nur wenige Prozent des mittleren Gehaltes. Es sind jedoch in allen untersuchten Wurzelsegmenten systematische zeitliche Unterschiede zu erkennen (Abb. 6.11). Um 23 Uhr und um 7 Uhr treten höhere Gehalte auf als bei den beiden Messungen um 15 Uhr. Die Resultate der Messungen um 15 Uhr stimmen jedoch nahezu perfekt überein. Glucose zeigt zu jedem Zeitpunkt einen deutlich vom Apikalmeristem zur Basis der Wurzelwachstumszone hin abfallenden Konzentrationsgradienten.

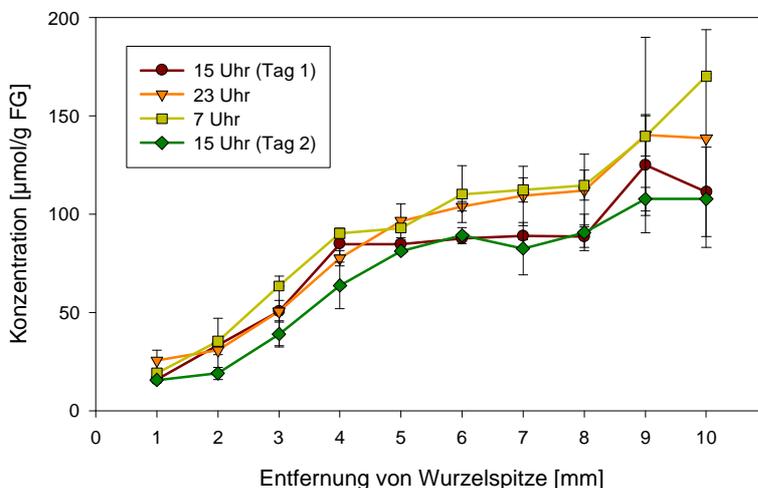


Abb. 6.11 Tagesgang des Glucose-Konzentrationsprofils

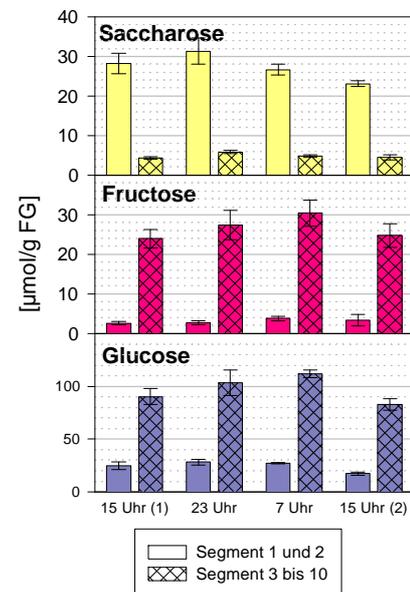


Abb. 6.12 Tagesgang Kohlenhydrate

Im Rahmen der Messfehler ergibt sich für alle drei untersuchten Kohlenhydratspezies dasselbe Bild; insbesondere in den hinteren Segmenten, die die Elongationszone der Wurzel umfassen (Abb. 6.12). Glucose- und Fructose-Konzentrationen steigen vom Meristem zur Basis der Elongationszone hin an; die Saccharosekonzentration fällt dagegen ab.

Das Verhältnis von Hexosensumme zu Saccharose beträgt (bezogen auf mmol/g FG) im Meristem 1 (30:30); in der Elongationszone 26 (130:5).

Bei allen untersuchten Inhaltsstoffen wurden die mittleren Konzentrationen der Elongationszonen (Segment 3 bis 10) errechnet und auf den jeweiligen Substanz-Mittelwert (aller vier Zeitpunkte) normiert. Trägt man diese normierten Gehalte gegen die Zeit auf, so wird erkennbar, dass viele Inhaltsstoffe in den Nachtstunden erhöhte Gehalte aufweisen: Neben den untersuchten Kohlenhydraten zeigen viele Aminosäuren sowie einige Anionen in der Nacht tendenziell erhöhte Gehalte (Abb. 6.13, Tab. 6.1).

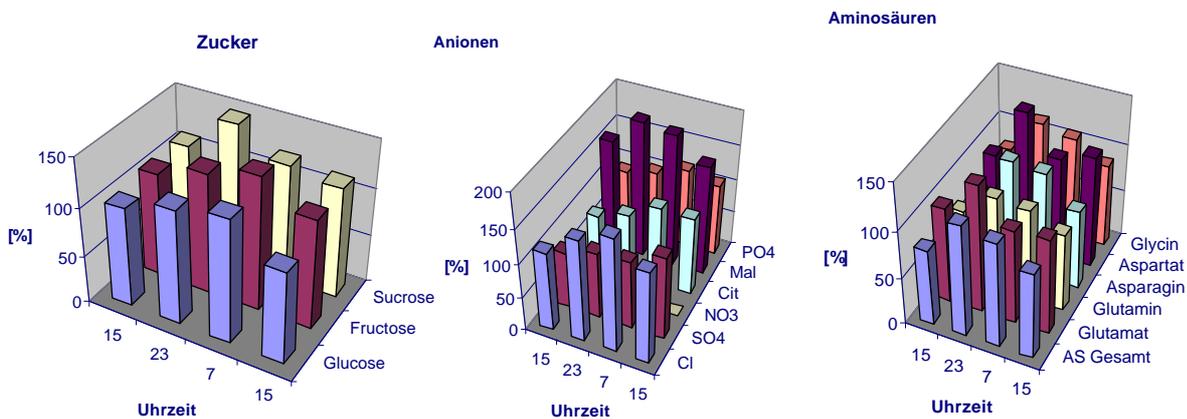


Abb. 6.13 Tagesgänge für Zucker, Anionen und Aminosäuren in den Elongationszonen

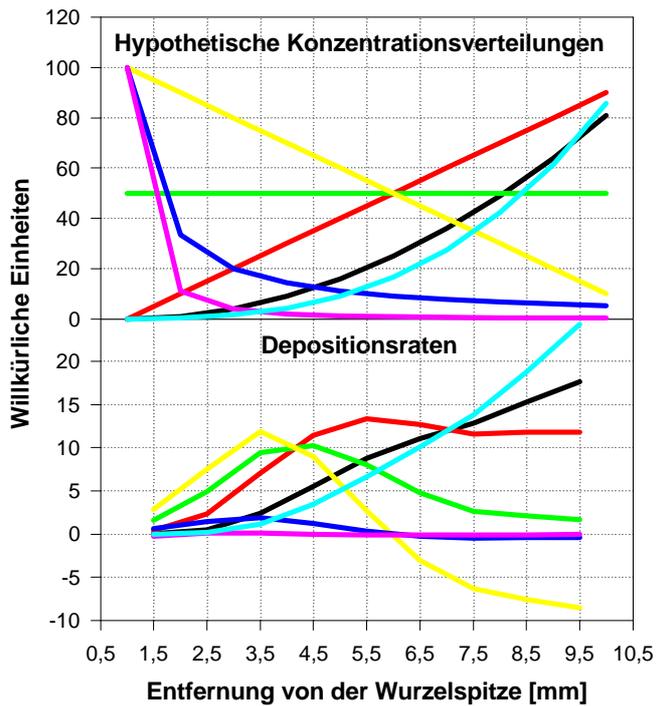
### Depositionsratenverteilung

Die **Depositionsrates** einer Substanz in einem bestimmten Segment der Wurzelwachstumszone kann mit Hilfe der Kontinuitätsgleichung (Kap. 2.3) errechnet werden. Falls die Konzentrationsverteilung eines Stoffes sich zeitlich nicht ändert (weder von Tag zu Tag, noch im Tagesgang), fällt der zeitliche Term der Kontinuitätsgleichung weg und die Depositionsrates einer Substanz errechnet sich nach:

$$D(x) = C(x_2) \cdot v(x_2) - C(x_1) \cdot v(x_1)$$

Dabei steht  $D(x)$  für die Depositionsrates an einer Stelle  $x$  der Wurzelwachstumszone, die zwischen den Stellen  $x_1$  und  $x_2$  gelegen ist.  $C$  steht für die Stoff-Konzentration;  $v$  für die Geschwindigkeit des Gewebe-Elements im Wurzel-Koordinatensystem (siehe Kap. 1.4 sowie Abb. 6.28), die sich aus dem Integral der REGR-Verteilung ergibt. Depositionsrates werden üblicherweise in der Einheit  $\text{nmol}/\text{mm}/\text{h}$  errechnet und geben den Netto-Mengen-Eintransport pro Stunde in ein bestimmtes Wurzelsegment an. Auf den zeitlichen Term der Gleichung zur Berechnung von Depositionsrates konnte verzichtet werden, da keine nennenswerten tageszeitlichen Veränderungen der Konzentrationen auftreten.

Legt man die mittlere Wuchsratesverteilung des Wurzelwachstums unter Standardbedingungen (Abb. 6.8) zugrunde, so kann man mit Hilfe einer Modellrechnung die wichtigsten Charakteristika der Beziehung von Konzentrations- und Depositionsratesverteilungen grafisch veranschaulichen (Abb. 6.14).



**Abb. 6.14 Zusammenhang zwischen Konzentrations- und Depositionsratenverteilungen bei gegebener REGR-Verteilung**

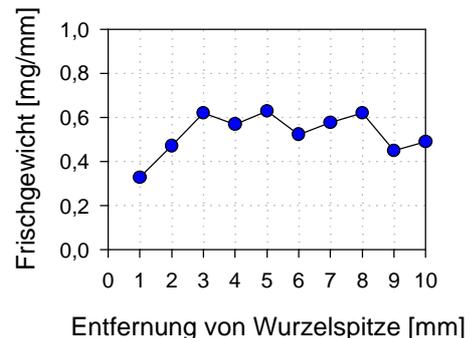
Je steiler die Konzentrationsverteilung vom Apikalmeristem zur Elongationszone hin abfällt, desto apikaler liegt das Maximum der Depositionsraten und desto niedriger sind die Depositionsraten.

Bei homogener Konzentrationsverteilung (grüne Linie) entspricht die Depositionsratenverteilung der REGR-Verteilung.

Bei Konzentrationsverteilungen, die zur Elongationszone hin ansteigen, liegt das Maximum der Depositionsratenverteilung hinter der Zone maximaler Wachstumsaktivität.

Zur Berechnung von Depositionsraten müssen die Konzentrationen der Inhaltsstoffe mit Hilfe des Biomassegehaltes der einzelnen Segmente auf die Einheit [ $\mu\text{mol}/\text{mm}$ ] umgerechnet werden.

Die **Biomasse** ist in der Wurzelwachstumszone nicht homogen verteilt, sondern nimmt vom Apikalmeristem zur Basis hin zu (Abb. 6.15). Der Grund hierfür ist, dass die Wurzel erst einige Millimeter hinter der Spitze ihren vollen Durchmesser erreicht hat.



**Abb. 6.15 Biomassenverteilung entlang der Wurzel**

### Muster der räumlichen und zeitlichen Konzentrationsverteilungen

Die gemessenen Inhaltsstoffverteilungen können bezüglich ihrer Konzentrationsgradienten in verschiedene **Klassen** eingeteilt werden (Tab. 6.1). Aus der Klassenzugehörigkeit der Substanzen lassen sich auch Aussagen über ihre Depositionsratenverteilungen treffen (vergleiche Abb. 6.14).

Es gibt Stoffe, die ein Maximum in der meristematischen (M) Region, den vordersten 2 Millimetern der Wurzelspitze, aufweisen und deren Gehalt zur Basis der Elongationszone (E) hin abfällt. Diese Stoffe werden der Klasse ME zugeordnet. Hierzu gehört beispielsweise Kalium (Abb. 6.16), das im Meristem Gehalte von bis zu  $130 \mu\text{mol}/\text{g}$  FG aufweist; am Ende der Elongationszone aber nur noch eine Konzentration von etwa  $60 \mu\text{mol}/\text{g}$  FG hat. Inhaltsstoffe mit dieser Verteilung haben ihr Depositionsmaximum wie oben beschrieben wurde (Abb. 6.14) stets apikal der Zone des stärksten Wurzelwachstums.

Stoffe mit der umgekehrten Verteilung, also mit monoton zum Apikalmeristem hin abfallenden Konzentrationen, werden der Klasse EM zugeordnet. Hierzu gehört beispielsweise Glucose (Abb. 6.16) mit meristematischen Gehalten von 5  $\mu\text{mol/g}$  FG und Spitzenwerten an der Basis der Elongationszone von 120  $\mu\text{mol/g}$  FG. Das Depositionsmaximum dieser Stoffe liegt hinter der Zone maximalen Wachstums (basal).

Ferner gibt es Stoffe, die nahezu homogen über die gesamte Zone verteilt sind (Klasse H; Depositionsmaximum genau in der Zone stärksten Wachstums) und inhomogen verteilte Stoffe ohne monotonen Konzentrationsverlauf (Klasse IH), über deren Depositionsmaximum a priori nichts ausgesagt werden kann. Zu letzterer Klasse gehört beispielsweise Phosphat (Abb. 6.16), dessen Konzentrationsmaximum mit 8  $\mu\text{mol/g}$  FG um vier Millimeter hinter der Wurzelspitze liegt.

Eine umfassende grafische Darstellung der Konzentrationsverteilungen der Inhaltsstoffe findet sich weiter hinten (Abb. 6.23 und 6.24).

Stoffe, die eine Tendenz zur Existenz eines Tagesganges aufweisen, sind in Tabelle 6.1 mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

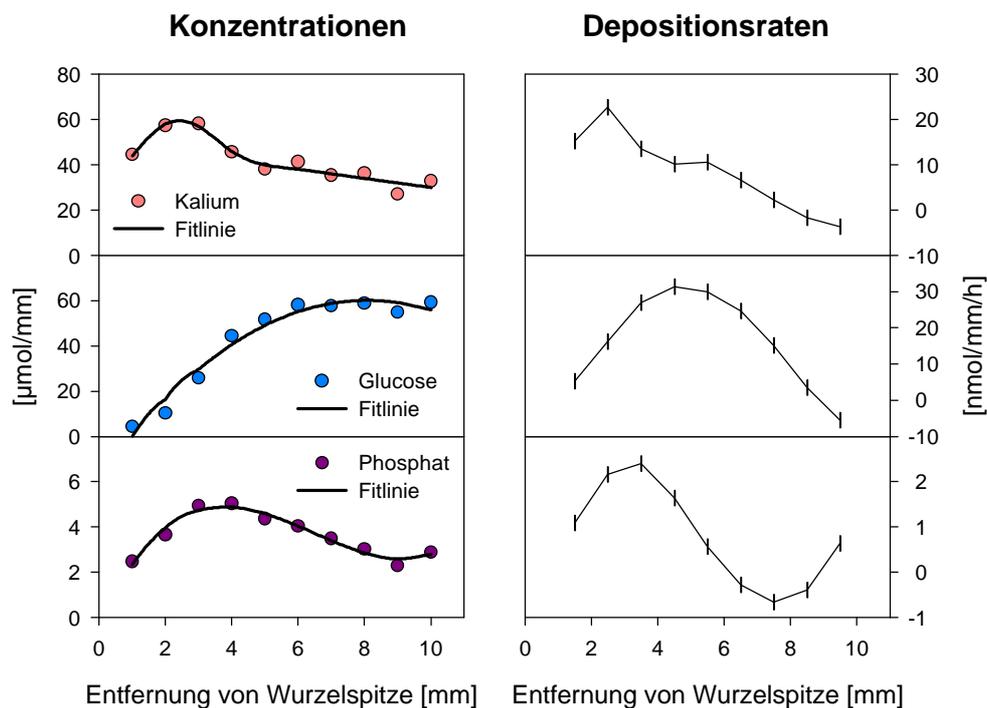


Abb. 6.16 Konzentrations- und Depositionsratenprofile einiger beispielhaft ausgewählter Substanzen

**Tab. 6.1 Gradienten, Konzentrationen und Tagesgänge von Inhaltsstoffen in Maiswurzeln**

Gradient: Räumliche Gradienten; die Inhaltsstoffe sind hierbei in folgende Klassen eingeteilt: EM (höhere Gehalte in der Elongationszone; rot), ME (höhere Gehalte im Meristem; blau), H (homogen), IH (inhomogen). Für Meristem (Merist.) und Elongationszone (Elongz.) sind jeweils mittlere Konzentrationen angegeben. Falls ein Tagesgang der Inhaltsstoffverteilung zu erkennen ist, steht in der Rubrik Tagesg. ein Stern (\*)

Inhaltsstoff	Anzucht in Wasser				Anzucht in Nährlösung			
	Gradient	Merist.	Elongz.	Tagesgg (* : ja)	Gradient	Merist.	Elongz.	Tagesgg (* : ja)
		[µmol/g FG]				[µmol/g FG]		
Glucose	EM	15	120	*	EM	15	90	-
Fructose	EM	2	40	*	EM	2	23	-
Saccharose	ME	28	4	*	ME	15	3	-
Nitrat	-	0	0		EM	2	35	-
Citrat	H	3	4	-	-	0	0	-
Malat	EM	5	10	*	ME	5	1,5	-
Chlorid	EM	10	15	*	ME	10	5	-
Sulfat	H	4	4	-	H	3	4	-
Phosphat	IH	8	5	-	IH	8	6	-
Kalium	ME	130	60		ME	120	60	
Calcium	ME	5	3		ME	5	3	
Magnesium	ME	8	3		ME	9	4	
Natrium	IH	190	150		IH	200	170	
Ammonium	H	15	13		ME	40	25	
Lithium	ME	5	2,5		ME	3	1,5	
AS Ges	EM	40	50	*	H	50	50	-
Gln	H	10	12	*	ME	23	13	-
Glu	ME	8	2	*	ME	5	2	-
Asn	EM	3	7	*	IH	4	9	-
Asp	ME	6	1	*	ME	5	1	-
Ser	H	2	2,5	*	H	2	2,5	-
Val	EM	1	4	-	EM	1,2	2,5	-
Gly	EM	1,5	4	*	EM	1,5	4	-
Ala	IH	4	6	*	IH	3	5	-
His	H	1,8	1,8	*	EM	0,3	1	-
Phe	EM	0,4	1,3	*	EM	0,3	1,3	-
Tyr	EM	0,2	1,0	*	EM	0,2	1,1	-
Leu	EM	0,3	0,9	-	EM	0,3	1,2	-
GABA	ME	1,0	0,4	*	H	0,3	0,4	-

## 6.2 Einfluss externer Nährstoff-Verfügbarkeit

Mit Hilfe der nachfolgend beschriebenen Versuche kann untersucht werden, wie sich die Art der Nährstoff-Rekrutierung auf Wachstumsmuster der Wurzel auswirkt. In Wasser ist die Wurzel auf einen Eintransport der Nährstoffe aus dem Endosperm angewiesen; in Nährlösung (hohe externe Nährstoff-Verfügbarkeit) kann sie die extern angebotenen Nährstoffe nutzen.

### Versuchsdesign

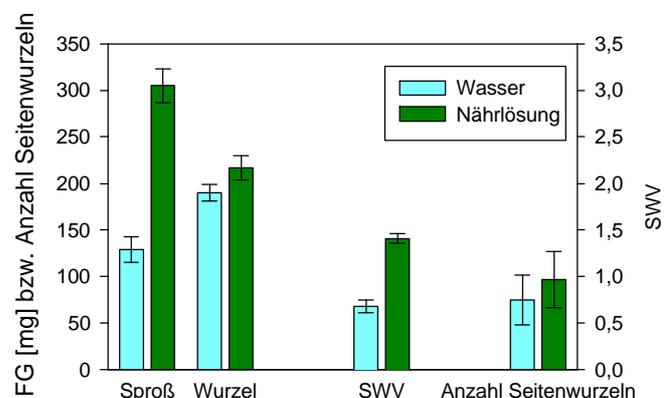
Im Verlauf der vorliegenden Arbeit fanden mehrfach Anzuchten von je 20 Maiskeimlingen im Durchfluss-Rhizotron statt, die einen Vergleich des Wachstumsverhaltens von Wurzeln unter verschiedenen externen Nährstoff-Verfügbarkeiten erlaubten (je 10 Replikate). Die Populationen wurden dabei entweder in bidestilliertem Wasser (Abkürzung: ‚Wasser‘) oder in Ingestad-Nährlösung mit 10 mM Stickstoffkonzentration (Abkürzung: ‚Nährlösung‘) kultiviert. Bei Verwendung von Ingestad-Nährlösung standen in der Nährlösung alle von der Pflanze benötigten Mikro- und Makronährelemente in ausreichender Menge zur Verfügung (Nährlösungszusammensetzung: siehe Kap. 2.1). Die übrigen externen Kultivierungsbedingungen entsprachen den in Kap. 6.1 genannten Standardbedingungen. Wachstumsverteilungen und Inhaltsstoffe wurden nach einer Inkubationszeit von drei Tagen im Rhizotron gemessen.

In einem separaten Versuch (drei Replikate) wurde die dynamische Wachstumsreaktion einer zuwachsenden Wurzel bei instantaner Änderung der externen Nährlösungs-Verfügbarkeit untersucht. Die untersuchte Pflanze wurde in Wasser kultiviert; nach zwei Tagen Inkubation im Rhizotron wurde Ingestad-Nährlösung addiert (Stickstoff-Endkonzentration: 10 mM); die externe Nährstoff-Verfügbarkeit änderte sich hierbei sprunghaft.

### 6.2.1 Wachstum

#### Biomasseverhältnisse

Keimlinge, die im Rhizotron unter Einsatz von Nährlösung kultiviert werden, erreichen eine insgesamt höhere Biomasse sowie ein höheres Spross-Wurzel-Verhältnis als Keimlinge aus Wasser-Anzuchten (Abb. 6.17). Die Wurzel erreicht allerdings kein signifikant höheres Frischgewicht; ebenso ist die Seitenwurzelausbildung nahezu unbeeinflusst.



**Abb. 6.17 Biomassenverhältnisse in Wasser und Nährlösung**

SWV bezeichnet den Quotienten des Frischgewichtes von Spross und Wurzel

### Absolute Wachsrates

Eine signifikante Änderung ergibt sich jedoch hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzelspitze: In Nährlösung werden geringere Werte gefunden als in Wasser. Bei Vermessung der absoluten Wachsrates mittels Punktmarkierungen werden für Wurzeln aus Wasser-Anzucht Wachstumsgeschwindigkeiten von 2,64 mm/h; für Wurzeln aus Nährlösungsanzucht 1,67 mm/h gemessen (Abb. 6.18).

### Verteilung der Element-Wuchsrates

Gemittelt über alle mit der DISP-Methode untersuchten Wurzeln hinweg (jeweils fünf Wurzeln), zeigt sich, dass die stärksten Wachstumsdifferenzen zwischen Wurzeln beider Anzuchten in der Zone maximaler Wachstumsaktivität auftreten (Abb. 6.19). Hier werden Mittelwerte für  $V_{\text{Spitze}}$  von 2,63 (Wasser) bzw. 1,89 mm/h (Nährlösung) gefunden. Die maximale Wachsrates beträgt 47 %/h (Wasser) bzw. 34 %/h (Nährlösung). In der basalen, abfallenden Flanke der Verteilung unterscheiden sich die Element-Wuchsrates deutlicher als im apikalen (meristematisch aktiven) Teil der Wachstumszone. Die Längen der Wachstumszonen sind identisch (10 mm); ebenso die Position des REGR-Maximums (4 mm).

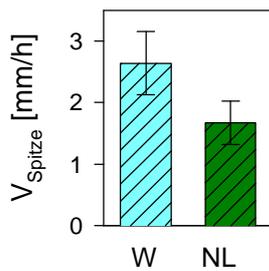


Abb. 6.18  $V_{\text{Spitze}}$  in Wurzeln aus Wasser (W) und Nährlösung (NL)

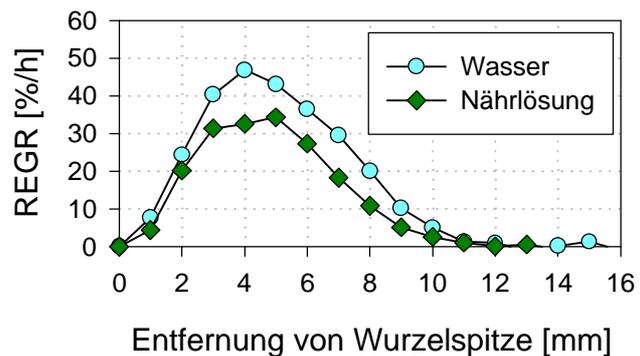


Abb. 6.19 REGR-Verteilungen für Wurzeln aus Wasser und Nährlösung

Mittel aus je fünf 1-h-DISP-Mittelwerten verschiedener Wurzeln

Vergleicht man die **Frischgewichtsverteilung** in den Wachstumszonen der Wurzeln aus den unterschiedlichen Behandlungen, so zeigt sich, dass die Wurzeln der Nährlösungsanzuchten eine höhere Biomasse pro Segmentlänge haben (Abb. 6.20). Da der Trockengewichtsanteil von Wurzeln beider Anzuchten bei acht Prozent liegt (Daten nicht gezeigt), bedeutet dies, dass die in Nährlösung kultivierten Wurzeln dicker sind als diejenigen aus bidestilliertem Wasser. Dort tritt zwar eine raschere Verlängerung der Wurzeln als in Nährlösung auf; die Wurzeln bilden jedoch einen geringeren Durchmesser aus.

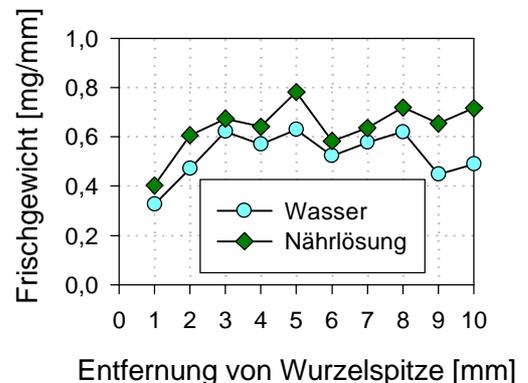


Abb. 6.20 Frischgewichtsverteilung von Wurzeln aus Wasser und Nährlösung

Mittelwerte der Ernten aller Segmente

### Transversal-Oszillationen

Auch bezüglich der oszillatorischen Bewegung der wachsenden Wurzelspitze ergibt sich ein Unterschied zwischen Wurzeln, die bei unterschiedlicher externer Nährstoff-Verfügbarkeit angezogen werden: Während in bidestilliertem Wasser eine Oszillationsperiode von 40 bis 70 Minuten auftritt (Abb. 6.9), ist in Nährlösung im Wesentlichen eine Oszillationsperiode von 10 bis 15 min zu finden (Abb. 6.21). Diese ist mehr oder weniger deutlich von einer Oszillation der größeren Periodenlänge überlagert. Dies legt den Schluss nahe, dass die Oszillationsfrequenzen von der Art der Nährstoffversorgung in die Wurzelwachstumszone hinein abhängen: bei Versorgung der Zone durch das Endosperm des Samens tritt eine langsamere Oszillationsbewegung auf als bei Aufnahme von Nährstoffen über eine kürzere Strecke hinweg aus der Rhizosphäre (siehe hierzu Kap. 9.3).

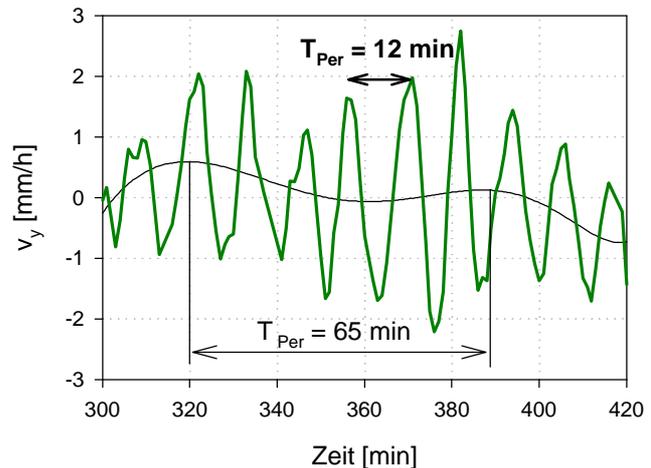


Abb. 6.21 Y-Oszillation der Wurzelspitze in Nährlösung

### Wachstumsreaktion bei sprunghafter Änderung der externen Nährstoff-Verfügbarkeit

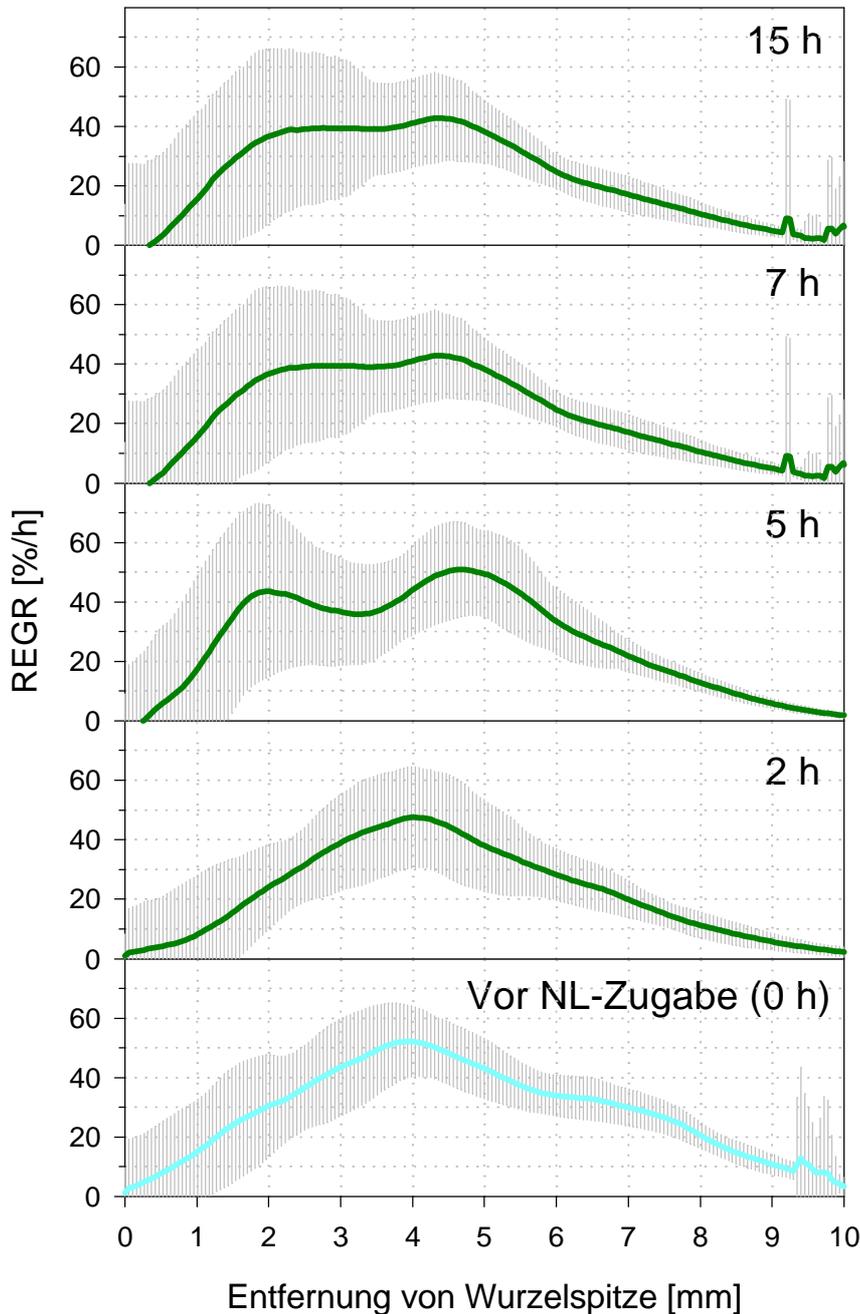
Die Verteilung der Element-Wuchsraten zeigt bereits wenige Stunden nach einer Änderung der externen Nährstoff-Verfügbarkeit eine deutliche Reaktion (Abb. 6.22).

Im oben beschriebenen Experiment (Versuchsdesign) ergibt sich vor der Nährlösungszugabe eine nahezu lineare Zunahme der REGR-Verteilung von der Wurzelspitze (0 %/h) bis zum 4 mm dahinter gelegenen Punkt der maximalen Wachstumsaktivität (über 50 %/h). Die Verteilung fällt mit einer recht geringen, gleichmäßigen Steigung (REGR bei 7 mm über 30 %/h) bis zum Ende der Wachstumszone hin ab. Ein solch moderater Abfall an der basalen Flanke ist typisch für eine Wachstumsverteilung unter Standardbedingungen, bei denen die zwei Aktivitätspeaks in der Zone stärksten Wachstums miteinander verschmolzen sind.

Bereits zwei Stunden nach Erhöhung der externen Nährstoff-Verfügbarkeit ist über die gesamte Länge der Wachstumszone hinweg eine deutlich verminderte Wachstumsaktivität wahrzunehmen; vor allem jedoch in den ansteigenden und abfallenden Flanken der Verteilung. Nach fünf Stunden zeigt sich wieder eine Zweiteilung der maximalen Wachstumsaktivität; die im weiteren Verlauf des Experiments erhalten bleibt. Nach 15 Stunden hat sich die für Nährlösungsanzuchten typische REGR-Verteilung ausgebildet: Der basale Peak des Aktivitätszentrums (REGR bei 4 mm: 40 %/h) ist etwas höher als der apikale Peak; die Wachstumsaktivität klingt nach hinten rascher ab (REGR bei 7 mm: 20 %/h) als bei fehlender externer Nährstoff-Versorgung.

Zusammenfassend kann die Wachstumsreaktion der Wurzel in diesem Experiment wie folgt beschrieben werden:

*Die maximale Element-Wachsratesank von 50 auf 40 %/h ab; die Position des Aktivitätszentrums blieb konstant etwa 4 mm hinter der Wurzelspitze; bis 10 mm hinter der Wurzelspitze war während des gesamten Experiments eine minimale Wachstumsaktivität zu erkennen.*



**Abb. 6.22** Entwicklung der REGR-Verteilung während eines Nährstoff (NL)-Additionsexperiments  
Dargestellt sind Stundenmittel der DISP-Messung

## 6.2.2 Inhaltsstoffverteilungen

Die **Verteilungen** von Inhaltsstoffen in Wurzeln aus unterschiedlichen externen Nährstoff-Verhältnissen werden in diesem Abschnitt hinsichtlich zweier **Charakteristika** untersucht:

- **Räumliche** Verteilung (Tab. 6.1; Abb. 6.23 und Abb. 6.24)
- **Tageszeitliche** Variation (Tab. 6.1; Abb. 6.25)

Aufgrund der bei diesen räumlichen und zeitlichen Analysen gewonnenen Erkenntnisse können dann im nächsten Schritt folgende **abgeleitete Größen der Inhaltsstoffverteilung** berechnet werden:

- **Integrale Substanz-Mengen** in der gesamten Wachstumszone (Abb. 6.26 und Abb. 6.27)
- **Integrale Substanz-Depositionen** in der gesamten Wachstumszone (Abb. 6.26 und 6.27)
- **Ladungsbalance** innerhalb der Wurzelwachstumszone (Abb. 6.26 und Abb. 6.27)
- **Substanztausch** zwischen Wachstumszone und Restwurzel (Tab. 6.2)

### **Räumliche Gradienten der Inhaltsstoffverteilungen** (Tab. 6.1, Abb. 6.23 und Abb. 6.24)

#### *Konzentrationen von Zuckern und Aminosäuren*

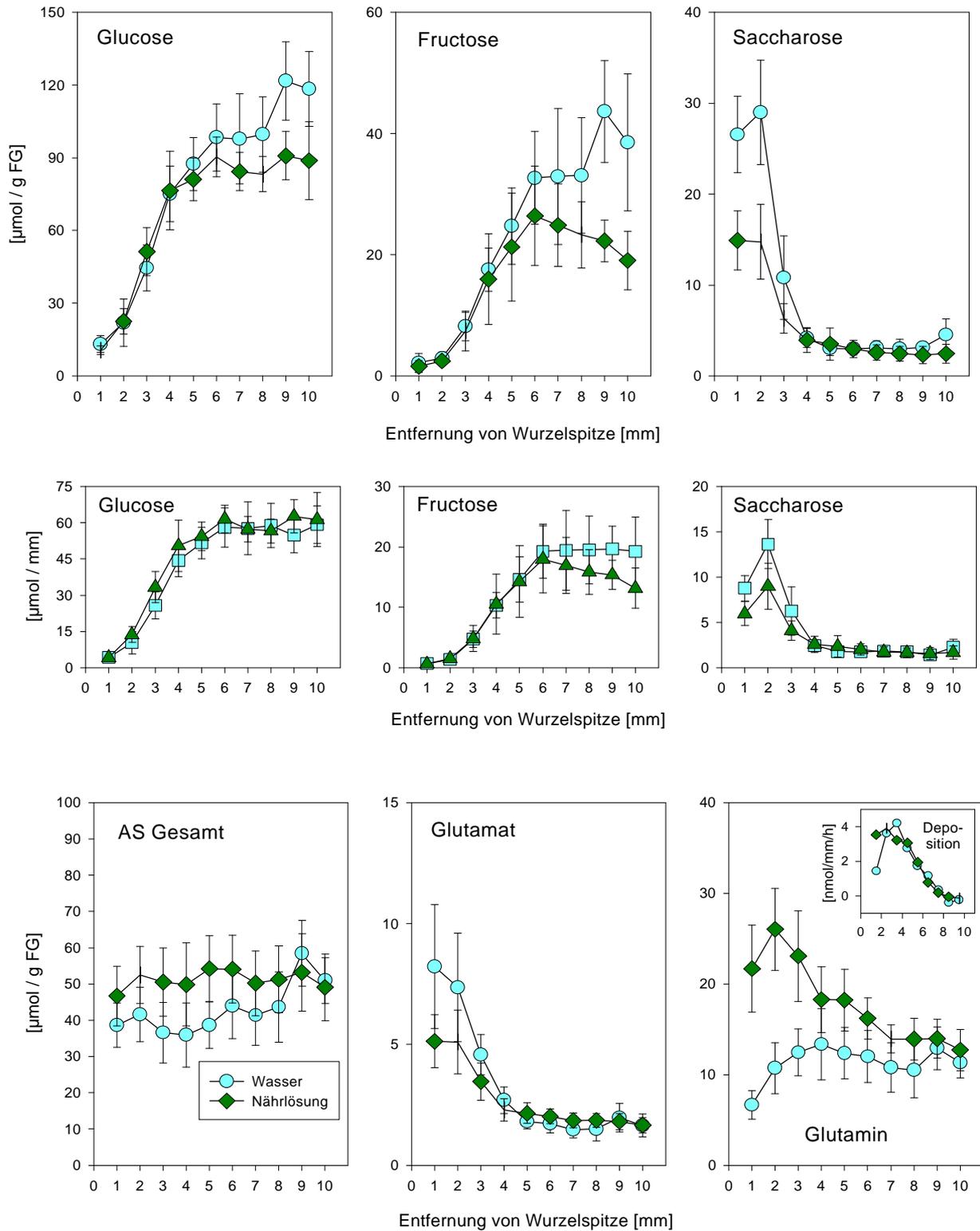
Das externe Angebot dieser Stoffe unterscheidet sich in den beiden Behandlungen nicht.

Bei den Zuckern treten keine nennenswerten Unterschiede zwischen Wurzeln beider Behandlungen auf; insbesondere, wenn nicht die Biomasse, sondern die Segmentlänge als Bezugsgröße gewählt wird. So sind z.B. die niedrigeren Glucose-Konzentrationen pro g Frischgewicht in Wurzeln aus Nährlösungs-Anzucht auf das höhere Frischgewicht der Wurzelsegmente zurückzuführen. Pro Millimeter Segmentlänge ergeben sich nahezu identische Konzentrationen.

Auch die meisten Aminosäuren zeigen sehr ähnliche Konzentrationsprofile in Wurzeln der verschiedenen Behandlungen. Eine wichtige Ausnahme hiervon stellt Glutamin dar, das in nährstofffreien Verhältnissen eine nahezu homogene Verteilung mit tendenziell niedrigeren Gehalten im Meristem zeigt, während seine Konzentration in Wurzeln der Nährlösungsanzucht deutlich vom Meristem zur Basis hin abfällt. Die meristematische Glutamin-Konzentration ist in Wurzeln der Nährlösungsanzucht mehr als doppelt so hoch wie in Wurzeln der Wasser-Anzucht. Glutamat zeigt im Meristem einen gegensinnigen Unterschied. Die absoluten Konzentrationen der Aminosäuren sind in Nährlösung leicht erhöht, was nahezu ausschliesslich durch den Effekt von Glutamin zustande kommt, der von Glutamat etwas kompensiert wird.

#### *Depositionsraten*

Bezüglich der Depositionsratenprofile ergeben sich nur minimale Unterschiede zwischen Wurzeln der verschiedenen Anzuchten; selbst im Fall von Glutamin sind die Profile nahezu identisch (einzige grafisch dargestellte Depositionsratenprofile; siehe Abb. 6.23), da die Konzentrationsunterschiede hauptsächlich im kaum zuwachsenden Meristem auftreten.



**Abb. 6.23** Räumliche Verteilungen der Zucker- und Aminosäuren-Konzentrationen in der Wurzelwachstumszone

Von oben nach unten: Zuckerkonzentrationen (Bezugsgröße: Frischgewicht); Zuckerkonzentrationen (Bezugsgröße: Segmentlänge); Aminosäurekonzentrationen (Bezugsgröße: Frischgewicht) inklusive Depositionsratenverteilung Glutamin.

### *Konzentrationen von Anionen und Kationen*

Das externe Angebot der meisten untersuchten Ionen unterscheidet sich bei den beiden Behandlungen (Ausnahme: Citrat, Malat und Lithium).

Bei den Anionen- und Kationengehalten zeigen sich deutlichere Unterschiede als bei Zuckern und Aminosäuren im Vergleich der beiden Behandlungen. Die Stickstoff-Spezies Nitrat und Ammonium zeigen in Nährlösung höhere Gehalte; Nitrat tritt sogar nur bei Vorhandensein externer Nährstoffe auf; die Konzentration steigt vom Meristem (2  $\mu\text{mol/g}$  FG) bis zum Ende der Wachstumszone (über 30  $\text{mmol/g}$  FG) nahezu linear an. Ammonium ist zwar in Wurzeln beider Behandlungen zu finden, weist jedoch bei hoher Nährstoff-Verfügbarkeit eine etwa doppelt so hohe Konzentration auf; im Meristem ist sein Gehalt um einen Faktor drei erhöht (40 statt 15  $\mu\text{mol/g}$  FG).

Die Anionen Citrat, Malat und Chlorid zeigen dagegen unter Nährstofffreien externen Bedingungen erhöhte Konzentrationen. Die Malat- und Chlorid-Konzentrationsprofile der beiden Behandlungen unterscheiden sich dabei ausschliesslich in der Elongationszone.

Sulfat, Phosphat, Kalium, Calcium, Magnesium und Natrium zeigen trotz veränderten externen Nährstoff-Angebots keine veränderten Konzentrationsprofile. Dies zeigt, dass die Wurzel bezüglich vieler Inhaltsstoff-Komponenten in der Lage ist, einen recht hohen Grad der Homöostase aufrecht zu erhalten, solange die Reserven des Endosperms dazu ausreichen.

### *Depositionsraten*

Bei den Kationen sind generell deutlichere Gradienten vom Meristem zur Basis der Elongationszone hin ausgeprägt als bei den Anionen, die summarisch eine recht homogene Verteilung zeigen. Ein zur Basis der Elongationszone hin deutlich ansteigender Konzentrationsverlauf kann nur für Nitrat in Nährlösungs-Anzuchten festgestellt werden. Dies bedeutet, dass die untersuchten Anionen vorwiegend in der Zone maximaler Wachstumsaktivität deponiert werden, während die Kationendeposition ihr Maximum in einem apikaleren Abschnitt der Wachstumszone aufweist (vergleiche Abb. 6.14). Elektroneutrale Verhältnisse könnten beispielsweise durch Variationen von (vorwiegend negativ geladenen) Proteingruppen der Zellwandmatrix eingestellt werden. Depositionsratenverläufe von Kationen werden im Bezug auf den Effekt des externen pH-Wertes weiter unten noch eingehend besprochen (Kap. 6.3.2; Abb. 6.31).

Manche Inhaltsstoffe (z.B. Asparagin, Glycin) zeigen zwar während des Messintervalls eine stetige Zunahme; die in nährstofffreier Anzucht tendenziell zu entdeckenden Tagesgänge (Abb. 6.13) treten jedoch bei keinem der untersuchten Inhaltsstoffe in Erscheinung.

### **C/N-Verhältnis**

Eine wichtige Größe des pflanzlichen Metabolismus ist das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff. Für die in diesem Abschnitt betrachteten Spezies gilt, dass die kohlenstoffhaltigen Verbindungen eine von der Behandlung unbeeinflusste Konzentration zeigen; die N-Spezies jedoch eine deutlich höhere Konzentration bei hoher externer Nährstoff-Verfügbarkeit.

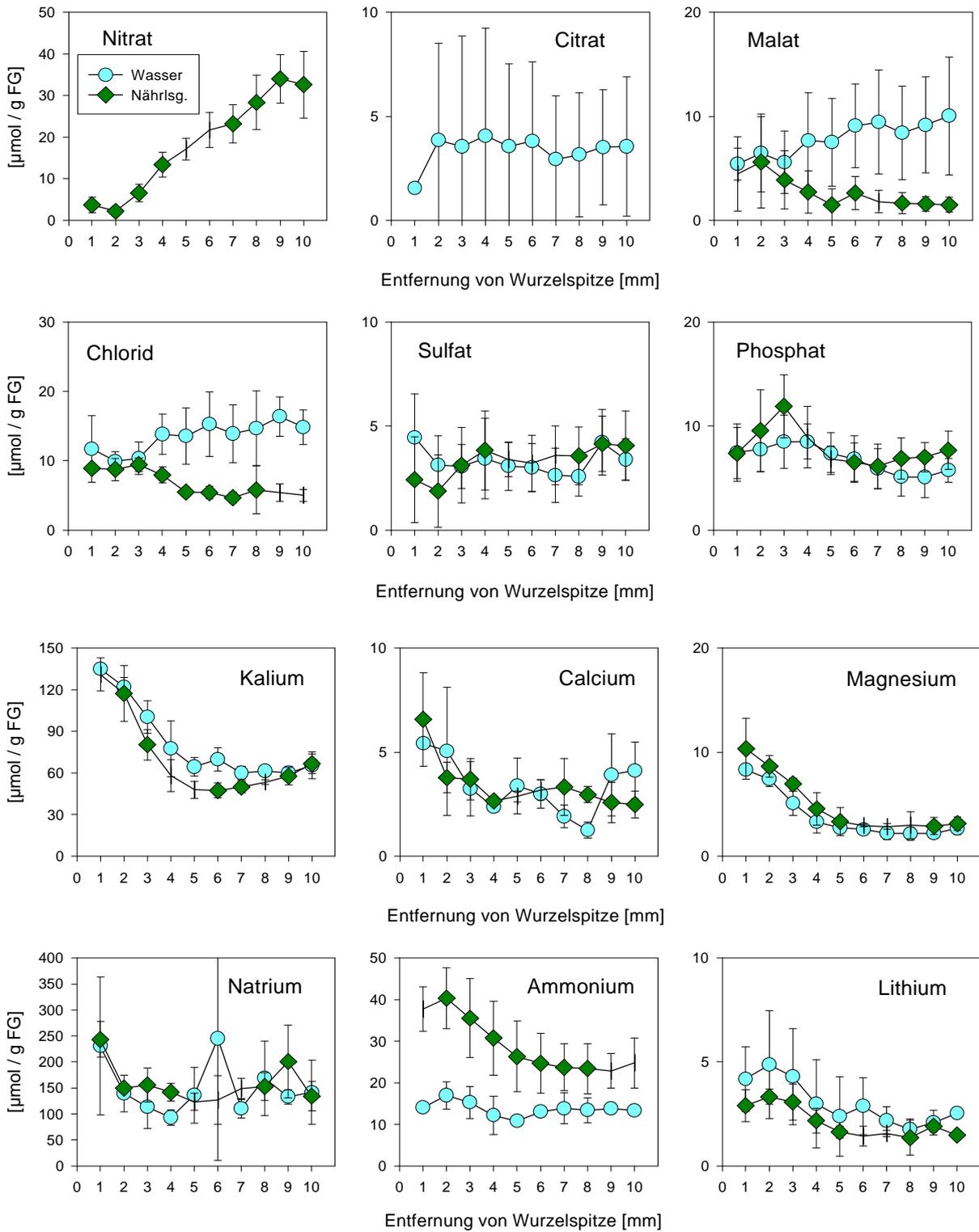
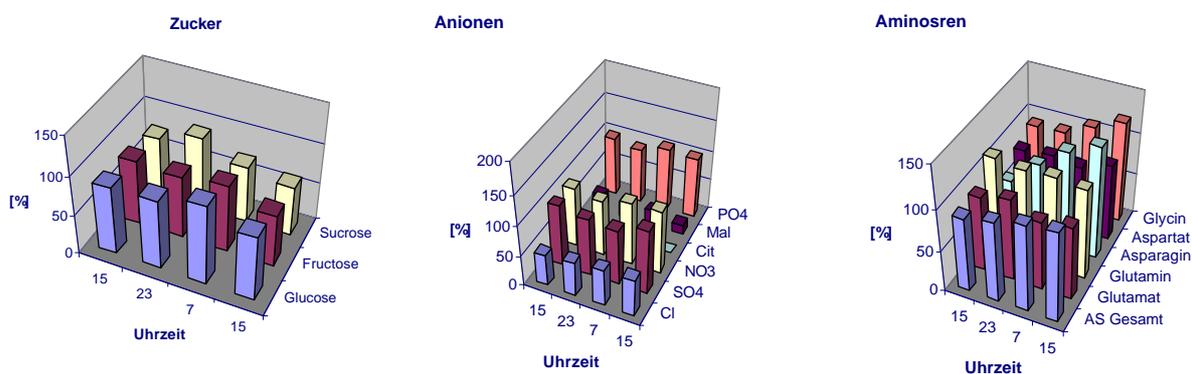


Abb. 6.24 Räumliche Verteilungen von Anionen- und Kationen-Konzentrationen in der Wurzelwachstumszone

## Tageszeitliche Variation der Inhaltsstoff-Konzentrationen

Bei keinem der untersuchten Inhaltsstoffe von Wurzeln aus Nährlösungs-Anzucht kann eine deutliche tageszeitliche Variation erkannt werden (Abb. 6.25). Die Mittelwerte der Segmente der Elongationszone (siehe Kap. 6.1.4) sind zu allen vier Messzeitpunkten bei den meisten untersuchten Substanzen vergleichbar; wenige Inhaltsstoffe weisen eine stetig ansteigende Konzentration auf (z.B. Asparagin und Glycin). In Wurzeln aus Wasser-Anzuchten können hingegen tendenziell für die meisten Substanzen Tagesgänge entdeckt werden (Abb. 6.13).

Das Vorhandensein einer hohen externen Nährstoff-Verfügbarkeit wirkt sich also offenbar günstig auf die zeitliche Hömoöstate der Inhaltsstoff-Zusammensetzung aus.



**Abb. 6.25 Tagesgänge der Inhaltsstoffkonzentrationen der Elongationszone in Nährlösungsanzucht**

Die Konzentrationen der Segmente 3 bis 10 wurden gemittelt und auf den Mittelwert aller vier Zeitpunkte (von Wurzeln aus Wasser- und Nährlösungsanzucht) normiert (siehe Kap. 6.1.4; Abb. 6.16).

## 6.2.3 Integrale Betrachtung von Substanzmengen und Substanzdepositionen

Ziel der nächsten beiden Abschnitte ist es, Aussagen über die Ladungserhaltung in der Wurzelwachstumszone zu treffen sowie mögliche summarische Regulationsmechanismen auf Ebene der Inhaltsstoffe bezüglich des Wachstums unter verschiedener externer Nährstoff-Verfügbarkeit zu untersuchen. Hierfür werden abgeleitete Größen verwendet, die sich aus den Resultaten der zeitlich und räumlich hoch aufgelösten Messungen der vorigen Abschnitte ergeben.

Begonnen wird diese Betrachtung mit einer Analyse der summarischen Mengen und Depositionen von Inhaltsstoffen der verschiedenen untersuchten Klassen. Dabei wird über die Segmente der Wachstumszone sowie über die einzelnen Spezies einer Stoffklasse integriert.

**Zwei wichtige Voraussetzungen** für die Gültigkeit der folgenden Überlegungen sind dabei:

1. Die Länge der Wachstumszonen ist von der Behandlung unabhängig (siehe Abb. 6.19). So kann für Wurzeln beider Behandlungen dieselbe Anzahl von Segmenten für die Berechnung von integralen Größen der Wurzelwachstumszone betrachtet werden.
2. Weder bezüglich der Wachstumsverteilung noch bezüglich der Inhaltsstoffverteilung treten Tagesgänge auf. Dies ermöglicht die in Kap. 6.1.4 geschilderte, vereinfachte Berechnung von Depositionsraten.

### *Zucker*

Die Summe der Gehalte löslicher Zucker ist in Wurzeln beider Behandlungen gleich hoch und beträgt 600 nmol (Abb. 6.26). Leicht erhöhte Glucosegehalte von Wurzeln aus Nährlösung werden von leicht verminderten Gehalten von Fructose und Saccharose kompensiert. Bezüglich der Deposition unterscheiden sich die Verhältnisse der beiden Behandlungen jedoch: In Wurzeln aus Wasseranzuchten wird eine höhere Menge an Zuckern deponiert (210 gegenüber 150 nmol/h).

### *Aminosäuren*

Hier werden umgekehrt für die meisten Spezies zwar höhere Stoffmengen bei Versorgung mit Nährlösung erhalten (AS Gesamt: 330 gegenüber 230 nmol); die Deposition innerhalb der Wurzelwachstumszone unterscheidet sich jedoch nicht für die Wurzeln beider Behandlungen (Abb. 6.26). Die Summe der deponierten Aminosäuren liegt jeweils bei 55 nmol/h. Ein inter-essanter Effekt ist bei Glutamin zu sehen: Zwar unterscheidet sich die Menge in den beiden Behandlungen um den Faktor zwei (110 bzw. 60 nmol); die Depositionssumme ist jedoch mit 15 bzw. 16 nmol/h gleich hoch, da die Depositionsratenverteilungen (Abb. 6.23) sich nur im Meristem geringfügig voneinander unterscheiden.

### *Kationen und Anionen*

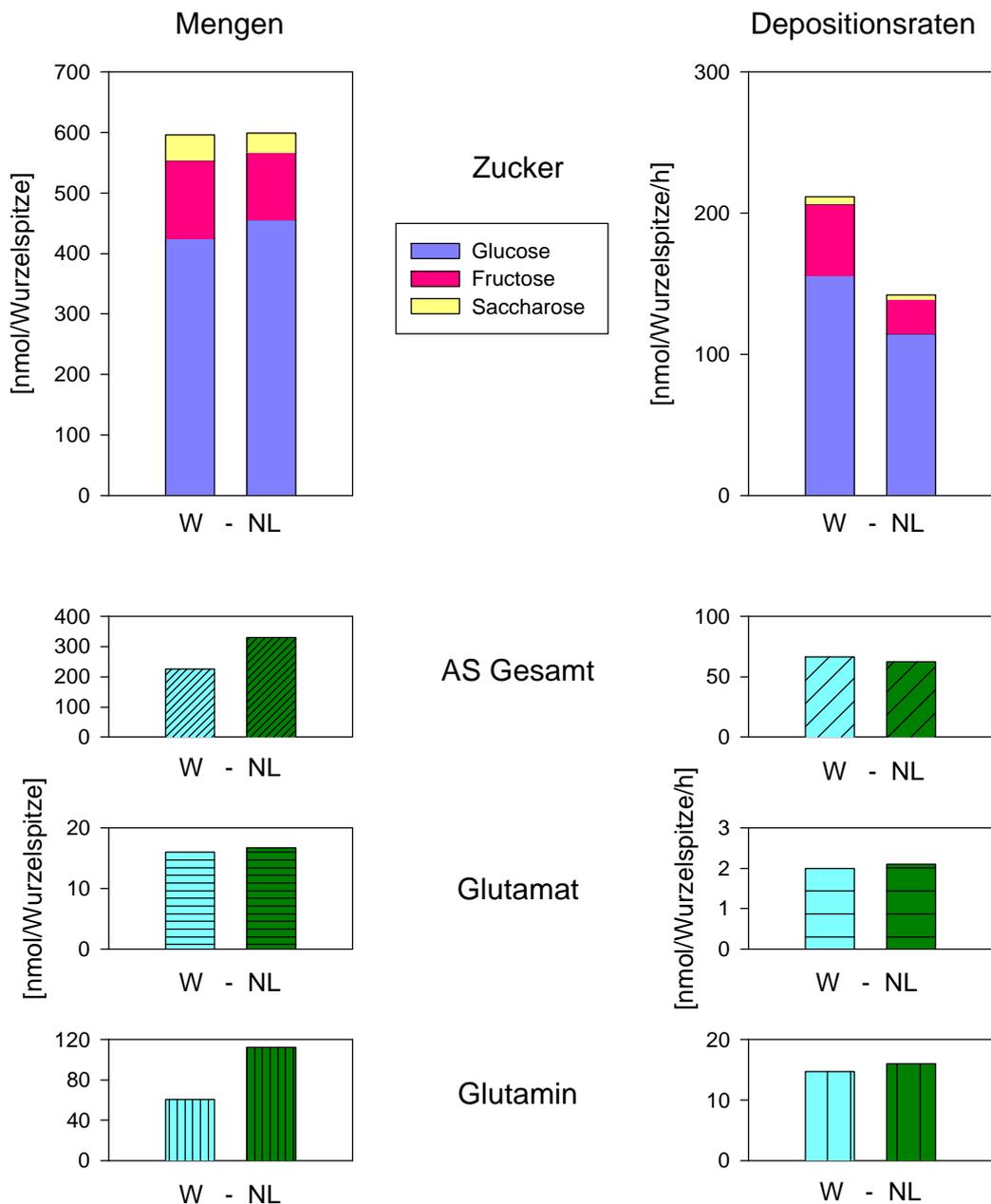
Hier werden die Konzentrationen und Depositionen nicht auf die molekularen Gehalte, sondern auf die Ladungsequivalente bezogen, da für diese Stoffe nur eine summarische Betrachtung der Ladungsausgleich-Verhältnisse Sinn macht (Phosphat und Citrat: 3-fach geladen; Ca, Mg, Sulfat, Malat: 2-fach; alle anderen 1-fach).

Bei den Kationen und Anionen (Abb. 6.27) sind die Ladungsequivalentmengen in nährstofffreier Anzucht geringer als in Nährlösung (Kationen: 1370 gegenüber 1730 nmol; Anionen: 350 gegenüber 400 nmol). Dieser Unterschied stimmt mit dem Unterschied im Frischgewicht der betrachteten Wachstumszonen überein; das heisst, bezüglich der Ladungsequivalente sind die Summe der Kationen- und der Anionenkonzentrationen jeweils von der Behandlung unabhängig. Ebenso ist die Depositionssumme weder bei Kationen noch bei Anionen von der Behandlung abhängig (Kationen: 300 nmol/h; Anionen: 90 nmol/h). Die verminderten Depositionen von Ammonium und Nitrat in Wurzeln der Wasser-Anzucht werden durch erhöhte Depositionen von Natrium, bzw. Citrat, Malat und Chlorid ausgeglichen.

Ein Ladungsausgleich ist jedoch in der Wurzelwachstumszone weder bezüglich der vorhandenen noch bezüglich der netto eintransportierten Mengen zu sehen: Die Werte für Kationen liegen erheblich höher als die Werte für Anionen. Ein denkbarer Mechanismus zur Etablierung der Ladungsneutralität ist wie bereits erwähnt die Synthese von überwiegend negativ geladenen Proteinen.

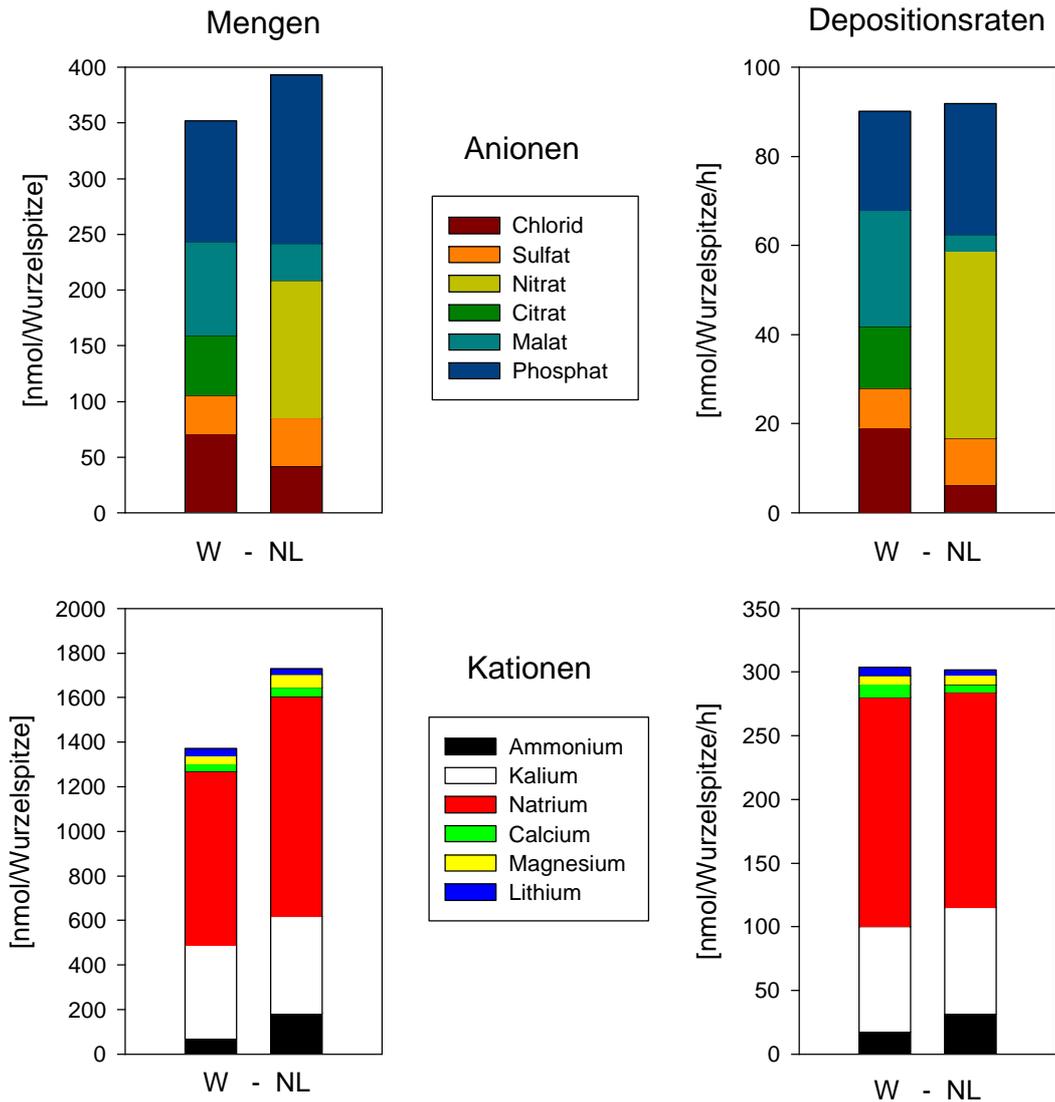
### C/N-Verhältnis

Das bezüglich der in der Wachstumszone vorliegende erhöhte C/N-Verhältnis bei Anzucht in Wasser gegenüber Anzucht in Nährlösung kommt also sowohl durch einen erhöhten Eintransport von Kohlenstoffverbindungen zustande als auch durch einen verringerten Eintransport von Nitrat und Amonium, nicht jedoch durch einen verringerten Eintransport von Aminosäuren Letzterer ist von der externen Nährstoff-Verfügbarkeit nicht beeinflusst.



**Abb. 6.26** Summe der Stoffmengen und Depositionsraten in der Wurzelwachstumszone: Zucker und Aminosäuren

(W: Anzucht in Wasser; NL: Anzucht in Nährlösung)



**Abb. 6.27 Summe der Equivalentmengen und -depositionsraten in der Wurzelwachstumszone: Anionen und Kationen**

W: Anzucht in Wasser; NL: Anzucht in Nährlösung

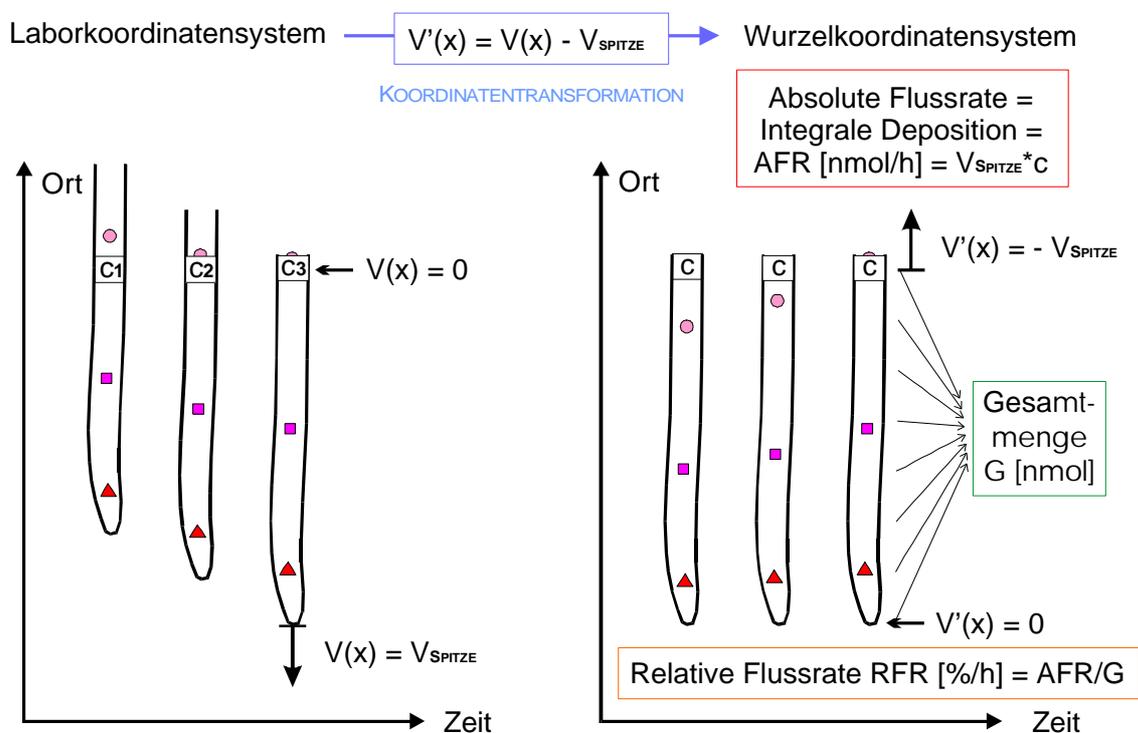
#### 6.2.4 Betrachtung von Flussraten an der basalen Grenzfläche der Wurzelwachstumszone

Ziel des nachfolgenden Abschnittes ist es, Aussagen bezüglich des Stoffaustauschs über die *Grenzfläche zwischen der Wurzelwachstumszone und dem dahinter angrenzenden, sich nicht mehr verlängernden Teil der Wurzel* zu machen. Wie gezeigt werden wird, ergeben sich daraus schussendlich Aussagen über die Sink-Source-Mechanismen der Wachstumszone.

Eine wichtige gedankliche Voraussetzung für die Betrachtung der Verhältnisse an dieser Grenzfläche ist die Verwendung des **Wurzelkoordinatensystems** (Abb. 6.28):

Aus der Sichtweise des Wurzelkoordinatensystems bleibt die Wurzelspitze stets an derselben Stelle. Die Expansion der Zellen innerhalb der Wurzelwachstumszone bringt es mit sich, dass aus der Wachstumszone stetig Gewebe nach hinten abgegeben wird. Innerhalb der Wachstumszone nimmt die Geschwindigkeit dieses Vorgangs nach hinten kontinuierlich zu (vergleiche  $v_x$  in Abb. 6.7 B und in Abb. 6.30). Vom Erreichen der Grenzfläche an bleibt die Geschwindigkeit konstant, mit der ein Gewebe-Element nach hinten transportiert wird.

Für die Inhaltsstoff-Konzentrationsprofile ergeben sich im Wurzelkoordinatensystem stets konstante Verteilungen, die meist entweder ein konstant ansteigendes oder ein konstant abfallendes Verhalten zeigen. Stets nähern sich die Konzentrationen asymptotisch dem Wert am Ende der Wachstumszone an. Im Laborkoordinatensystem würde sich die Konzentration (aufgrund der Bewegung der Wurzel) ständig ändern.



**Abb. 6.28** Berechnung von Absoluten und Relativen Flussraten im Wurzelkoordinatensystem

Beide Größen quantifizieren den Stoffaustausch zwischen der Wurzelwachstumszone und dem dahinter liegenden, sich nicht mehr verlängernden Teil der Wurzel.

### Absolute Flussrate (AFR)

Der Transport eines bestimmten Inhaltsstoffes aus der Wachstumszone in den dahinter liegenden, sich nicht mehr verlängernden Teil der Wurzel hinein, ergibt sich aus dem Produkt der Geschwindigkeit und der Konzentration (Menge/Segment) an dieser Stelle. Da sowohl die Konzentration als auch die Geschwindigkeit über den Tag hinweg konstant bleiben, herrscht stets die gleiche Flussrate aus der Wachstumszone heraus nach hinten. Die Flussrate eines bestimmten Stoffes ist dabei um so höher, je höher seine Konzentration am Ende der Wachstumszone ist (die

Geschwindigkeit, mit der die Konzentration multipliziert wird, bleibt jeweils gleich). Die Flussrate entspricht genau der integralen Netto-Deposition des Stoffes in die Wachstumszone hinein: Alles, was die Wachstumszone über die genannte Grenzfläche verlässt und damit Bestandteil der nicht mehr wachsenden Wurzel wird, muss zuvor in die Wachstumszone hinein deponiert worden sein; entweder a) aus dem externen Substrat, b) via Leitgewebe aus den dahinter liegenden Teilen der Pflanze. Weiterhin trägt c) die Verteilung und Intensität metabolischer Prozesse innerhalb der Wachstumszone zur Veränderung der Stoffdeposition und damit zum spezifischen Transport aus der Wachstumszone bei.

### *Relative Flussrate (RFR)*

Diese Flussrate kann nun in Beziehung gesetzt werden zur Gesamtmenge des jeweiligen Stoffes in der Wachstumszone. Die Gesamtmenge ergibt sich aus der Summation der in den einzelnen Segmenten gemessenen Gehalte. Der Quotient aus Flussrate und Gesamtmenge gibt die relative Flussrate dieses Stoffes aus der Wachstumszone in die sich nicht mehr verlängernde Wurzel an und kann für Vergleiche zwischen verschiedenen Substanzen oder Behandlungen oft eine sehr aussagekräftige Größe sein.

### **Biomasse-Flussraten**

Begonnen wird diese Betrachtung mit den Verhältnissen der Biomasse, für die die oben genannten Überlegungen in gleicher Weise zutreffen, wie für Inhaltsstoffe der Wurzel. Die Berechnung der Biomassenflüsse ist darüber hinaus von zentraler Bedeutung für die Charakterisierung des Wachstumsverhaltens unter veränderten externen Bedingungen, da sie selbst eine Bezugsgröße zur Einordnung der Substanz-Flussraten darstellt.

Am Ende der Wachstumszone herrscht eine Geschwindigkeit von 2,63 (Wasser) bzw. 1,89 (Nährlösung) mm/h. Die spezifischen Frischgewichte der letzten Segmente betragen 0,5 bzw. 0,69 mg/mm. Setzt man diese Werte in die Formel zur Berechnung der **absolute Flussrate** ein (Abb. 6.28), dann ergibt sich ein Wert von  $2,63 * 0,5 = 1,3$  [mg/h] in nährstofffreier, sowie ein Wert von  $1,89 * 0,69 = 1,3$  [mg/h] in nährstoffhaltiger Lösung (Tab. 6.2). In beiden Fällen wird also pro Zeiteinheit gleich viel Biomasse produziert. Die Gültigkeit dieser Aussage kann anhand der Frischgewichtsbestimmung der kompletten Wurzel verifiziert werden (Abb. 6.1): Die Wurzeln sind nach drei Tagen in beiden Behandlungen gleich schwer.

Die Gesamtmasse  $G_{\text{Bio}}$  der Wurzelwachstumszone unterscheidet sich jedoch: Für Wurzeln aus Wasser-Anzucht ergibt sich ein Wert von 5,3 mg; in Nährlösung ein Wert von 6,4 mg (siehe Abb. 6.20). Das bedeutet im Hinblick auf die **relative Flussrate** der Biomasse:

Eine Wurzelwachstumszone aus Wasseranzucht gibt pro Stunde einen Bruchteil von  $100 * 1,3 / 5,3 = 24,5$  % an den weiter hinten liegenden, nicht mehr wachsenden Teil der Wurzel ab; eine Wachstumszone aus Nährlösungsanzucht gibt dagegen pro Stunde lediglich einen Bruchteil von 19,9 % an diesen Teil der Wurzel ab. Somit ist gezeigt, dass die **relative Wuchsrates** der Wachstumszone bei Anzucht in Wasser höher ist als bei Anzucht in Nährlösung. Bei Wurzeln aus Wasseranzucht befindet sich nach einer Stunde etwa 1/4; bei Wurzeln aus Nährlö-

sungsanzucht etwa 1/5 der Ausgangsmasse der Wachstumszone im nicht mehr wachsenden Bereich der Wurzel.

### *Differenzflussraten*

Die berechneten Werte des Biomasse-Flusses können auch als **Bezugsgrößen für die Flussraten der Inhaltsstoffe** dienen. Weist eine bestimmte Substanz eine höhere relative Flussrate auf als die Biomasse, so bedeutet dies, dass der ‚Ausfluss‘ dieser Substanz (in diesen ‚Fluss‘-Begriff gehen Transport und Metabolismus ein) mit der herausfliessenden Biomasse dessen Eintritt in die Wachstumszone (via Aufnahme aus der Rhizosphäre, Leitgewebe oder Synthese vor Ort) überschreitet; die Wachstumszone stellt bezüglich dieser Substanz ein Source-Gewebe für den Rest der Wurzel dar. Wären die Verhältnisse ausgeglichen, so müsste der Austransport des Inhaltsstoffes dem Austransport der Biomasse entsprechen. Ist der Austransport der betrachteten Substanz geringer als der Biomasseaustransport, so stellt die Wurzelwachstumszone für den betrachteten Stoff ein Sink-Gewebe dar.

*Die Differenz zwischen der relativen Flussrate der Biomasse und der relativen Biomasse einer Substanz wird nachfolgend ‚relative Differenzflussrate‘ genannt. Die absolute Differenzflussrate* errechnet sich als Produkt aus relativer Differenzflussrate und Gesamtmenge des Inhaltsstoffes in der Wachstumszone.

Wie den vorangehenden Betrachtungen entnommen werden kann, ist die absolute Differenzflussrate um so höher (Wachstumszone als Source), je stärker das Konzentrationsprofil der betrachteten Substanz vom Meristem zur Basis der Elongationszone hin ansteigt: Wenn der Anstieg des Konzentrationsprofils den Anstieg des spezifischen Frischgewichtsprofils überschreitet, ist die relative Flussrate der Substanz höher als die relative Flussrate der Biomasse und es ergibt sich eine positive relative Differenzflussrate. Fällt das Konzentrationsprofil dagegen vom Meristem zur Basis der Elongationszone ab (Wachstumszone als Sink), so verlässt nur ein geringer Teil der in der Wachstumszone befindlichen Substanzmenge die Wachstumszone via Biomasse-Austransport; die relative Differenzflussrate nimmt einen negativen Wert an.

### **Flussraten von Inhaltsstoffen**

Für alle Inhaltsstoffe mit nachweisbaren Konzentrationen ergeben sich positive absolute Flussraten in den nicht mehr wachsenden Teil der Wurzel hinein (Tab. 6.2). Die relativen Flussraten der untersuchten Inhaltsstoffe bewegen sich in einem Bereich von 10 bis 40 % für Wurzeln aus Wasseranzucht; bzw. in einem Bereich von 9 bis 34 % für Wurzeln aus Nährlösungsanzucht.

Bezüglich der Sink-source-Mechanismen der Wurzelwachstumszone kann dabei folgendes für die jeweiligen Substanzen ausgesagt werden:

#### *Zucker*

Glucose und Fructose zeigen in beiden Behandlungen positive relative Differenzflussraten; in Wasser-Anzucht treten jedoch deutlich höhere Werte auf (Tab. 6.2). Bei Glucose findet sich in Wasseranzucht eine relative Differenzflussrate von 12 %/h (Fructose: 15 %/h); in Nährlösungs-

anzuchten ergibt sich eine relative Differenzflussrate von 5 %/h (Fructose: 2,3 %/h). Saccharose zeigt in beiden Behandlungen eine negative Differenzflussrate von vergleichbarer Intensität (-12 %/h in Wasseranzucht; -11 %/h in Nährlösungsanzucht). Aufgrund der physiologischen Rolle und der aus der Literatur bekannten enzymatischen Ausstattung sind diese Ergebnisse qualitativ zu erwarten: Saccharose ist die vorwiegende Transportform für den Eintransport in das wachsende Gewebe; dort wird unter Saccharoseverbrauch Glucose und Fructose synthetisiert, wovon ein gewisser Teil nicht in der Wachstumszone (für Respiration, Zellwandaufbau, allgemeinen Biomasseaufbau) verbraucht, sondern nach hinten abgegeben wird. Der größere Anteil von Hexosen, der bei Wurzeln aus Wasseranzucht an die ‚Restwurzel‘ abgegeben wird, könnte dadurch zu erklären sein, dass Wurzeln aus Nährlösungsanzucht eine höhere respiratorische Aktivität besitzen als Wurzeln aus Wasseranzucht.

### *Aminosäuren*

In Wurzeln aus Wasser-Anzuchten zeigen die Aminosäuren eine leicht positive relative Differenzflussrate (5 %/h). Dies entspricht einer absoluten Differenzflussrate von 11 nmol/h. In Wurzeln aus Nährlösungsanzuchten liegt die Differenzflussrate praktisch bei Null (Tab. 6.2).

Bezüglich der einzelnen Aminosäurespezies sind in Wasseranzucht Asparagin (3,9 nmol/h), Alanin (2,9 nmol/h) und Glycin (2,0 nmol/h) diejenigen Spezies, die am stärksten zum Aminosäuren-Ausfluss beitragen. Glutamat (-1,9 nmol/h) und Asparaginsäure (-1,6 nmol/h) stellen die Komponenten des stärksten Eintransports dar. In Nährlösung sind es dieselben Aminosäuren, die hauptsächlich (mit lediglich verringerter Intensität) zum Ausfluss beitragen. Der Eintransport geschieht hier vornehmlich in Form von Glutamin (-6,3 nmol/h). Dieses wird zwar bezüglich seiner Depositionsratenverteilung in Wurzeln aus Wasseranzuchten und Nährlösungsanzuchten vergleichbar deponiert; in Wurzeln aus Nährlösungsanzuchten verlässt jedoch nur noch ein sehr geringer Teil dieser Aminosäure via Biomasse-Ausfluss die Wurzelwachstumszone.

### *Kationen und Anionen*

Hier tritt der deutlichste Unterschied zwischen Wurzeln aus Wasser-Anzuchten und Nährlösungs-Anzuchten bei Nitrat auf (Tab. 6.2): Bei Anzucht in Nährlösung verlässt sehr viel Nitrat via Biomasse-Ausfluss die Wurzel (relative Differenzflussrate 14 %/h; absolute Differenzflussrate 18 nmol/h), was darauf schließen lässt, dass viel Nitrat in der Wurzelwachstumszone selbst aufgenommen wird. Die übrigen Nährelemente zeigen viel ausgeglichene Verhältnisse. In Wasseranzucht muss der Austransport theoretisch dem Eintransport entsprechen (Differenzflussraten müssen theoretisch Null sein); in Nährlösung weisen die geringen Differenzflussraten darauf hin, dass sich Aufnahme in der Wachstumszone selbst und Eintransport via Leitgewebe die Waage halten.

Bei Malat tritt in Wurzeln der Wasser-Anzuchten eine leicht positive relative Differenzflussrate auf (6,6 %/h); in Wurzeln aus Nährlösungsanzucht ist dagegen eine negative Differenzflussrate zu beobachten (-8,8 %/h). Dies deutet darauf hin, dass Malat je nach externer Nährstoffverfügbarkeit in der Wurzel synthetisiert (oder eintransportiert) werden kann.

Tab. 6.2 Flussraten an der basalen Grenzfläche der Wurzelwachstumszone von Mais

Menge: Gesamtgehalt aller zehn Segmente der Wachstumszone. abs. steht für absolut, rel. für relativ, Diff.flussrate für Differenzflussrate. Die höchsten Werte der relativen Flussrate sind rot markiert, die niedrigsten blau.

Inhaltsstoff	Anzucht in Wasser					Anzucht in Nährlösung				
	Men- ge	Flussrate		Diff.flussrate		Men- ge	Flussrate		Diff.flussrate	
		abs.	rel.	abs.	rel.		abs.	rel.	abs.	rel.
	nmol	nmol/h	%/h	nmol/h	%/h	nmol	nmol/h	%/h	nmol/h	%/h
<b>Biomasse</b>	5,3 mg	1,3 mg/h	<b>24,5</b>	-	-	6,4 mg	1,3 mg/h	<b>19,9</b>	-	-
<b>Glucose</b>	425	156	<b>37</b>	52	12	456	114	<b>25</b>	24	5
<b>Fructose</b>	129	51	<b>39</b>	19	15	111	25	<b>22</b>	2,5	2,3
<b>Saccharose</b>	42	5,3	<b>13</b>	-5,0	-12	33	2,9	<b>9</b>	-3,6	-11
<b>Nitrat</b>	0	0	-	0	-	123	42	<b>34</b>	18	14
<b>Citrat</b>	18	4,6	<b>26</b>	0,2	1,2	0	0	-	0	-
<b>Malat</b>	42	13	<b>31</b>	2,8	6,6	17	1,9	<b>11</b>	-1,5	-8,8
<b>Chlorid</b>	71	19	<b>27</b>	1,8	2,5	42	6	<b>15</b>	-2,0	-4,8
<b>Sulfat</b>	17	4,3	<b>26</b>	0,2	1,1	22	5,2	<b>24</b>	0,9	4,2
<b>Phosphat</b>	36	7,4	<b>20</b>	-1,5	-4,0	50	9,8	<b>19</b>	-0,2	-0,4
<b>Kalium</b>	416	83	<b>20</b>	-19	-4,6	435	84	<b>19</b>	-2,5	-0,6
<b>Calcium</b>	17	5,3	<b>31</b>	1,2	6,8	21	3,1	<b>15</b>	-1,1	-5,1
<b>Magnesium</b>	19	3,3	<b>17</b>	-1,4	-7,2	29	3,8	<b>13</b>	-2,0	-6,7
<b>Natrium</b>	782	180	<b>23</b>	-11	-1,4	988	169	<b>17</b>	-27	-2,8
<b>Ammonium</b>	72	17	<b>24</b>	-0,3	-0,4	182	31	<b>17</b>	-4,9	-2,7
<b>Lithium</b>	16	3,2	<b>21</b>	-0,6	-3,8	13	1,8	<b>14</b>	-0,7	-5,6
<b>AS Ges</b>	225	66	<b>29</b>	11	4,9	329	63	<b>19</b>	-2,9	-0,9
<b>Gln</b>	60	14,7	<b>25</b>	0,2	0,3	112	16	<b>14</b>	-6,3	-5,6
<b>Glu</b>	16	2,0	<b>12</b>	-1,9	-12	17	2,1	<b>12</b>	-1,3	-7,5
<b>Asn</b>	33	12	<b>36</b>	3,9	12	51	12	<b>24</b>	2,0	3,9
<b>Asp</b>	11	1,1	<b>10</b>	-1,6	-14	11	1,0	<b>9</b>	-1,2	-11
<b>Ser</b>	13	3,8	<b>30</b>	0,7	5,6	15	3,0	<b>20</b>	-0,1	-0,4
<b>Val</b>	13	4,8	<b>38</b>	1,7	14	15	3,5	<b>24</b>	0,7	4,6
<b>Gly</b>	15	5,6	<b>38</b>	2,0	14	23	5,5	<b>24</b>	1,0	4,3
<b>Ala</b>	22	8,4	<b>38</b>	2,9	13	29	7,7	<b>26</b>	1,9	6,4
<b>His</b>	10	2,9	<b>29</b>	0,5	5,1	6,0	1,6	<b>26</b>	0,4	6,0
<b>Phe</b>	6,3	2,5	<b>40</b>	1,0	15	7,4	1,8	<b>24</b>	0,3	4,7
<b>Leu</b>	4,4	1,9	<b>43</b>	0,8	18	6,5	1,8	<b>27</b>	0,5	7,0

## 6.3 Einfluss des externen pH-Werts

Dem pH der Zellwand wird seit langem ein starker Einfluss auf das Wachstum zugesprochen (,acid-growth-Hypothese', siehe Kap. 1.3). Deshalb wurde der Einfluss des pH-Wertes der Nährlösung auf Wachstums- und Inhaltsstoff-Verteilungen der Wurzel eingehend untersucht.

Die Experimente hierzu wurden im Sandanzucht-Rhizotron in Davis (Kap. 2.1) an Keimlingen der Varietät FR27RHM  $\times$  FRM017RHM durchgeführt. In der Bodenlösung des Sandes wurden verschiedene, zeitlich konstante pH-Werte eingestellt. Nach der ,acid growth'-Hypothese hätte bei niedrigen pH-Werten eine gesteigerte Wachstumsaktivität erwartet werden können. Messungen des pH-Wertes an der Rhizodermis der Pflanzen im verwendeten Aufbau (Walter et al. 2000) zeigten dort einen um maximal 0,2 Einheiten gegenüber der Bodenlösung abgepufferten Wert.

### 6.3.1 Wachstum

Bezüglich der absoluten Wuchsrates der Keimlingswurzel konnte im untersuchten pH-Bereich keine Reaktion auf die externen Verhältnisse festgestellt werden.  $V_{\text{Spitze}}$  der untersuchten Populationen betrug bei pH-Werten von 4,2 bis 8,6 jeweils 2 mm/h (Abb. 6.29). Die mit Hilfe von Punktmarkierungen untersuchten Wachstumsverteilungen zeigen, dass ein unterschiedlicher externer pH-Wert darüber hinaus keinen Einfluss auf die Form der REGR- oder  $v(x)$ -Verteilungen hat (Abb. 6.30). Die intraspezifische Variabilität der absoluten Wuchsrates tritt auch in diesem Experiment deutlich zu Tage. Bei 30 zur Vermessung ausgewählten Wurzeln traten Werte zwischen 1,2 und 2,6 mm/h auf.

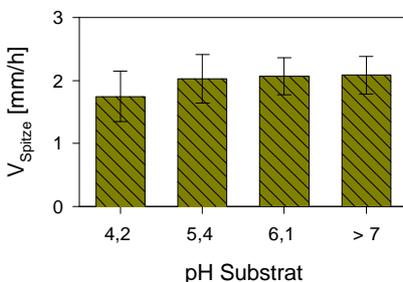


Abb. 6.29 Einfluss des Substrat-pH in Sand auf das Wachstum

pH>7 steht für eine Population (je 20 Keimlinge) bei pH 7 sowie zwei Populationen bei pH 8,6. Alle übrigen Werte stammen aus Vermessungen von drei Populationen bei dem angegebenen externen pH-Wert.

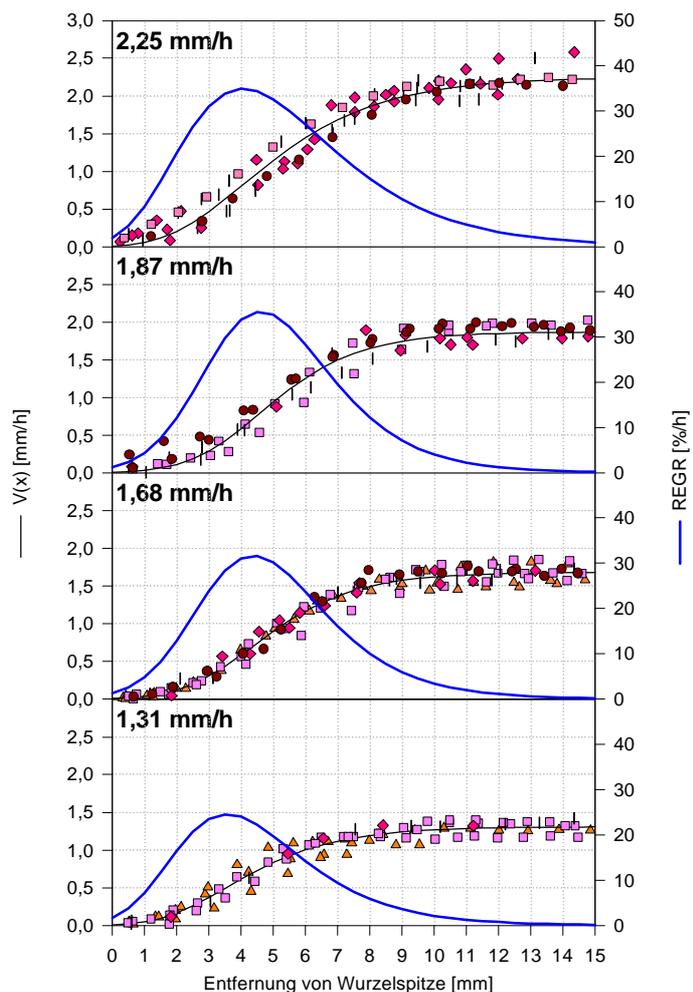


Abb. 6.30 Einfluss des Substrat-pH auf REGR- und  $V(x)$ -Verteilungen

Die Teilabbildungen sind nach absteigenden Werten von  $V_{\text{Spitze}}$  geordnet (jeweils links oben angegeben); die Symbole stehen für den externen pH: Dreieck: pH 4,2; Quadrat pH 5,4; Raute pH 6,2; Kreis pH>7.

### 6.3.2 Inhaltsstoffverteilungen

Bezüglich der Inhaltsstoffverteilungen ergaben sich bei unterschiedlichen externen pH-Werten signifikante Unterschiede zwischen den Wurzeln der einzelnen Anzuchten (Abb. 6.31). Der Unterschied ist sehr klar bereits bei Betrachtung der integralen Verhältnisse zu sehen: Bei niedrigem pH treten höhere Magnesium- sowie deutlich erhöhte Calcium-Konzentrationen als bei hohem externen pH-Wert in den untersuchten Wurzeln auf. Bei Magnesium ergibt sich eine 1,7-fach erhöhte Konzentration im Vergleich von pH 4,2 und pH >7; bei Calcium tritt ein Faktor von fünf auf. Kaliumkonzentrationen sind vom pH-Wert dagegen nicht beeinflusst.

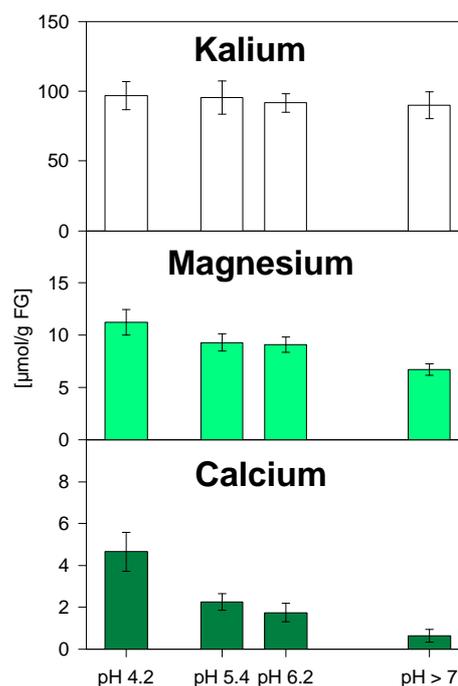


Abb. 6.31 Einfluss des Substrat-pH auf die mittleren Kationengehalte von Maiswurzeln

#### Räumliche Verteilung von Konzentrationen und Depositionsraten in den Wachstumszonen

Die Konzentrationsprofile aller drei Kationen nehmen vom Meristem zur Basis der Wachstumszone hin ab (Abb. 6.32 oben) und bestätigen damit die auch in Wurzeln hydroponischer Anzuchten gefundenen Verhältnisse. Im Abstand von sechs Stunden durchgeführte Messungen ergaben auch hier keine signifikante zeitliche Änderung der Konzentrationen (Daten nicht gezeigt).

Die Konzentrationen von **Kalium** und **Magnesium** in Wurzeln der Sandanzucht-Rhizotron-Kulturen (pH 6,2: Kalium im Mittel 100 µmol/g FG; Magnesium 10 µmol/g FG) liegen deutlich über den entsprechenden Werten der Durchfluss-Rhizotron-Experimente (Abb. 6.24; Ingestad-Nährlösung gepuffert auf pH 6,0: Kalium 70 µmol/g FG; Magnesium 4 µmol/g FG). Für **Calcium** werden in Wurzeln der Sandanzucht-Experimente dagegen niedrigere Konzentrationen gefunden (2 µmol/g FG gegenüber 3,5 µmol/g FG). Bedingt durch die andere Anzuchtform entwickelten die Wurzeln in Sandanzucht um den Faktor zwei höhere Biomassedichten [mg FG/mm], als die Wurzeln aus der Anzucht im Durchfluss-Rhizotron. Dies kann zu einem unterschiedlichen Verdünnungseffekt der Kationengehalte in der Biomasse geführt haben; allerdings wurden auch verschiedene Varietäten von Mais verwendet.

Die **Depositionsratenverteilung** von Calcium ist allgemein homogener als diejenige von Kalium oder Magnesium (Abb. 6.32 unten). Die erhöhten Konzentrationen von Calcium bei niedrigen pH-Werten gehen mit durchgängig erhöhten Depositionsraten einher. Für alle drei Kationen findet eine Deposition bevorzugt **apikal der Stelle maximaler Wachstumsintensität** statt. Für Calcium werden maximale Depositionsraten von 1 nmol/mm/h gefunden; für Magnesium 2 nmol/mm/h; für Kalium 30 nmol/mm/h. Die integrierten Depositionsraten bei pH 6.2 betragen für Calcium 1,3 nmol/h (Faktor drei niedriger als im Durchfluss-Rhizotron; vergleiche Tab. 6.2); für Magnesium 9,5 nmol/h (Faktor drei höher) und für Kalium 130 nmol/h (Faktor 1,5 höher).

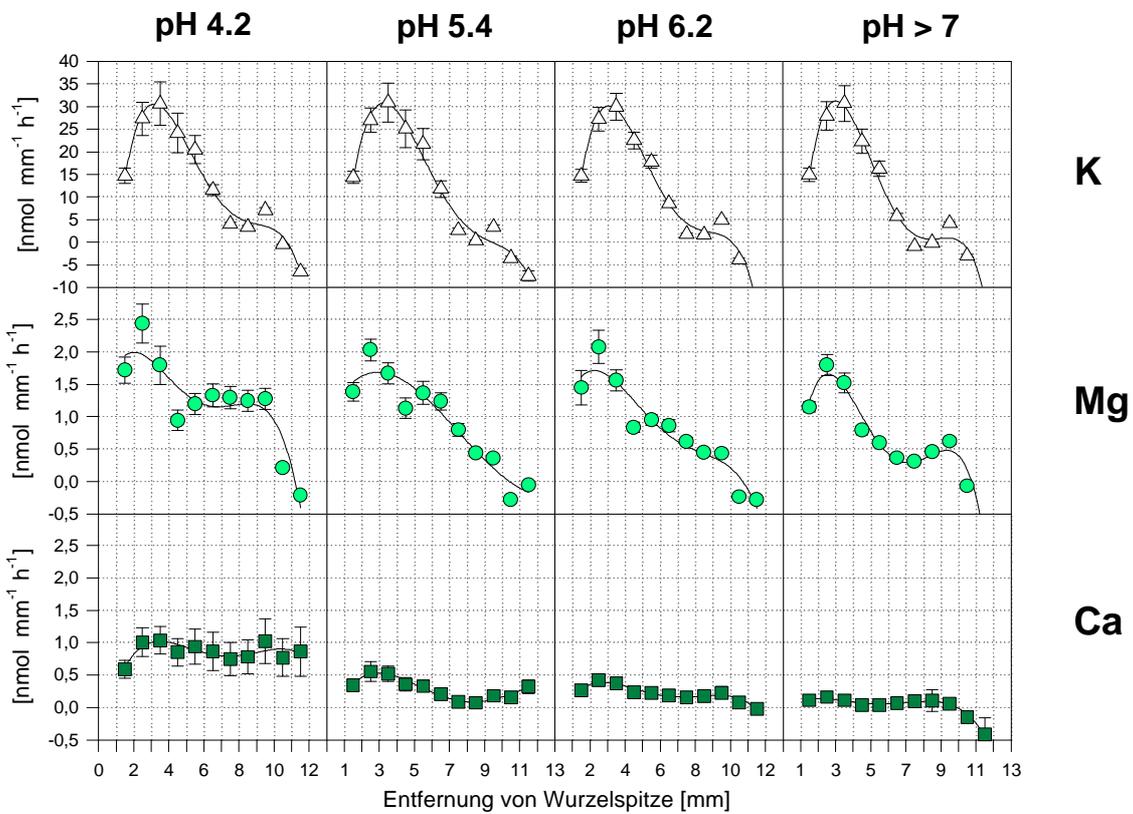
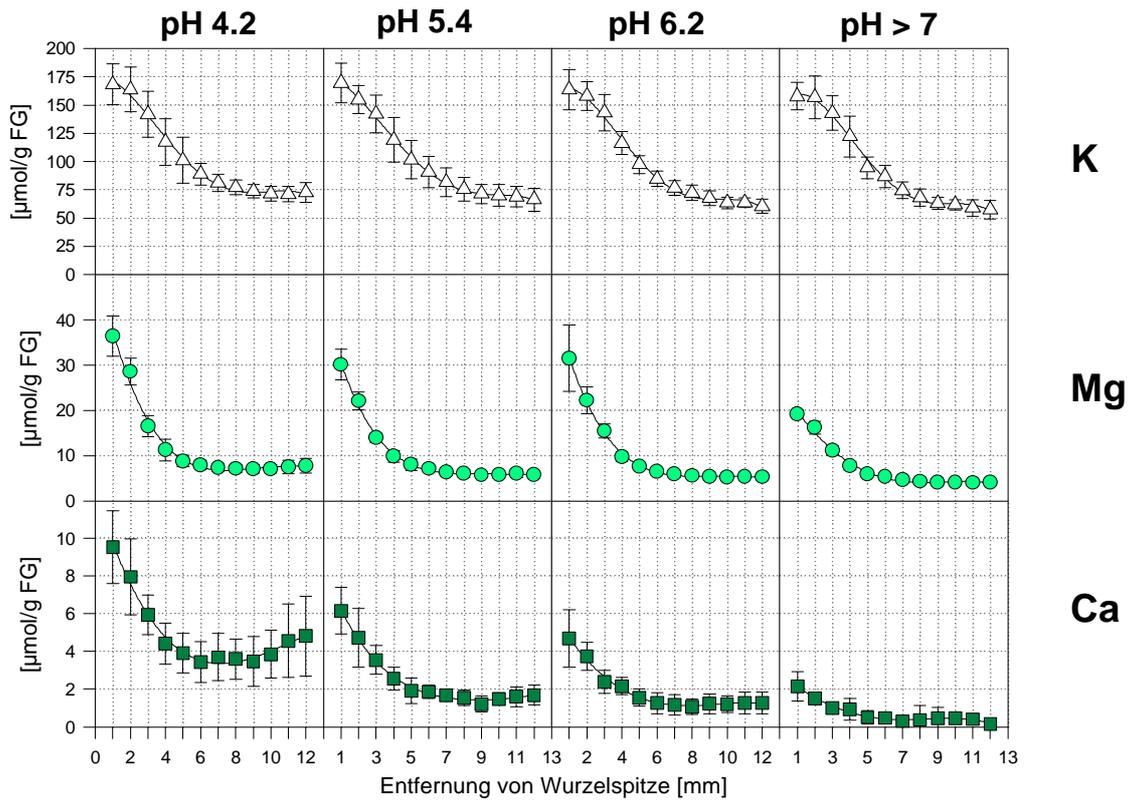


Abb. 6.32 Konzentrations-(oben) und Depositionsratenverteilungen von Kalium, Magnesium und Calcium bei unterschiedlichem pH der Bodenlösung in Sandanzuchten

## 6.4 Einfluss der Temperatur

Der Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von Wurzeln wurde in der Literatur in statischen Experimenten (konstante Temperatur während der Dauer der Kultivierung) bereits gut dokumentiert (z.B. Pahlavanian und Silk 1988). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die starke Abhängigkeit der absoluten Wuchsrate von der Temperatur bei statischen Experimenten untersucht werden: Unter Standardbedingungen treten bei 21 °C mittlere Werte für  $V_{\text{Spitze}}$  von  $1,2 \pm 0,5$  mm/h auf; bei 26 °C liegt der Mittelwert bei  $2,6 \pm 0,6$  mm/h, also etwa doppelt so hoch (vergleiche Abb. 6.5, Abb. 6.8 (jeweils 21 °C) und Abb. 6.18 (26 °C)).

Über die zeitliche Dynamik während einer Temperaturänderung konnte bislang jedoch noch nichts ausgesagt werden. Ziel der Untersuchungen dieses Abschnittes war daher, räumlich und zeitlich hoch aufgelöst die Reaktion einer Wurzelwachstumszone auf einen Temperatursprung zu untersuchen. Dabei wurde die Temperatur im Durchfluss-Rhizotron bei einem Experiment unter Standardbedingungen mit Hilfe einer Heizspirale innerhalb weniger Minuten von vorher konstant 21 °C auf 26 °C erhöht. Dieser Versuch wurde dreimal mit qualitativ identischen Ergebnissen repliziert; die dargestellten räumlich und zeitlich hoch aufgelösten Resultate beziehen sich auf einen dieser Versuche.

### *Zeitliche Dynamik der absoluten Wuchsrate*

Bei einer sprunghaften Temperaturerhöhung kann unmittelbar nach dem Temperaturwechsel eine heftige Reaktion von  $V_{\text{Spitze}}$  beobachtet werden (Abb. 6.33). Bei Mittelung der Werte von  $V_{\text{Spitze}}$  über 30 min ist die absolute Wuchsrate bereits im Zeitintervall, das auf die Temperaturänderung folgt, deutlich erhöht (von 1,4 auf 1,7 mm/h). Eine weitere halbe Stunde später ist ein Plateauwert (1,9 – 2,0 mm/h) erreicht, der in den folgenden 11 Stunden nur noch unmerklich erhöht wird. Die dabei auftretende Beschleunigung der Wurzelspitze überschreitet den Höchstwert für Geschwindigkeitsänderungen in statischen Experimenten um den Faktor 5. In statischen Experimenten konnten maximale Beschleunigungen von 0,1 mm/h festgestellt werden (Abb. 6.5); während des Temperaturwechsels lag die Beschleunigung bei etwa 0,5 mm/h.

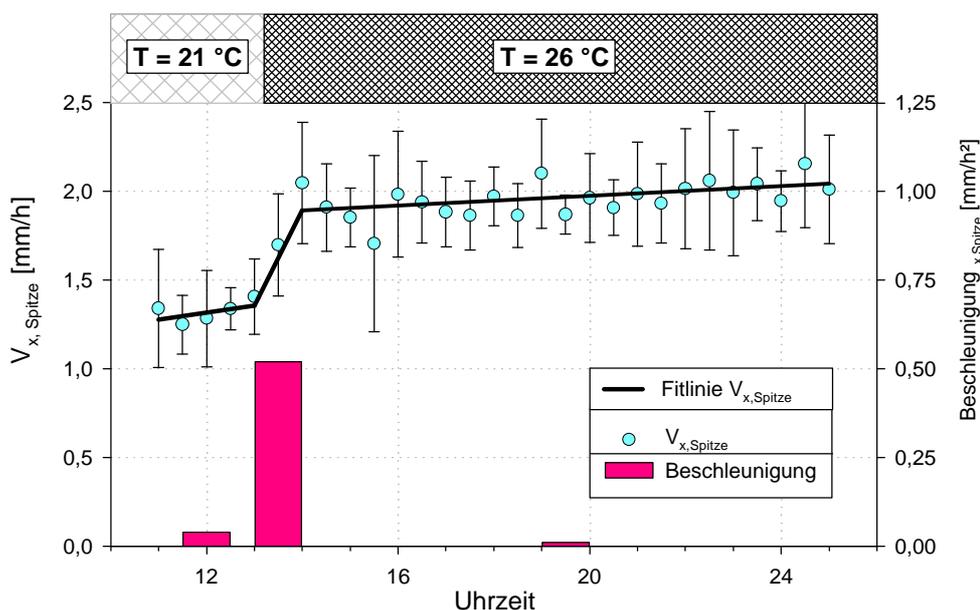


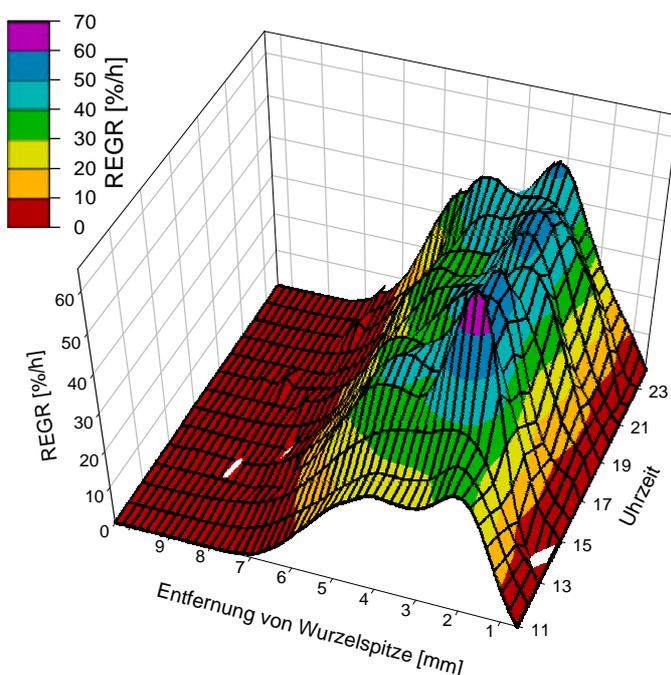
Abb. 6.33 Temperaturwechsel von 21 auf 26 °C: DISP-Messung der Entwicklung von  $V_{x, Spitze}$

### *Dynamik des Vorgangs in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung*

Ähnlich wie im Fall der Nährstoff-Verfügbarkeitsänderung ergibt sich auch hier die deutlichste Änderung der REGR-Verteilung wieder im Aktivitätszentrum wenige mm hinter der Wurzelspitze (Abb. 6.34). Dabei treten im Stundenmittel REGR-Spitzenwerte von 65 %/h unmittelbar nach dem Temperatursprung auf. Nach einigen Stunden hat sich die maximale Wachstumsrate bei 50 %/h eingependelt, während sie vor dem Temperatursprung bei 30 %/h lag. Die Zweigipfligkeit der Verteilung ist gut zu erkennen. Der vordere Aktivitätspeak ist in der Regel höher; jedoch treten auch Verteilungen im Stundenmittel auf, bei denen der hintere Aktivitätspeak höher ist (15 Uhr und 23 Uhr). Der vordere Aktivitätspeak liegt bei 21 °C zunächst nur etwas mehr als 2 mm hinter der Spitze; die Wachstumszone erstreckt sich nur wenig über 7 mm hinaus.

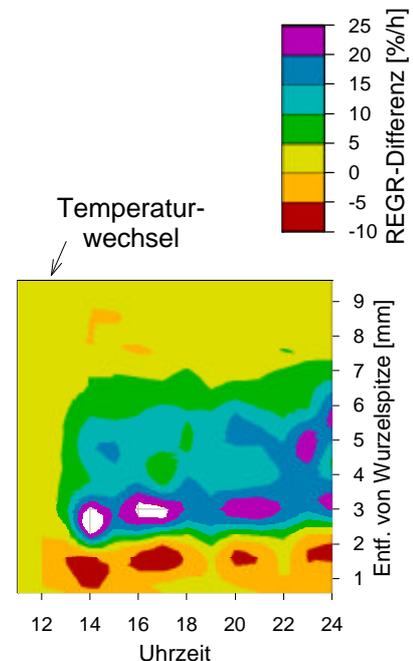
Die Änderung der räumlichen Ausdehnung der Wachstumszone kann mit Hilfe einer Differenzbildung besser veranschaulicht werden (Abb. 6.35): Berechnet man die REGR-Differenz-Werte zwischen der mittleren Verteilung vor dem Temperatursprung und dem aktuellen Stundenmittel nach dem Temperatursprung, so zeigt sich, dass sich die Wachstumszone während der Dauer des Experiments nur sehr geringfügig verlängert. Eine Wachstumsratensteigerung um 5 %/h ist bereits eine Stunde nach Temperaturwechsel 7 mm hinter der Spitze zu sehen; auch 11 Stunden nach Temperaturwechsel ist die Steigerung dort nicht größer. Die maximale Reaktion auf den Temperaturwechsel findet 3 mm hinter der Wurzelspitze statt. Eine Steigerung um 15 %/h ist in der gesamten Zone von 2,5 bis 6 mm hinter der Wurzelspitze zu erkennen.

*Die Temperaturreaktion der Wachstumszone ergab daher weitere Hinweise auf die raum-zeitliche Natur der Wachstumszone an sich sowie auf funktionelle Unterschiede zwischen den beiden Aktivitätspeaks des Wachstumsmaximums.*



**Abb. 6.34** Zeitliche Entwicklung des REGR-Profiles (Stundenmittel) bei Temperatursprung von 21 auf 26 °C

Temperatursprung fand kurz vor 13 Uhr statt.



**Abb. 6.35** REGR-Differenzen nach dem Temperaturwechsel

Farbcodierte Darstellung; deutlichste Änderungen 3 mm hinter Wurzelspitze.

## 7 Blattwachstum

Blattwachstumsuntersuchungen wurden an zwei Arten, Rizinus und Tabak, durchgeführt, um möglichst allgemeine Aussagen über das Auftreten von Wachstumsmustern in dikotylen Pflanzen zu erhalten. Von beiden Arten liegt eine große Anzahl an Studien hinsichtlich ihres Wachstums und ihrer Entwicklung vor. Aufgrund der großen Anzahl transgener Pflanzen gilt Tabak nach Arabidopsis als zweitwichtigste Modellpflanze zur Untersuchung des Blattwachstums; Rizinus hat eine vergleichbare Bedeutung bezüglich interner Stofftransportprozesse.

In beiden Arten wurden im Verlauf der Arbeit analoge raum-zeitliche Wachstumsverteilungen erhalten; die Analyse der Wechselwirkung mit externen sowie internen Parametern (Aussenbedingungen bzw. Inhaltsstoffverteilungen) wurde aus Zeitgründen vorwiegend an Tabak durchgeführt.

### 7.1 Strukturelle Heterogenität des Blattes

Ein Blatt stellt keine homogene Masse einheitlicher Zellen dar, sondern ist stets aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen aufgebaut. Selbst Zellen desselben Typs, die in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft liegen, treten in unterschiedlichen Differenzierungszuständen auf. Dadurch entstehen im wachsenden Blatt starke räumliche Entwicklungsgradienten, die sich auch in Wachstumsgradienten äußern. Die Frage, wie ein dynamisch expandierendes Blatt das Wachstum verschiedener Zelltypen in unterschiedlichen Entwicklungszuständen koordiniert, ist noch vollkommen offen. Ebenso ist es unklar, ob im Verlauf der Blattentwicklung Verschiebungen zwischen den Anteilen unterschiedlicher Zelltypen oder Gewebe zueinander auftreten. Im Verlauf dieses Abschnittes sollen Basisdaten hinsichtlich des materiell-strukturellen Aufbaus eines zuwachsenden Blattes dargestellt werden.

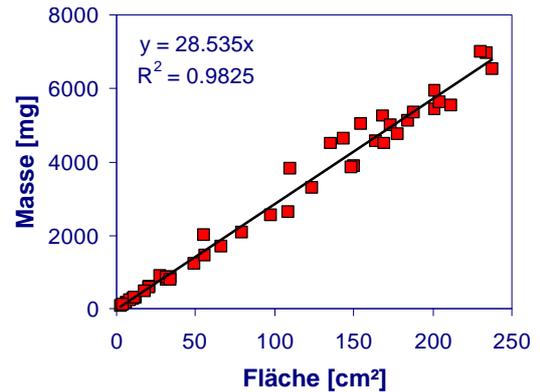
Dabei werden folgende **Aspekte der strukturellen Heterogenität** des Blattes untersucht

- Zusammenhang von Biomasse und Fläche
- Anteil von Ader und Intercostalfeld
- Anteil des Interzellularraumes
- Trockengewichtsanteil

#### 7.1.1 Zusammenhang von Biomasse und Fläche

Der Quotient aus Frischgewicht und Blattfläche wird ‚spezifische Blattmasse‘ genannt. Messungen an Tabak haben ergeben, dass die spezifische Blattmasse im Verlauf der Entwicklung konstant bleibt. Für Pflanzen einer Plexikammer-Anzucht unter Standardbedingungen (siehe Kap. 7.2) wurde ein Wert von 28,5 mg/cm<sup>2</sup> erhalten (Abb. 7.1). Dieser Befund bestätigt frühere Untersuchungen, in denen auch gezeigt werden konnte, dass die spezifische Blattmasse sich nicht signifikant zwischen Blättern unterschiedlicher Stockwerke unterscheidet (Walter 1997).

Daraus resultiert die für die Aussagekraft der DISP-Flächenzuwachs-Vermessungen wichtige Erkenntnis, dass eine Vermessung des Blattflächenzuwachses auch auf den Biomassezuwachs schliessen lässt. Da für Blätter dikotyler Pflanzen zudem bekannt ist, dass die Blattspreite während ihrer postemergenten Entwicklung eine konstante Dicke (Dose 1914) beibehält, gilt, dass die Messung des Blatt-Flächenwachstums auch dessen Frischgewicht- oder Volumenzunahme widerspiegelt.

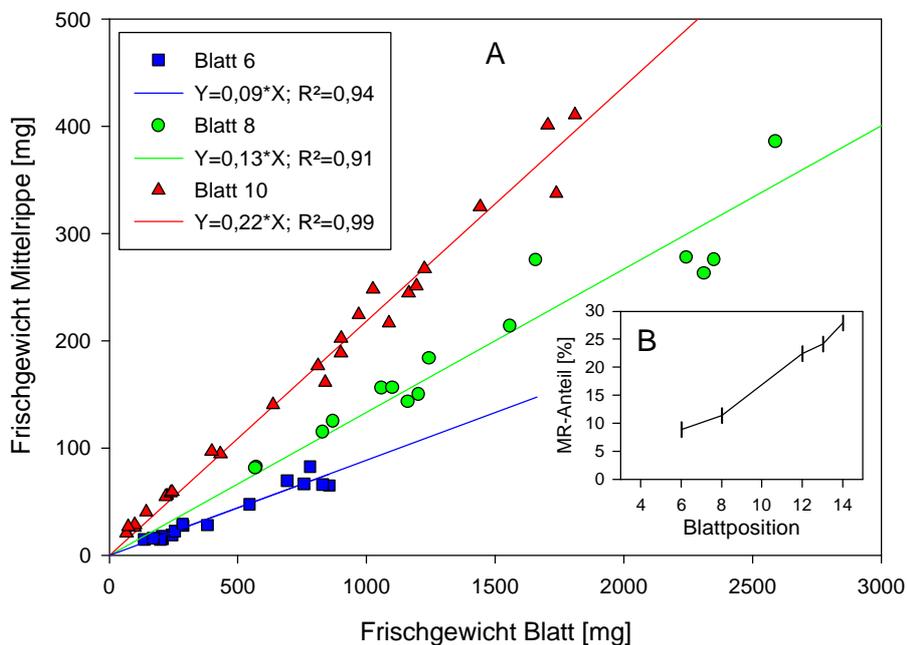


**Abb. 7.1 Spezifische Blattmasse von Tabak**  
Daten von acht Pflanzen aus der Plexikammer

### 7.1.2 Anteil von Ader und Intercostalfeld

Eine erste grobe Differenzierung des Blattgewebes stellt die Unterscheidung von Blattadern und Zwischenaderbereichen dar. Der Anteil an Rippengewebe im Blatt bleibt während der Entwicklung konstant, unterscheidet sich aber deutlich von Blattstockwerk zu Stockwerk (Abb. 7.2 A). Das Wachstum von Blattspreite und Blattrippe verläuft proportional zueinander: Rippe und Intercostalfeld wachsen gleich stark zu.

Zwischen Blättern unterschiedlicher Stockwerke besteht eine sehr unterschiedliche Gewebeverteilung: In einem späteren Entwicklungsstadium der Pflanze angelegte Blätter zeigen deutlich



**Abb. 7.2 Anteil der Mittelrippe am Blatt-Frischgewicht von Tabak**

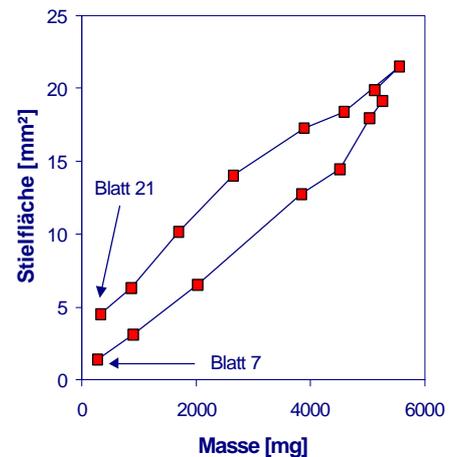
Abb. A zeigt Werte, die an einer in der Plexikammer kultivierten Population im Zeitraum von 12 Tagen erhoben wurden. Die Blätter gehörten drei unterschiedlichen Blattstockwerken an; Fitgeraden der durchschnittlichen Mittelrippenanteile und zugehörige Korrelationskoeffizienten sind in der Legende angegeben. Blatt 6 und 8 erreichten im Untersuchungszeitraum den ausgewachsenen Zustand. Abb. B zeigt die Mittelrippen-Anteile einer repräsentativen Einzelpflanze am letzten Erntetag.

höhere Mittelrippenanteile. Der Bereich der Mittelrippenanteile reicht typischerweise von unter 10 % (Blatt 6) bis etwa 30 % (Blatt 14) (Abb. 7.2 B). In Einzelfällen konnten Mittelrippenanteile von 7 % (Blatt 5) bis über 30 % (Blatt 14) gemessen werden.

Unterschiedliche Rippenanteile der Blätter verschiedener Stockwerke resultieren aus unterschiedlich großen Querschnittflächen der Mittelrippe. Die Querschnittfläche der Mittelrippe nimmt von der Basis zur Spitze hin ab. Misst man sie am Übergang von Blattstiel zu Blattspreite (,Stielfläche‘), so ist für Blätter der verschiedenen Stockwerke eine Verteilung von der Form einer Hystereseschleife zu erkennen (Abb. 7.3). Bei der Blattanlage im Apikalmeristem werden um so dickere Blattrippen angelegt, je später die Blattanlage im Verlauf der Pflanzenentwicklung erfolgt. Die Stielfläche wächst im weiteren Verlauf der Blatentwicklung weitgehend proportional zur Blattmasse an.

**Abb. 7.3 Stielfläche und Blattmasse bei Tabak**

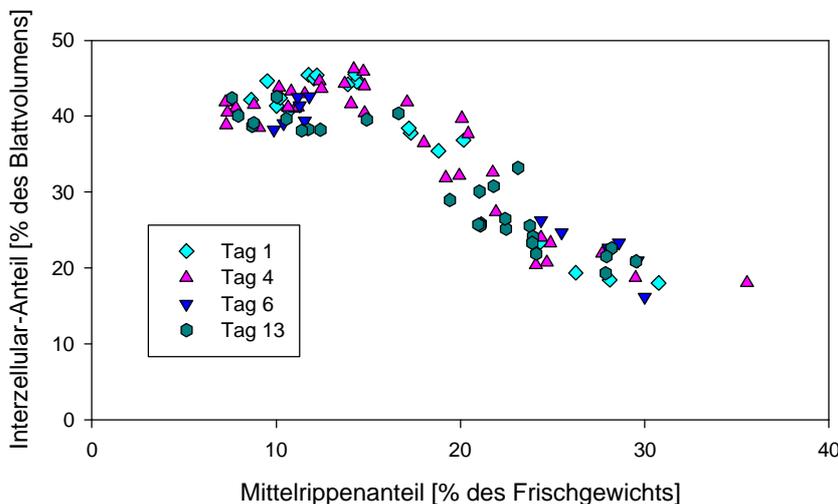
Daten der aufeinanderfolgenden Blätter einer zufällig ausgewählten Pflanze. Das noch stark zuwachsende, kleine Blatt 21 hat eine wesentlich größere Stielfläche als das ausgewachsene, gleich schwere Blatt 7. Die Abfolge der Blattstockwerke ist durch die Verbindungslinie der Datenpunkte angedeutet.



**7.1.3 Anteil des Interzellularraumes**

Zwischen dem Interzellularvolumen eines Blattes und seinem Rippenanteil besteht ebenfalls eine deutliche Korrelation: Blätter mit hohem Interzellularvolumen-Anteil haben einen niedrigen Rippenanteil und umgekehrt (Abb. 7.4).

Bei einigen Blättern wurde das Interzellularvolumen getrennt in Blattbasis und -spitze untersucht; dabei ergab sich für die Basis stets ein etwas niedrigerer Wert ( $88 \pm 5$  % des Wertes der Blattspitze). Dabei ist zu beachten, dass der Interzellularen-Anteil nur in Intercostalfeldbereich des Blates untersucht wurde und die Mittelrippe nicht in die Messung eingeschlossen war.



**Abb. 7.4 Interzellularvolumen und Mittelrippenanteil von Tabakblättern**

Das Interzellularvolumen wurde an Blättern der Stockwerke 5 bis 14 nach Abtrennen der Mittelrippe jeweils an der rechten Hälfte der Blattspreite bestimmt.

Zu jedem Messzeitpunkt war der komplette Bereich von in der Pflanze prinzipiell auftretenden Mittelrippenanteilen abgedeckt.

### 7.1.4 Trockengewichtsanteil

Unter konstanten Anzuchtbedingungen steigt auch das Trockengewicht eines Blattes – genauso wie das Frischgewicht – in etwa proportional zur Fläche an (Abb. 7.5). Der Trockengewichtsanteil (TGA) von Blättern verschiedener Stockwerke variiert jedoch wiederum. Bei Pflanzen aus Erdanzucht liegen die Trockengewichtsanteile von Tabakblättern zwischen 3 und 10 %. Das entspricht relativen Wassergehalten von 97 bis 90 %. Bei Auftragung gegen die Bezugsgröße Mittelrippenanteil ist zu sehen, dass der TGA eines Blattes um so höher ist, je höher der Rippenanteil des betreffenden Blattes ist (Abb. 7.6).

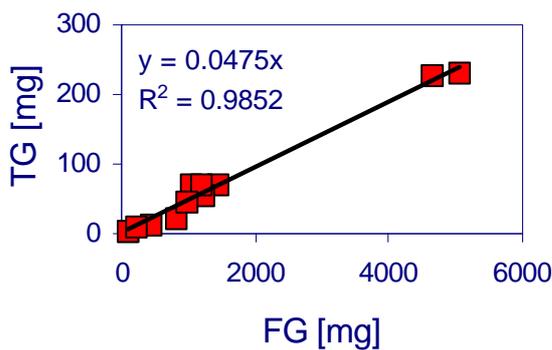


Abb. 7.5 Trockengewichtsanteil Blatt 10 Tabak

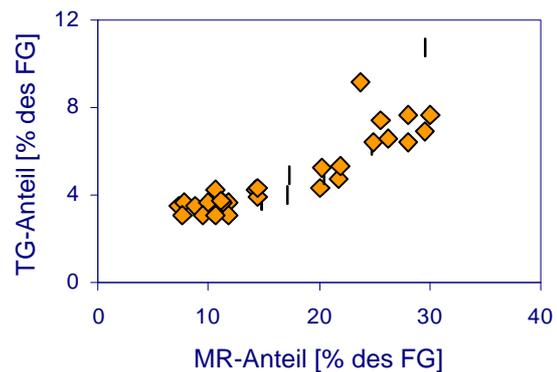


Abb. 7.6 Korrelation TGA-Mittelrippenanteil Tabak

Die Korrelation zwischen TGA und Mittelrippenanteil (Abb. 7.6) bedeutet jedoch nicht, dass die Mittelrippe einen höheren TGA als das Intercostalfeldgewebe hat und der TGA deshalb proportional zum Mittelrippenanteil zunimmt. In der Tat ist das Intercostalfeldgewebe der Ort der stärksten Akkumulation von Trockenmasse (Abb. 7.7). Ein Gradient ist von der Mittelrippe über die Seitennerven erster Ordnung bis hin zum ältesten Bereich der Intercostalfelder hin zu erkennen.

Die Korrelation zwischen TGA und Mittelrippenanteil kann also eher dahingehend interpretiert werden, dass Blätter mit hohem TGA in den Intercostalfeldern einen hohen Mittelrippenanteil ‚benötigen‘, um entweder a) eine ausreichende Stützfunktion für das etwas schwerere Blattgewebe zu gewährleisten oder b) einen höheren Anteil von Leitgewebe bereitzustellen.

Der TGA wird entscheidend von den externen Bedingungen beeinflusst. Unter ansonsten gleichen Aussenbedingungen führt die Verdoppelung der Lichtdauer zu einer Erhöhung des TGA um den Faktor 1,5 bis 2 (Abb. 7.7).

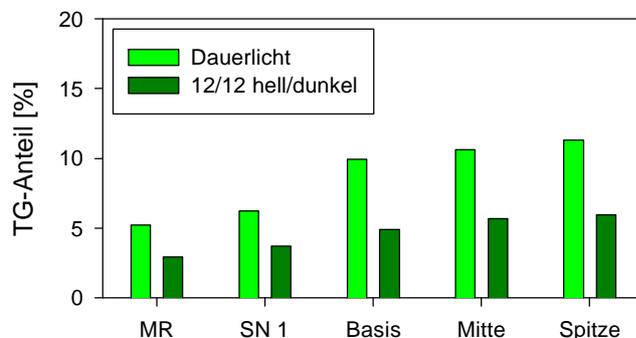


Abb. 7.7 TGA-Verteilung in Blatt 10 Tabak

Daten von zwei typischen Blättern vergleichbaren Entwicklungszustandes aus Dauerlicht und 12 h hell / 12 h dunkel unter Standardbedingungen in der Plexikammer (14:00 Uhr). Von links nach rechts: Mittelrippe, Seitennerven erster Ordnung, Intercostalfelder an Blattbasis, -mitte und -spitze.

## 7.2 Wachstum unter Standardbedingungen

Die ausführliche Charakterisierung der auftretenden Wachstumsmuster unter Standardbedingungen ist im Fall des Blattes noch wichtiger als im Fall der Wurzel. Für dikotyle Blätter existieren in der Literatur zwar einige zeitlich hochaufgelöste Untersuchungen, diese wurden jedoch unter sehr unterschiedlichen externen Bedingungen erhoben und können daher nur bedingt mit den hier erarbeiteten Ergebnissen verglichen werden. Die Wahl von Standardbedingungen für derartige Untersuchungen muss Gesichtspunkte aus drei verschiedenen Themenkreisen umfassen:

1. Technische Erfordernisse des Versuchsaufbaus
2. Auswahl der zu untersuchenden Blätter
3. Wahl von Ökofaktoren für die Anzucht

### Standardbedingungen:

Versuchsziel ist es, pflanzliches Wachstum automatisiert unter weitgehend natürlichen Wachstumsbedingungen optisch zu vermessen. Der dabei auftretende Wechsel von Tag und Nacht macht es erforderlich, im Versuchsaufbau eine physiologisch inaktive Beleuchtung (nahes Infrarot) für die Bildaufnahme einzusetzen. Zur **Lichtversorgung der Pflanzen** erwies es sich für das Gelingen einer automatisierten Vermessung als unumgänglich, **Neonröhren** zu benutzen. Deren Infrarotanteil ist sehr gering. So konnten kontinuierliche Bildsequenzen ohne eine manuelle Anpassung der Kamerablende aufgenommen werden. Eine zweite Zwangsbedingung der Messmethode ist die Fixierung des Blattes in einer Ebene. Hierfür wurde das beschriebene, zyklische Abspann-System (Kap. 4.2) mit **Anhängemassen von 12 g** verwendet.

Die Auswahl der mit der DISP-Methode zu untersuchenden Blätter geschah nach vorheriger Vermessung und Extrapolation des Wuchsratenverlaufs (Walter 1997) unter dem Kriterium, dass die Untersuchungsblätter während (des ersten Tages) des Experimentes eine **Wuchsrate von  $40 \pm 10 \%/d$**  (entspricht einem Mittelwert von etwa 1 bis 2 %/h) hatten. Die Blätter waren dann einerseits groß genug, um im Aufbau fixiert werden zu können (Tabak: ca. 10 cm lang; Rizinus: L1 ca. 8 cm) und zeigten andererseits noch über Tage hinweg eine hohe Wachstumsaktivität. Bei Tabak erfüllten stets ein bis zwei Blätter der Pflanzen (Entwicklungszustand: mindestens 15 sichtbare Blätter; Pflanzen 6 bis 10 Wochen alt) dieses Kriterium; oft konnte Blatt Nr. 12 gewählt werden. Bei Rizinus erfüllte aufgrund der geringeren Anzahl von Blattstockwerken (5 bis 8 sichtbare Blätter) bei vergleichbarem Pflanzenalter nur ein Blatt pro Pflanze dieses Kriterium (oft F2 oder F3).

Als Ökofaktoren zur Anzucht der Pflanzen in der Plexikammer wurden gewählt: **12 h hell / 12h dunkel; Lichtintensität (von 8-20 Uhr)  $150 \pm 50 \mu E$ ; Temperatur  $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ; relative Luftfeuchte  $50 \pm 10 \%$** . Die Anzuchtbedingungen der Pflanzen waren damit denjenigen in einer typischen Gewächshaus-Anzucht vergleichbar (bis auf die spektrale Qualität der Beleuchtung). Die Pflanzen zeigten in der Plexikammer vergleichbare Wuchsraten wie im Gewächshaus und erreichten die Blühreife.

### 7.2.1 Wachstumsverteilungen in verschiedenen Blattstockwerken

Da die Wachsrate jedes Blattes mit der Zeit exponentiell absinkt (vergleiche Walter 1997 sowie Walter und Schurr 1999) und Blätter im Abstand von einigen Tagen neu gebildet werden, ergibt sich entlang der Sproßachse ein charakteristischer Gradient der Wachstumsverteilung über verschiedene Blattpositionen hinweg (Abb. 7.8). Die Blätter verschiedener Blattstockwerke zeigen ein zeitlich um mehrere Tage versetztes Verhalten. Im Tagesgang konnten jedoch keine Unterschiede zwischen Blättern verschiedener Positionen festgestellt werden.

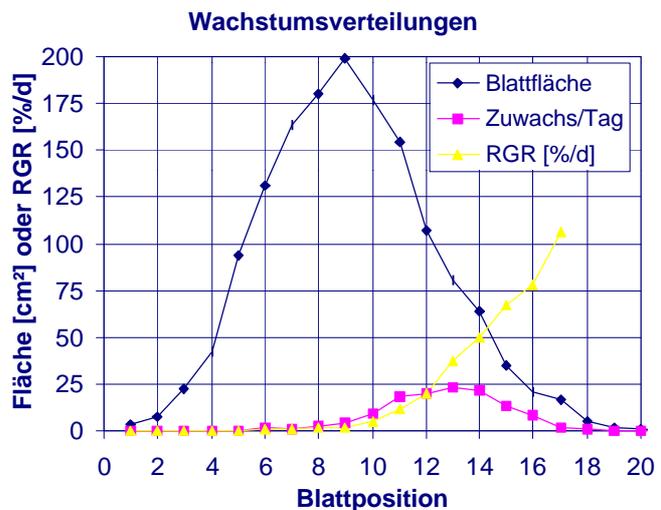


Abb. 7.8 Wachstumsverteilung entlang der Sproßachse

Blattflächen und absoluter Zuwachs sind Gauß-förmig über die Blattpositionen von Tabak hinweg verteilt; die relative Wachsrate nimmt monoton nach oben hin zu.

### 7.2.2 Nyctinastien

Sowohl Tabak als auch Rizinus weisen starke Blattbewegungen zu Beginn und zu Ende der Nachtphase auf, die Nyctinastien genannt werden. Bei Tabak ändert sich im Wesentlichen nur der Inklinationwinkel zwischen Blatt und Sproßachse (Abb. 7.9). Die natürliche Bewegung der Blätter ist dabei um so stärker, je stärker die Blätter wachsen, was auf eine Verbindung zwischen den Nyctinastien und den Flächen-Wachstumsmustern hindeutet.

Mit zunehmendem Alter eines Blattes ändert sich auch dessen Inklinationwinkel (Abb. 7.9: während der Nacht ist der Unterschied zwischen dem älteren und jüngeren Blatt zu erkennen). Diese Bewegungsform wird ‚Epinastie‘ genannt.

Bei Rizinus treten drei überlagerte Bewegungserscheinungen auf (Abb. 7.10): Tags sind die Blätter nahezu eben und horizontal ausgerichtet; bei Nacht klappen die Blätter herunter, wölben ihre Flächen glockenförmig auf und führen aus dem Blattstiel heraus Circumnutationsbewegungen durch. Bei Rizinus kann die Blattbewegung grafisch durch die Angabe des Inklinationwinkels und der Wölbung der Blattfläche veranschaulicht werden (Abb. 7.11).

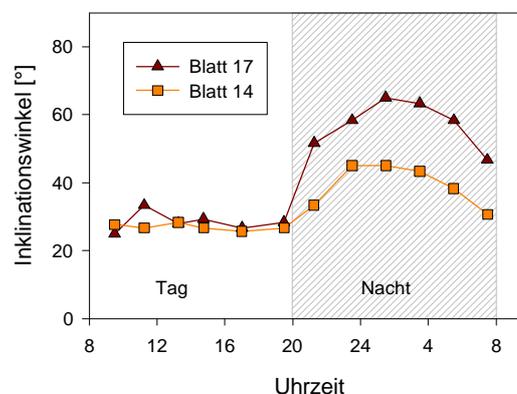


Abb. 7.9 Nyctinastische Blattbewegungen bei Tabak

Dargestellt sind Mittelwerte von 3 Pflanzen. Die Verteilung des Blattwachstums entspricht Abb. 7.8: Blatt 17 wächst nicht nur stärker zu, sondern macht auch deutlichere Auf- und Ab-Bewegungen durch als Blatt 14.

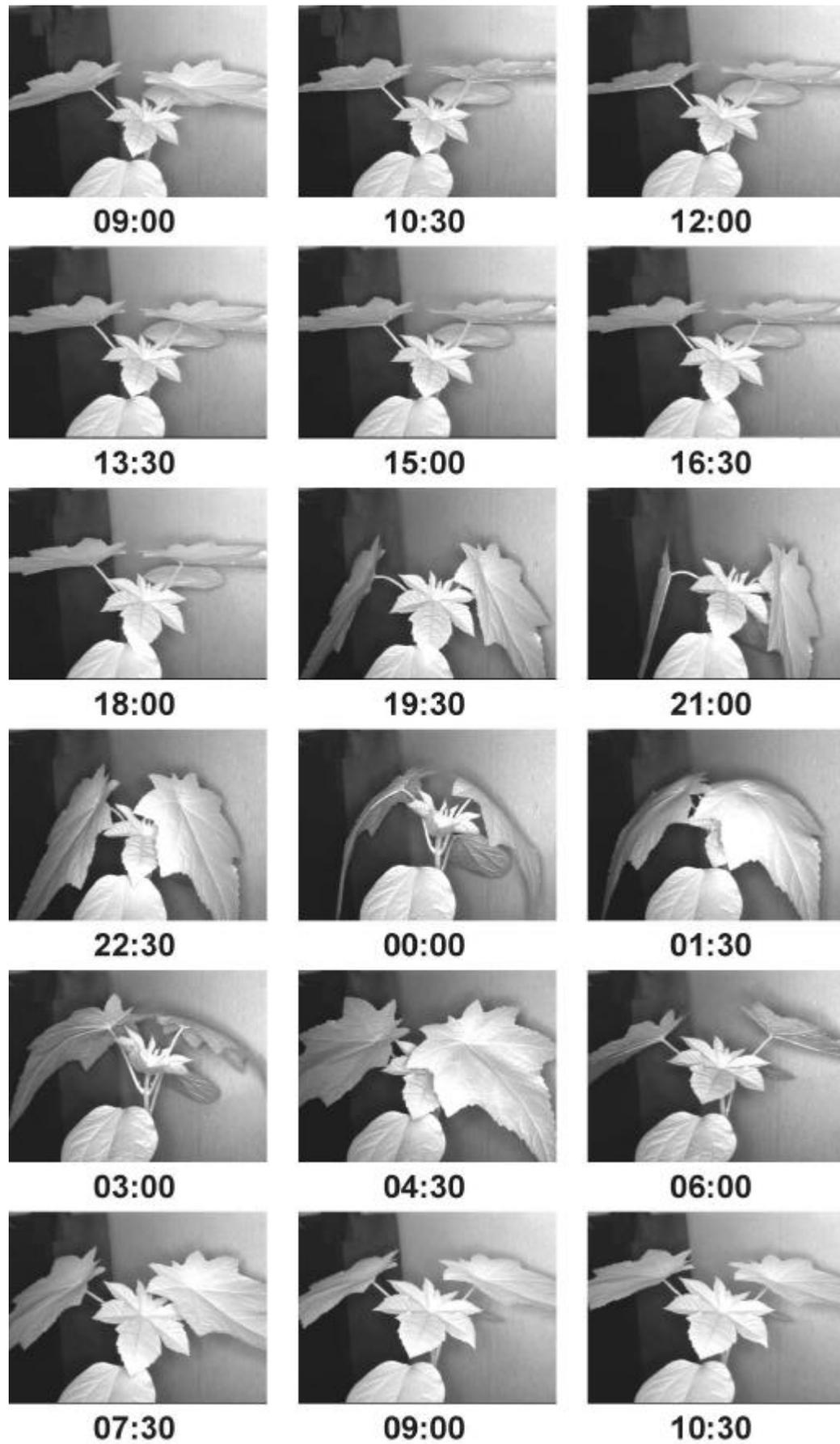
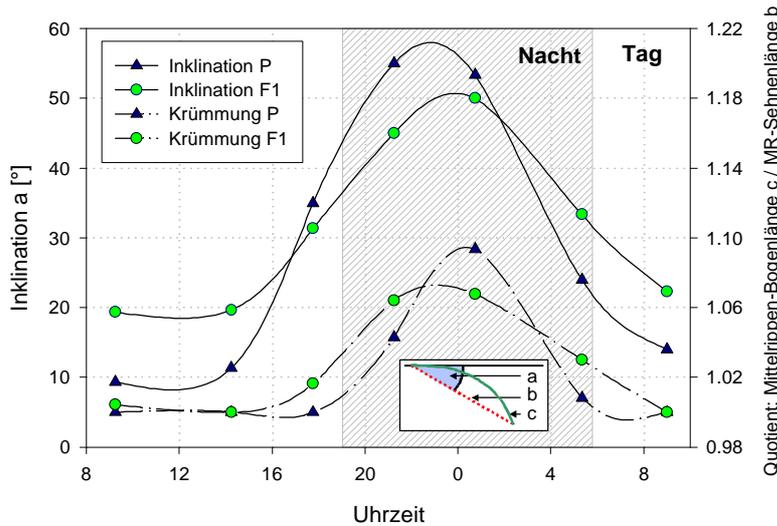


Abb. 7.10 Nyctinastische Bewegungen einer Rizinuspflanze



**Abb. 7.11 Nyctinastische Bewegungen von jungen (F1) und alten (P) Rizinusblättern**

Neben dem Inklinationswinkel (im Inset mit a bezeichnet) wurden hier auch die Sehnenlänge b (die ‚Luftlinien‘-Entfernung von der Blattspitze zum Stielansatz) sowie die Bogenlänge c (die tatsächliche Länge des Blattlappens) gemessen. Das Verhältnis dieser beiden Längen gibt die Krümmung des Blattes an; je größer c/b ist, desto glockenförmiger ist das Blatt gewölbt.

Dies ist ein höchst unangenehmer Befund, da vor dem Hintergrund der starken Blattbewegung eine recht starre Fixierung der zu messenden Blätter in der Focalebene der Kamera unumgänglich ist. Es wurden erhebliche experimentelle Anstrengungen unternommen, um diese Bewegungen zu verhindern und dennoch für ein möglichst ‚natürliches‘ Wachstum der Blätter zu sorgen. Zunächst wurde mit Rahmenkonstruktionen aus Draht experimentiert. Diese führten jedoch zu stark aufgewellten Blättern (Abb. 7.12) und damit zu großen Messartefakten. Schließlich erwiesen sich die beschriebenen, zyklischen Einspannvorrichtungen (Kap. 4.2) als das Mittel der Wahl zu Verhinderung von Nyctinastien. Durch Optimierung der Anhängemassen konnte hier schließlich auch die raum-zeitliche Charakteristik des unfixierten Blattwachstums experimentell eingestellt werden (siehe Kap. 7.3).



**Abb. 7.12 Links: Drahtrahmen zur Fixierung von Tabakblättern, rechts: Blatt nach 5 Tagen im Drahtrahmen**

Aufnahmen von *Arabidopsis thaliana* sowie *Solanum tuberosum* zeigten, dass auch hier bei gut wachsenden Pflanzen erhebliche Nyctinastien auftreten und die Analysen von anderen Arten mit denselben Problemen verbunden gewesen wären.

### 7.2.3 Genauigkeit der DISP-Messmethode

Die digitale Bildsequenzanalyse-Methode (DISP-Methode; Kap. 4) wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals systematisch zur Untersuchung von Blattwachstum eingesetzt. Die prinzipielle Eignung der Methode sowie ihre messtechnisch bedingten Genauigkeit wurde in einer vorangegangenen Studie evaluiert (Schmundt, 1999). In der Praxis hängt die Genauigkeit der Resultate stark davon ab, ob Bewegungen des Untersuchungsobjekts entlang der optischen Achse der Kamera auftreten oder nicht. Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt wurde, können solche Bewegungen daraus resultieren, dass ein Blatt sich krümmt oder faltet, bzw. dadurch, dass es sich insgesamt nach oben oder unten bewegt (z.B. durch Eigenbewegung oder Luftzirkulation).

Tabak- und Rizinusblätter wurden unter anderem deshalb für diese Studien ausgesucht, weil sie keine stark gefalteten oder gekrümmten Oberflächen aufweisen. Ihre Eigenbewegung wirkt sich dennoch – auch bei optimaler Fixierungstechnik – auf die Genauigkeit der DISP-Messmethode aus. Es wurden zwei Testansätze verfolgt, um zu untersuchen, wie stark Bewegungen des beobachteten, fixierten Blattes die bestimmten Wuchsraten beeinflussen:

#### Zwei-Kamerasystem

Mit einem Zwei-Kamerasystem wurde in mehreren Experimenten an Rizinus und Tabak Blattwachstum gleichzeitig von oben und unten aufgenommen (Abb. 7.13). Die gemessenen Wuchsraten differierten dabei stets in der Mitte der Nacht am stärksten. Zu dieser Zeit wäre die Orientierung des unfixierten Blattes stark von derjenigen bei Tag verschieden (vergleiche Abb. 7.10). Im Fixierungsrahmen kann es zu diesem Zeitpunkt zu leichten Aufwölbungen kommen. In Abb. 7.13 ist der Zeitverlauf von zwei Wuchsratenmessungen der Blattlappenmitte von Rizinus dargestellt. Dieser Punkt auf dem Blatt ist am weitesten von allen Fixierungspunkten entfernt und hat daher die größtmögliche Bewegungsfreiheit entlang der optischen Achsen. Die von unten beobachtende Kamera registriert in der Mitte der Nacht zu geringe Wuchsraten; das heisst, der Beobachtungspunkt hat sich von ihr wegbewegt. Dies stimmt mit dem natürlichen Krümmungsverhalten des Blattes überein, das sich zu dieser Zeit aufwölbt (vergleiche Abb. 7.10). Mit der von oben beobachtenden Kamera werden gleichzeitig zu hohe Wuchsraten registriert.

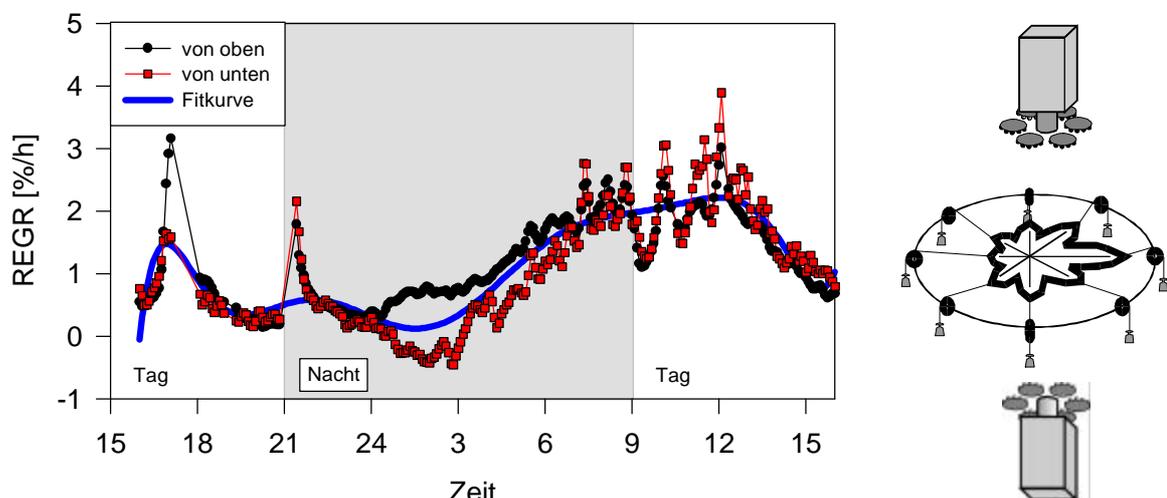


Abb. 7.13 Tagesgang der REGR-Verteilung von Rizinus (Blattmitte), aufgenommen mit 2 Kameras (rechts)

Die wichtigsten Charakteristika des zeitlichen Wachstumsmusters (siehe nachfolgender Abschnitt) werden jedoch von beiden Kameras erkannt: Zu Beginn der Messung tritt ein Artefakt-Peak auf, der durch das Einspannen des Blattes bedingt ist. Am Beginn der Nacht kommt es zu einem realen, auch im unfixierten Blatt auftretenden Peak, der von beiden Kameras identisch registriert wird. Dasselbe gilt für das Wachstumsmaximum am Nacht-Tag-Übergang. Zu Beginn des Tages treten drei kurzfristige Oszillationen der Wuchsraten-Amplitude auf, die von beiden Systemen in Phase, aber mit unterschiedlicher Intensität detektiert werden.

Über das gesamte 24-h-Intervall gemittelt, wird vom oberen Bildaufnahmesystem eine mittlere Wuchsrate von 1,16 %/h registriert; vom unteren werden im Mittel 1,01 %/h registriert. Die Abweichung von der intermediären (realen) Wuchsrate beträgt also für den Tagesmittelwert 7 %. In der Mittelung über das 24-h-Intervall weichen die beiden Messungen um 15 % nach oben bzw. unten von der mittleren Fitlinie ab. Der Extremwert der Messdifferenz gegen 2 Uhr morgens beträgt 1%/h; das heisst, dass beide Auswertungen zu diesem Zeitpunkt einen Messfehler von **0,5 %/h** aufweisen.

An Blattstellen, die näher an den Abspannpunkten liegen, treten geringere Differenzen auf (hier nicht gezeigt). Bei Verwendung geringerer Anhängemassen treten wesentlich größere Differenzen zwischen den beiden Wuchsratenmessungen von oben und unten auf.

### Streifenlichtprojektor-Aufbau

Quantitativere Fehlerabschätzungen konnten mit dem Streifenlichtprojektor-Aufbau (Kap. 4.2) durchgeführt werden. Hiermit fand eine zeitaufgelöste Tiefenvermessung von Rizinusblättern über mehrere Stunden am Nacht-Tag-Übergang statt (Tab. 7.1; Abb. 7.14). Es wurde mit frei wachsenden Blättern sowie mit Blättern im DISP-Aufbau gearbeitet (2, 12 und 30 g Anhängemasse).

Den Tiefenkarten konnten folgende Ergebnisse entnommen werden:

Frei wachsende Blätter weisen selbst bei nahezu horizontaler Blattstellung (tagsüber) **Höhendifferenzen** von maximal 3,5 cm auf. Eingespannte Blätter sind um so flacher, je stärker die Anhängemasse ist, weisen aber selbst bei 30 g Anhängemasse noch Höhendifferenzen von bis zu 3 mm (Blattlänge ca. 10 cm) auf. Gegenüber dem frei wachsenden Blatt ist ein eingespanntes Blatt also bis zu einem Faktor 10 ‚flacher‘.

**Tab. 7.1** Analysewerte von Streifenprojektor-Aufbau-Tiefenkarten.

	Frei wachsendes Blatt	Im DISP-Aufbau eingespannte Blätter; Anhängemasse:		
		2 g	12 g	30 g
Maximale Höhendifferenz innerhalb d. Blattes [mm]	<b>35</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>3</b>
Änderung der mittleren Blatthöhe [mm/h]	<b>4,4</b>	<b>1,27</b>	<b>0,01</b>	<b>0,04</b>

Die **Dynamik der mittleren Blatthöhenveränderung** zeigt einen noch größeren Unterschied zwischen frei wachsenden und eingespannten Blättern auf. Während ein frei wachsendes Blatt zum Messzeitpunkt seine Lage im Raum (absolute Tiefe) in einer Stunde im Mittel um 4,4 mm verändert, zeigen eingespannte Blätter wesentlich geringere Änderungsraten (1/100 der Kontrollblätter).

Zur Berechnung der **räumlichen Verteilung des Fehlers** der DISP-Methode wurde eine Kartierung der Höhenveränderung für ein mit 12 g fixiertes Blatt (Abb. 7.14) durchgeführt.

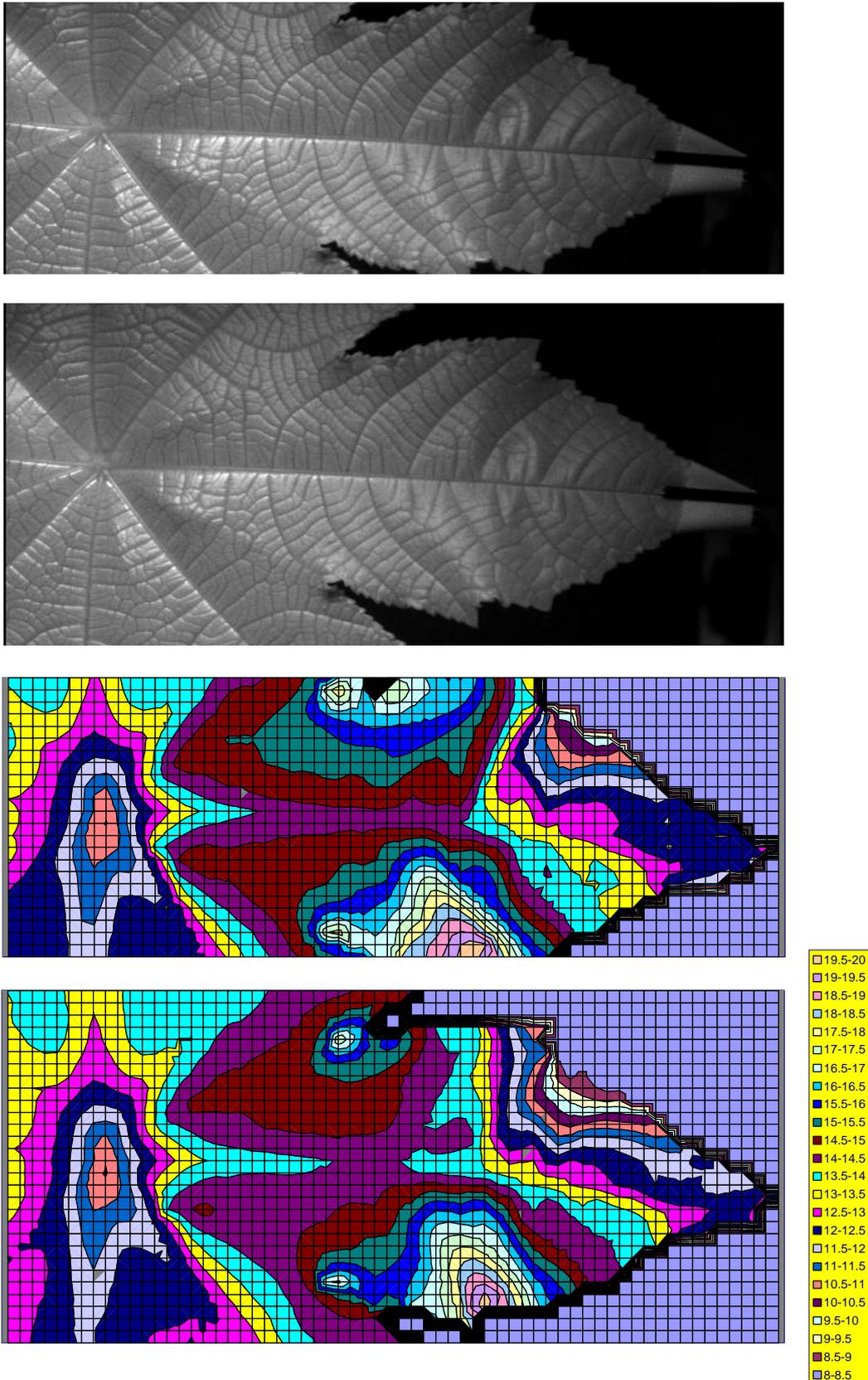
Entlang der Mittelrippe treten nur vernachlässigbare **Höhenänderungen** auf, die im Wesentlichen aus der Verlängerung der stets leicht gekrümmten Rippe resultieren (Abb. 7.15 links). Senkrecht zur Richtung der Mittelrippe treten an der Basis des Blattlappens ebenfalls keine nennenswerten Änderungen auf (Abb. 7.14). Wie bereits erwähnt, ist die Höhe des eingespannten Blattlappens in der Mitte am variabelsten. Dort konnte innerhalb einer Stunde eine Absenkung von 0,5 mm beobachtet werden (Abb. 7.15 Mitte). Bei einer Kamera-Objekt-Distanz von 30 cm führt dies nach dem Strahlensatz zu einer Verzerrung einer abgebildeten, in der Focalebene befindlichen, Länge von  $0,5 \text{ mm} / 300 \text{ mm} = 0,17 \%$ . Da für die Berechnung der Fläche die Länge zum Quadrat eingeht (der Fehler verdoppelt sich), resultiert die Absenkung des Blattes um 0,5 mm/h in einem Wachstumsfehler von **0,34 %/h**. Die mit dem Streifenprojektor-Aufbau gemessene Höhenveränderung der Blattposition stimmt also recht gut mit den in Abb. 7.13 dargestellten Messdifferenzen der beiden DISP-Messungen mit beidseitiger Kamerapositionierung von maximal 0,5 %/h überein.

Gemittelt über das gesamte Blatt ergeben sich Höhenänderungen von typischerweise unter 0,1 mm/h und damit Wachstumsmessfehler von unter **0,1 %/h**.

Der Einfluss von Veränderungen der **Blattorientierung** kann an einem Querschnitt durch den vorderen Teil des Blattlappens quantifiziert werden (Abb. 7.15 rechts). Die Höhe des Blattrandes ändert sich in einer Stunde um 2 mm (eine derartige Höhenveränderung ist nicht selten, liegt aber eher im oberen Bereich der auftretenden Werte). Diese Änderung resultiert aus einer über den Querschnitt auf 20 mm Länge gleichmäßig verteilten Abwärtsdrehung des Blattlappens um  $\arctan(2/20) = 6 \text{ Grad}$  in die Horizontale hinein. Die von der Kamera registrierte Flächenprojektion wächst dadurch von  $\cos(6^\circ) = 0,9945$  auf  $\cos(0^\circ) = 1$  an. Der hierdurch bedingte Messfehler beträgt also **0,55 %/h**.

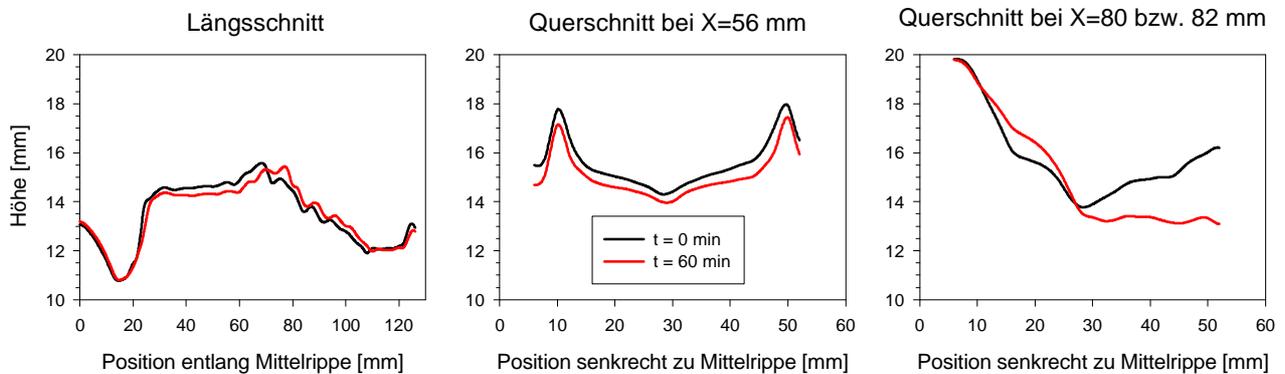
Treten Fehler beider Arten auf, also durch Höhe und Drehung bedingte, so addieren sie sich.

Der aus **Blattdrehungen** resultierende Fehler kann durch Messungen mit dem 2-Kamera-DISP-System nicht registriert werden, da sich Drehungen zur Focalebene hin von beiden Beobachtungsrichtungen aus als Erhöhung der scheinbaren Wachsrates auswirken. Drehungen aus der Focalebene heraus wirken sich in verringerten scheinbaren Wachsrates aus.



**Abb. 7.14** Tiefenkarten eines Ricinusblattes zu den Zeitpunkten  $t=0$  und  $t=60$  min (mit 12 g abgespannt)

Von oben nach unten: Originalbild zur Zeit  $t=0$ ; Originalbild zur Zeit  $t=60$  min; Tiefenkarte zur Zeit  $t=0$ ; Tiefenkarte zur Zeit  $t=60$  min. Die Originalbilder wurden aus den Aufnahmen des Streifenprojektor-Aufbaus mittels Helligkeitsangleichung der Streifen (siehe Abb. 4.??) rekonstruiert. Die Tiefe (Abstand von Kamera) ist auf den beiden unteren Bildern farbcodiert in Schritten von 0,5 mm dargestellt. Der Strichabstand des Gitterrasters beträgt 2 mm. Der vordere Teil des Blattlappens dreht sich im Aufnahmeintervall etwas nach unten.



**Abb. 7.15** Längs- bzw. Querschnitte durch die beiden Tiefenkarten des Ricinusblattes (10-fach überhöht)

Links: Längsschnitt durch die Blattmittlerippe; Mitte Querschnitt durch die Positionen der Blattlappenachseln und den zentralen Teil der Mittlerippe; rechts: Querschnitt durch den vorderen, sich wegkrümmenden Teil des Blattlappens.

### Fazit der Fehlerabschätzung

Die Verringerung der Blattbewegungen um einen Faktor 100 durch die im Verlauf der vorliegenden Arbeit erstellte Einspannmethodik resultiert in einer hohen Praktikabilität der DISP-Methodik. Bei Mittelung über den gesamten Bildbereich liegt der Messfehler unter 0,1 %/h und ist damit vernachlässigbar, da die untersuchten Blätter im Mittel mit einer Wachstumsrate von mehr als 1 %/h wachsen. Die zeitliche Lage der Wachstumsmaxima und –minima des Gesamtblattes kann mit der Methode sehr gut detektiert und damit auch interpretiert werden. Ebenso können kurzfristige Effekte, die sich über das gesamte Blatt erstrecken, sehr präzise registriert werden.

Bei Mittelung über Blattbereiche liegt der putative Messfehler –je nach Größe der Blattbereiche – zwischen 0,1 und 1 %/h. Für die Zwecke der vorliegenden Arbeit wird daher auf eine Interpretation von Effekten verzichtet, zu deren Darstellung das Blatt in mehr als zehn Regionen unterteilt werden muss.

Die Interpretation kleinskaliger Wachstumsmuster, insbesondere an den Blatträndern, ist jedoch mit Vorsicht zu betrachten. Lokal können auf dem Blatt Messfehler von bis zu 1 %/h auftreten. Die größte Fehlerquelle stellen dabei Drehungen dar, die durch Kippbewegungen des vorderen Blattlappenteils, aber auch durch Aufwölbungen zentralerer Teile hervorgerufen werden können.

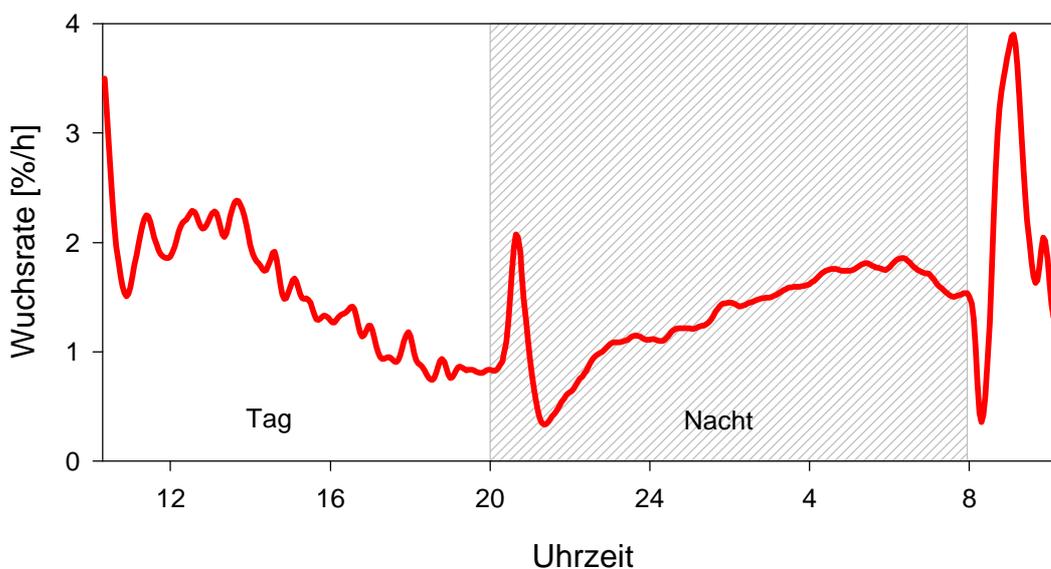
## 7.2.4 Wachstumsverteilung auf dem Blatt

Im vorigen Abschnitt wurden bereits zentrale Charakteristika des Wachstums-Tagesganges anhand der Vermessung einer Stelle der Blattlappenmitte von Rizinus aufgeführt (Abb. 7.13). Bei Tabak sind diese Muster ebenfalls deutlich ausgeprägt. Die nachfolgende Betrachtung beginnt mit einer Analyse der Verhältnisse auf dem Gesamtblatt und widmet sich dann sowohl in zeitlicher als auch räumlicher Dimension immer kleinskaligeren Prozessen.

### 7.2.4.1 Zeitliche Muster

Bei Tabak sind unter Standardbedingungen bei Integration über das gesamte Blatt folgende Muster des Wachstums-Tagesganges klar zu erkennen (Abb. 7.16):

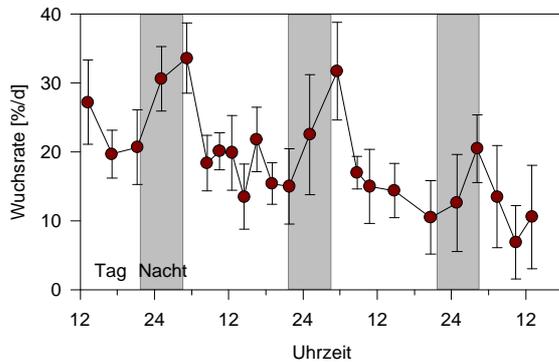
1. Im Übergang zwischen Licht und Dunkelheit ist die Kurve der Wuchsratenverteilung von starken Peaks (Amplituden bis über 10 %/h) überlagert: Zu Beginn der Nacht tritt eine Wachstumssteigerung auf, der eine Erniedrigung der Wachsrates nachfolgt. Dasselbe Phänomen tritt umgekehrt zu Beginn des Tages auf. Beide Phänomene konnten auch zu anderen Tageszeiten induziert werden (Licht aus während der eigentlichen Tagphase hatte den gleichen Effekt; analog Licht an während der Nacht)
2. Das eigentliche Wachstumsmaximum tritt am Nacht-Tag-Übergang auf und beträgt bei der dargestellten Messung etwa 2 %/h. Die Höhe des Maximums hängt ganz vom Entwicklungszustand des Blattes ab. Es wurden Maximalwerte von bis zu 6 %/h festgestellt.
3. Das Minimum der Verteilung liegt am Tag-Nacht-Übergang (genau 12 h früher). Im Minimum sinkt die Wachsrates auch bei stark zuwachsenden Blättern nahezu auf Null ab.



**Abb. 7.16** Wachstumstagesgang von Tabak (DISP-Messung)

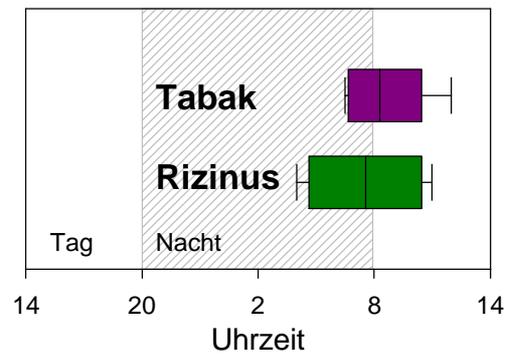
Für diese Messung wurde über den gesamten Bildbereich gemittelt; dargestellt sind alle Messwerte im Zeitabstand von drei Minuten.

Die Verteilung von Wachstumsmaxima und –minima über den Tagesgang hinweg lässt sich mit Hilfe der Faden-Methode über mehrere Tage hinweg gut verifizieren (Abb. 7.17). Im Mittel liegt das Wachstumsmaximum von Tabak einige Minuten nach dem Nacht-Tag-Übergang, das Rizinus-Maximum dagegen etwas vor dem Nacht-Tag-Übergang (Abb. 7.18). Die Streuung der beobachteten Werte ist jedoch groß; es wurden bei beiden Arten Maximumslagen von bis zu vier Stunden Abstand zum Nacht-Tag-Übergang gefunden.



**Abb. 7.17 RGR-Tagesgang Tabak (Fadenmessung)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 12 Blättern



**Abb. 7.18 Zeitliche Lage des RGR-Maximums**

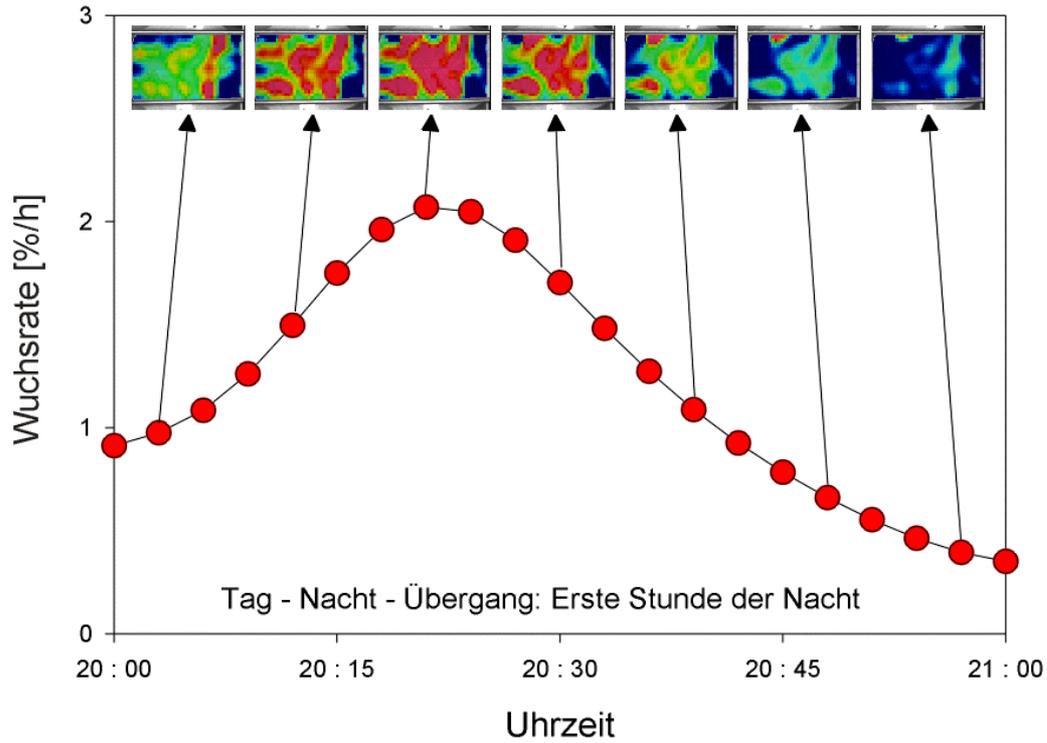
Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Extremwerte aus 8 Tabak- und 9 Rizinus-Bildsequenzen.

### Kurzfristige Wachstumsoszillationen bei Lichtwechsel

Die kurzzeitigen, intensiven Wachstumsspeaks, bzw. Wachstumsoszillationen an den Lichtwechsel-Übergängen treten nicht bei allen beobachteten Blättern auf. In 40 hierauf durchsuchten Sequenzen konnten bei 80 % (32 Sequenzen) derartige Oszillationen von einer Dauer bis zu zwei Stunden gefunden werden. In der Literatur finden sich jedoch viele Hinweise auf das Vorhandensein der Oszillationen (Kap. 10.4); auch mit Hilfe der Fadenmethode ließen sich die Peaks bei vielen Blättern verifizieren. Wenn eine Lichtwechsel-Oszillation auftritt, läuft sie mit fast mathematischer Strenge ab und erfasst meist das gesamte Blatt in gleichmäßiger Stärke, also ohne räumlichen Gradienten (Abb. 7.19). Der Abfall der dargestellten Verteilung verläuft exponentiell mit einer Abklingzeit von 15 min.

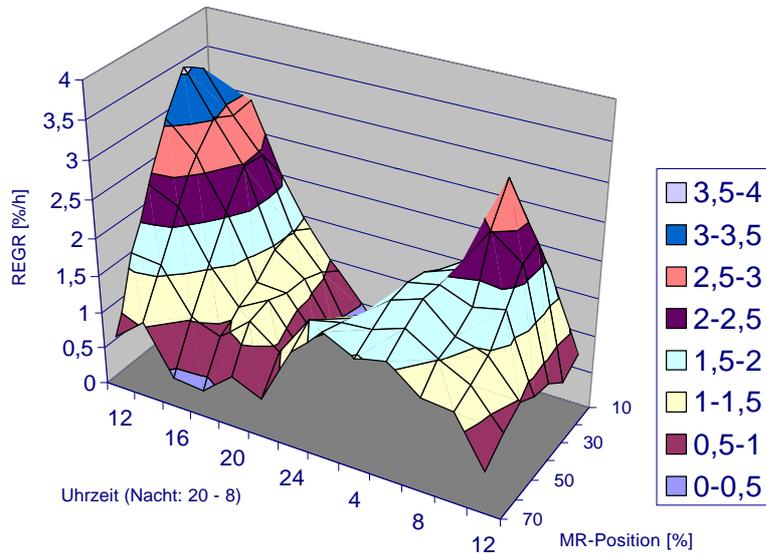
#### 7.2.4.2 Raum-zeitliche Muster

Entlang der Mittelrippe wird stets ein relativ deutlich ausgeprägter Gradient der Wachstumsverteilung von Basis zur Spitze hin gefunden. Auch hier sind sich die Ergebnisse von Tabak (Abb. 7.20) und Rizinus (Abb. 7.21 und Abb. 7.22) recht ähnlich. Bei Tabak ist das Maximum der Wuchsrates allerdings oft nicht direkt an der Basis, sondern etwas zur Blattmitte hin verschoben zu finden. Die mit Hilfe der DISP-Methode beobachteten räumlichen Gradienten der Element-Wuchsrates (Abb. 7.22) stimmen ebenso wie die zeitlichen Wachstumsverteilungen mit Resultaten aus klassischen Messungen überein (Abb. 7.23).



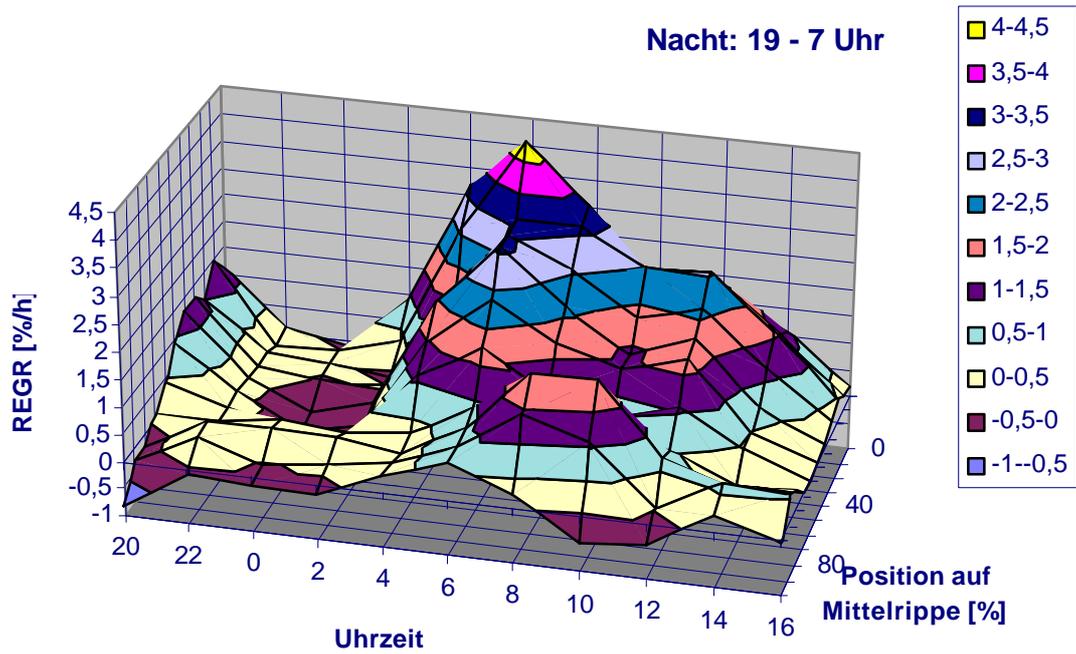
**Abb. 7.19** Transiente Wachstumsoszillation zu Beginn der Nacht

Über der Kurve der Blatt-Mittelwerte der Wachsraten sind im Abstand von 9 min die zugehörigen farbcodierten Wachstumsmomentaufnahmen der Sequenz dargestellt. Die exponentielle Abklingzeit der abfallenden Flanke des Peaks beträgt 15 min.



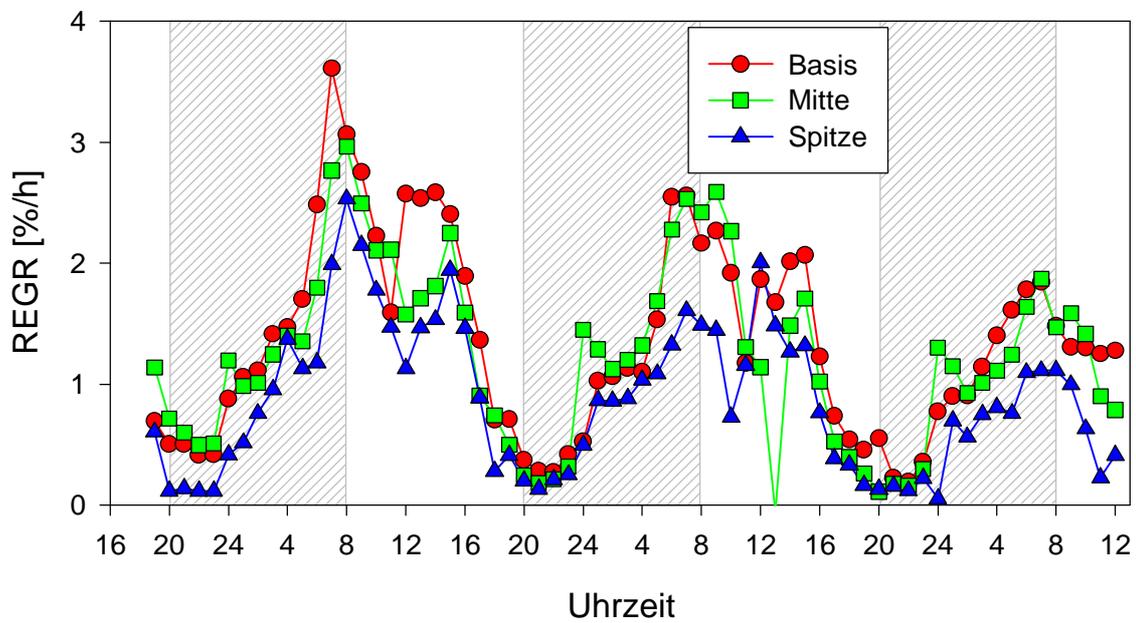
**Abb. 7.20** Raum-zeitliche Wachstumsverteilung von Tabak

Die Daten der zugrunde liegenden Bildsequenz wurden in einem Raster von 2 h und 10 % der Mittelrippenlänge gemittelt.



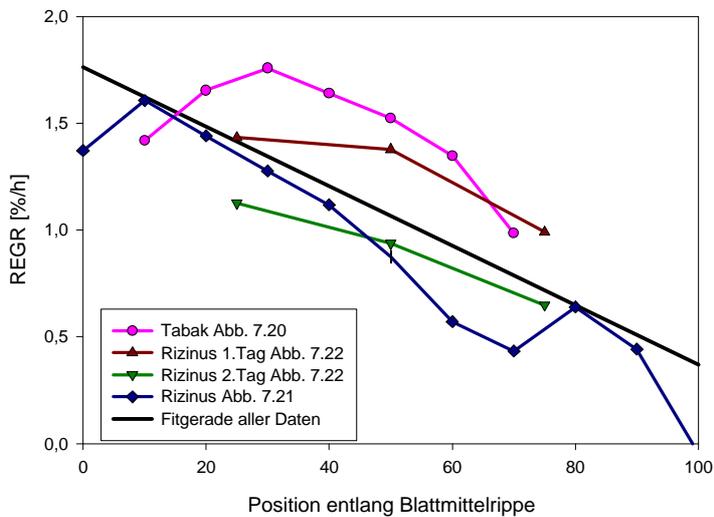
**Abb. 7.21** Raum-zeitliche Wuchsratenverteilung entlang der Rizinus-Mittelrippe

Die Daten der zugrunde liegenden Bildsequenz wurden in einem Raster von 2 h und 10 % der Mittelrippenlänge gemittelt.

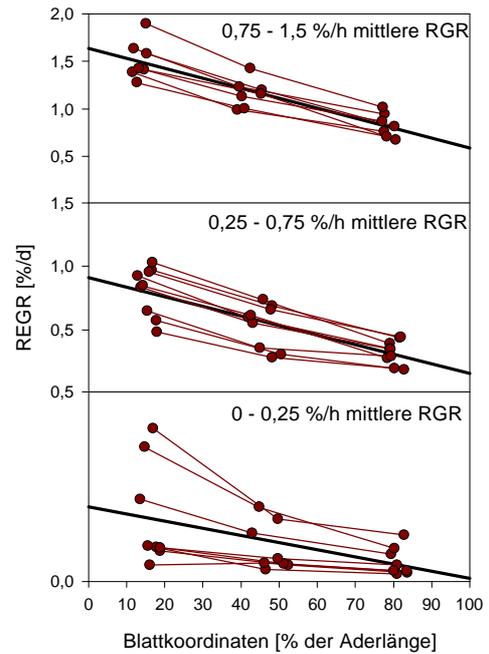


**Abb. 7.22** REGR-Verteilung an Basis, Mitte und Spitze von Rizinus

Die Daten der zugrunde liegenden Bildsequenz wurden in einem Raster von 1 h über drei aneinandergrenzende Bereiche des mittleren, vorderen Blattlappens gemittelt.



**Abb. 7.23 Basis-Spitze-Gradient der DISP-Messungen**  
24-h-Mittelwerte der angegebenen Datensätze



**Abb. 7.24 Basis-Spitze-Gradient klass. Messungen**  
Die Daten wurden mit einer Schieblehre erhoben. Die Ausprägung des Gradienten hängt stark vom Entwicklungszustand des Blattes bzw. seiner mittleren Wachsrates ab.

### 7.2.4.3 Kleinskalige Effekte

Räumliche Wachstumsgradienten treten natürlich nicht nur entlang der Blattmittellippe, sondern auch entlang anderer Achsen auf der Blattoberfläche auf. Es ist jedoch schwierig, diese Gradienten zweidimensional grafisch sinnvoll darzustellen. Als geeignetes Mittel dient hierzu die Anfertigung von Computer-lesbaren Filmen (mpegs), die aus den farbcodierten Einzelbildern der Wachstumsverteilung erzeugt werden können.

Bereits die Zusammenstellung einzelner Abbildungen dieser Filme zeigt die bekannten Grundmuster der tageszeitlichen Wachstumsverteilung und des Basis-Spitze Gradienten (Abb. 7.25). Bei farbcodierter Darstellung der Element-Wachsratesverteilung auf der Blattoberfläche wird stets ein sehr heterogenes Wachstumsmuster und nur selten eine glatte Verteilung von Wachsrates beobachtet. Ob dieses Muster der Realität entspricht, oder ob es aus Mess-Artefakten resultiert (z.B. durch transiente lokale Aufwellungen der Blattspreite) lässt sich erst beantworten, wenn die zeitaufgelöste, dreidimensionale Vermessung von wachsenden Blättern mit höherer Präzision als derzeit möglich betrieben werden kann. Für die Zwecke dieser Arbeit beschränkt sich die Interpretation der Wachstumsmuster daher auf eine räumliche Auflösung von einigen, gemittelten Bereichen innerhalb des Blattes.

*Es ist jedoch sehr gut möglich, dass die dargestellten Muster tatsächlich die reale Komplexität des gesamten raum-zeitlichen Prozesses wiedergeben. Wenn dem so wäre, würde die Analyse dieser faszinierenden kleinskaligen Muster den Schlüssel zur Erforschung hochinteressanter Bereiche der pflanzlichen Entwicklungsbiologie liefern und zum Beispiel die Kombination von Einzelzell-Inhaltsstoff-Analysen mit in-situ-Wachstumsuntersuchungen ermöglichen.*

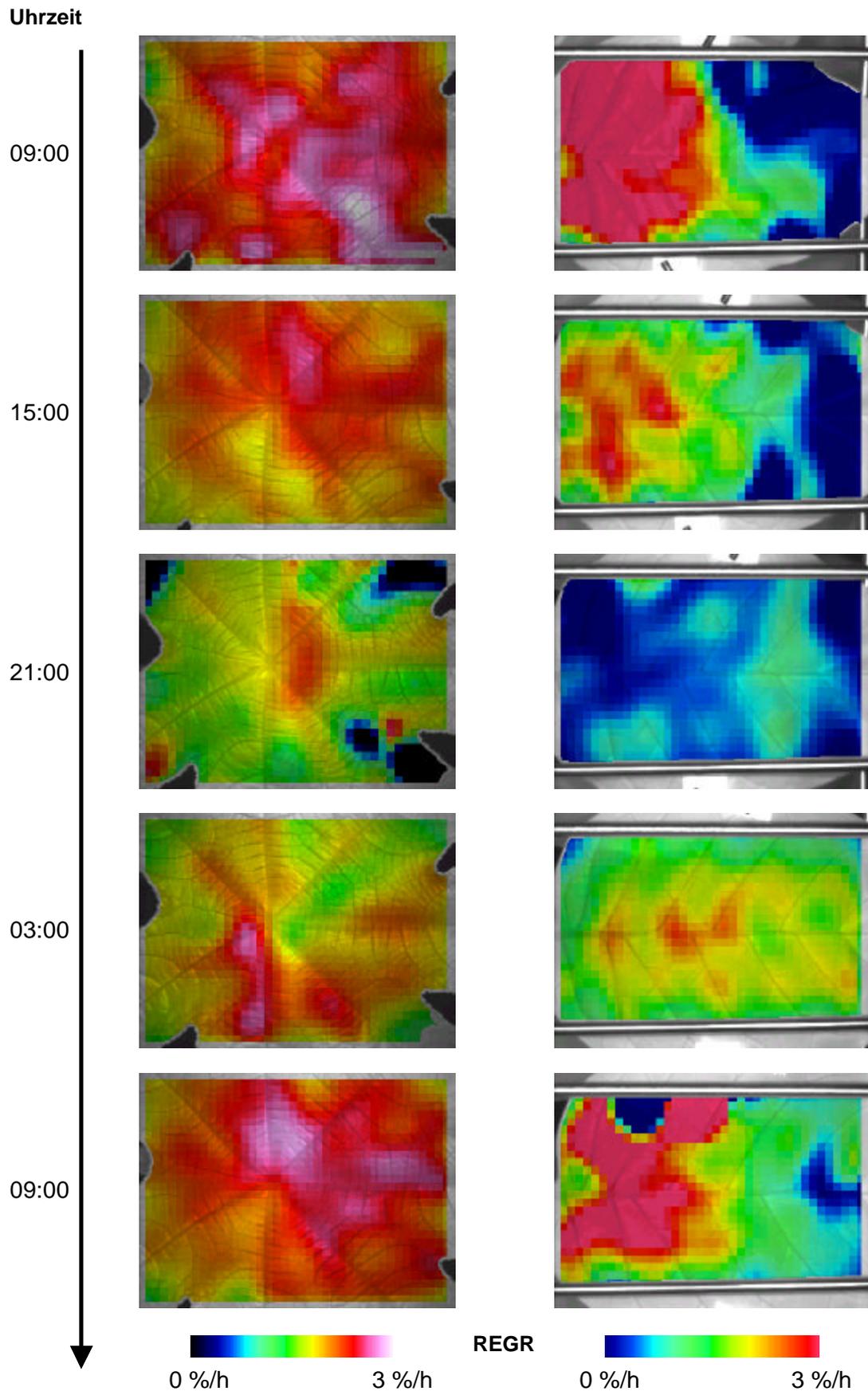
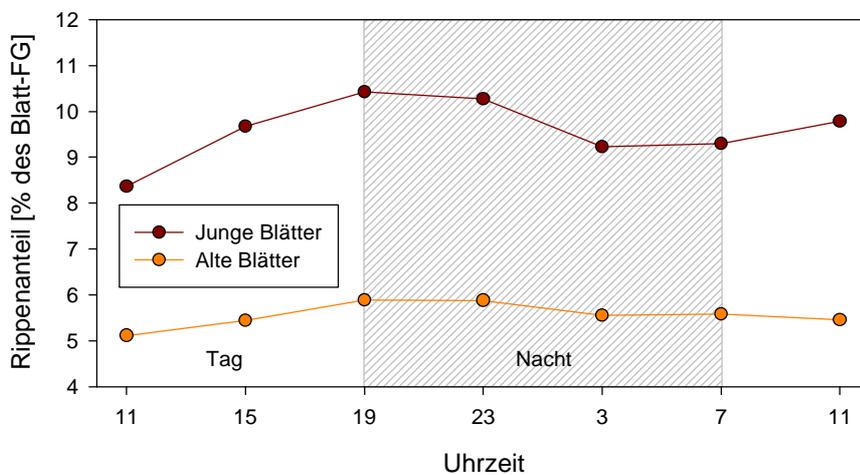


Abb. 7.25 Farbcodierte Wachsratenverteilungen auf Rizinus (links) und Tabak (rechts) im Tagesgang

#### 7.2.4.4 Ader-Intercostalfeld-Verteilung

Ob unterschiedliche Gewebe des Blattes unterschiedliche Wachstums-Tagesgänge zeigen, kann derzeit noch nicht mit Sicherheit gesagt werden. Experimente zum Tagesgang des Rippenanteils in *Rizinus* legen jedoch die Vermutung nahe, dass der Zuwachs der Rippen deutlich geringeren tageszeitlichen Schwankungen unterworfen ist, als derjenige der Blattfläche (Abb. 7.26).

Der Rippenanteil weist bei Blättern zweier verschiedener Entwicklungsstufen (zugehöriges Experiment: siehe Kap. 7.3) am Tag-Nacht-Übergang ein Maximum, am Nacht-Tag-Übergang dagegen ein Minimum auf, also genau umgekehrt wie im Fall der Blattfläche. Da der Rippenanteil das Verhältnis von Rippenmasse zu Blattmasse angibt, lässt dies auf ein gleichmässiges Wachstum der Rippe schliessen.



**Abb. 7.26** Rippenanteil von *Rizinus*blättern im Tagesgang

Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus Messungen an drei Blättern dar, die nach dem Kriterium homogener Wachsraten zu den verschiedenen Erntezeitpunkten zusammengestellt wurden (Vergleiche Kap. 7.3). Die Rippenmasse der alten Blätter beträgt im Mittel 120 mg; die der jungen Blätter 80 mg. Für beide Blattstockwerke ergibt sich also eine Differenz von etwa 20 mg zwischen den minimalen und den maximalen absoluten Massen der Rippen.

#### 7.2.5 Inhaltsstoffverteilungen

Verteilungen von Inhaltsstoffen wurden ebenso wie die Verteilungen von Wachsraten sowohl hinsichtlich räumlicher als auch zeitlicher Aspekte untersucht. Die Zielsetzung war hierbei, a) Korrelationen zwischen den beiden Arten von Verteilungen zu erstellen und b) Aussagen über putative regulatorische Funktion gewisser Inhaltsstoffe für Wachstumsprozesse zu gewinnen.

Es wurden Konzentrationsanalysen von Kationen, Anionen, Kohlenhydraten sowie Aminosäuren durchgeführt. Um dabei die Frage nach möglichen Stoffflüssen zu klären, wurde die Verteilung dieser Stoffe im tageszeitlichen Verlauf sowie über verschiedene Blattstockwerke hinweg untersucht. Innerhalb wurde sowohl die Verteilung der Substanzen zwischen Bereichen unterschiedlichen cytologischen Entwicklungszustandes (Basis und Spitze) als auch in verschiedenen Geweben (Ader und Intercostalfeld) analysiert. Die Ergebnisse stellen Voruntersuchungen für eine Analyse von Depositionsraten bzw. von Sink-Source-Verhältnissen bezüglich einzelner Inhaltsstoffe der Pflanze dar.

### 7.2.5.1 Versuchsdesign ‚Inhaltsstoffanalyse Tabak‘

Die Resultate der nachfolgenden zwei Abschnitte wurden ausschliesslich an Tabak erhoben; die Pflanzenanzucht fand unter Standardbedingungen in den Plexikammern selbst statt. Aufgrund des geringen Raumangebots konnten in den Plexikammern nur wenige Pflanzen angezogen werden. Aus einer Population von 16 Pflanzen wurden acht möglichst einheitliche Pflanzen ausgesucht, bei denen je ein Blatt (Haupt-Untersuchungsblatt; Blatt Nr. 12) möglichst gut den genannten Auswahlkriterien der Blätter für DISP-Messungen entsprach (Länge ca. 10 cm; Wachsrate ca. 35 %/d). Weitere mittlere Parameter des Haupt-Untersuchungsblattes waren: Fläche 60 cm<sup>2</sup>; Masse 1,6 g; TGA 8 %; MRA 30 %.

**Alle vier Stunden** wurde eine Ernte durchgeführt, bei der einer der acht Pflanzen 10 Proben entnommen wurden: Dem *Haupt-Untersuchungsblatt* wurden acht Proben entnommen (Abb. 7.27); einem drei Blattstockwerke darüber befindlichen *sink-Blatt* (Länge: ca. 3 cm; Wachsrate ca. 100 %/d) sowie einem drei Blattstockwerke darunter befindlichen *source-Blatt* (Länge: ca. 15 cm; Wachsrate < 5 %/d) je eine Probe.

Den **Intercostalefeldern** des Haupt-Untersuchungsblattes wurden vier über die Länge verteilte Proben entnommen: Je eine Probe wurde aus zwei 8-mm-Blattscheiben des vordersten Blattviertels sowie der drei nachfolgenden Blattviertel der Spreite entnommen (Proben-FG 12-20 mg).

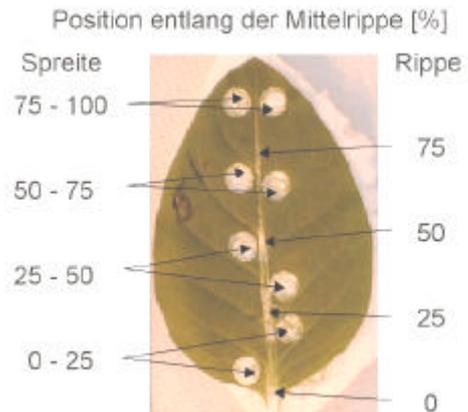
Der **Mittelrippe** wurden die übrigen vier Proben ebenfalls in Abständen von 25 % der Blattlänge entnommen (FG von je 20-50 mg). Von *sink-* und *source-Blatt* wurde je eine aus 2 Blattscheiben (Basis und Spitze) gepoolte Probe (FG je 15 bis 35 mg) entnommen.

Auf der Basis dieses Datensatzes werden im Weiteren die erwähnten Verteilungen dargestellt.

### 7.2.5.2 Ader-Intercostalfeld

Zwischen dem Gewebe von Mittelrippe und Intercostalfeld bestehen strukturell-physiologische Unterschiede. Die Mittelrippe besteht zu einem großen Anteil aus Leit- und Festigungsgewebe; diese Gewebetypen kommen in den Intercostalefeldern dagegen kaum vor. Mittelrippengewebe zeigt nur geringe photosynthetische Aktivität; im Intercostalfeldgewebe ist dies die zentrale physiologische Funktion. In der Mittelrippe liegen bereits in einem viel früheren Stadium als im Intercostalfeld ausdifferenzierte Zellen vor, die dem Stoff-Ferntransport dienen. Trotz dieser Vielzahl an Unterschieden, die sich in einem veränderten Haushalt der Inhaltsstoffe niederschlagen muss, wachsen Mittelrippe und Intercostalfeld mit balancierter Intensität zu (Kap. 7.1.2).

Nachfolgend wird die Verteilung der Inhaltsstoffe in Ader und Intercostalfeld besprochen.



**Abb. 7.27 Probenahme auf Tabakblatt Nr.12**

Vier Proben, die aus je zwei Blattscheiben bestanden, wurden der Blattspreite entnommen. Auch der Mittelrippe wurden vier Proben entnommen. Die Proben waren äquidistant über die Länge des Blattes verteilt. Über einen Zeitraum von 28 h hinweg wurde alle vier Stunden eine Ernte durchgeführt.

*Kohlenhydrate*

Für Glucose besteht ein deutlicher Konzentrations-Unterschied in Ader und Intercostalfeld (Abb. 7.28): vor allem an der Basis der Mittelrippe treten sehr hohe Gehalte auf, die die Konzentrationen der Intercostalfelder um ein Vielfaches übersteigen. Berechnet man unter Berücksichtigung der Massen der einzelnen geernteten Segmente die mittlere Konzentration (Tab. 7.2), so liegen diese in der Mittelrippe bei 5,6  $\mu\text{mol/g}$  FG und damit um mehr als den Faktor vier höher als im Intercostalfeld-Bereich des Blattes (1,2  $\mu\text{mol/g}$  FG). Bezieht man den höheren Massen-Anteil der Intercostalfelder gegenüber der Mittelrippe (70:30) mit ein, so sind 67 % der im Blatt vorkommenden Glucose in der Mittelrippe lokalisiert.

Bei Fructose unterscheiden sich die Konzentrationen in Mittelrippe und Intercostalfeld noch um einen Faktor zwei; bei Saccharose sind sie dagegen vergleichbar. Stärke kommt fast ausschließlich im Intercostalfeldbereich vor (93 % dort lokalisiert; Tab. 7.2).

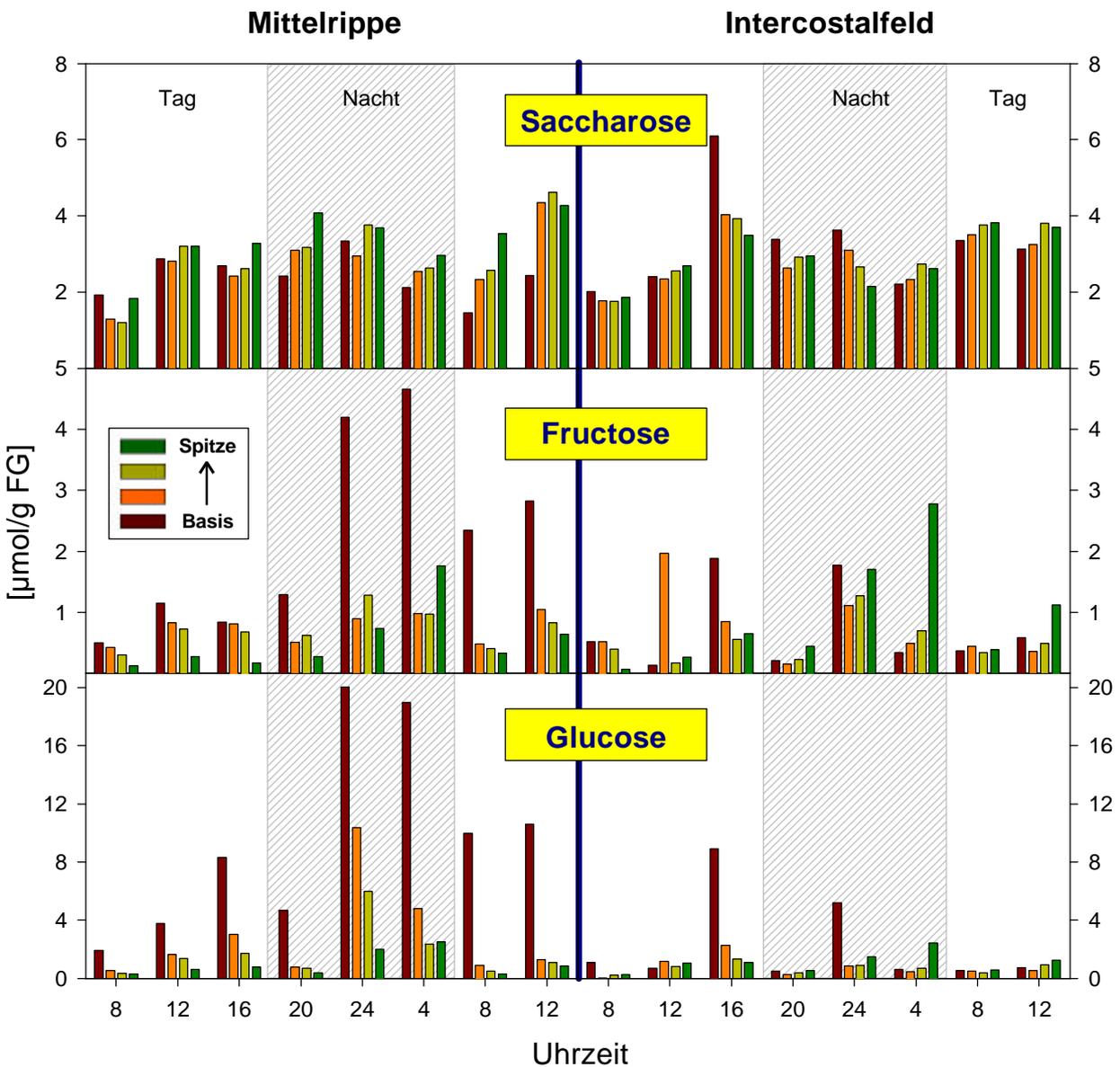


Abb. 7.28 Verteilung der Zuckerkonzentrationen in Mittelrippe und Intercostalfeldern von Tabakblättern

### Aminosäuren

Bei den Aminosäuren sind die Konzentrationen aller Spezies im Intercostalfeld höher als in der Mittelrippe (Abb. 7.29; Tab. 7.2). Im Mittel stehen sie zueinander im Verhältnis 70:30; die Mengenverteilung beträgt somit etwa 85:15 (Intercostalfeld:Mittelrippe). Glutamat weist in der Gruppe der häufigsten Aminosäuren mit 12 % den niedrigsten Anteil in der Rippe auf (Tab. 7.2); Glutamin den höchsten (22 %).

Bei den in geringen Mengen vorkommenden Aminosäuren weisen Glycin und Alanin die höchsten relativen Gehalte in den Intercostalbereichen auf; Arginin und  $\gamma$ -Amino-Buttersäure die niedrigsten.

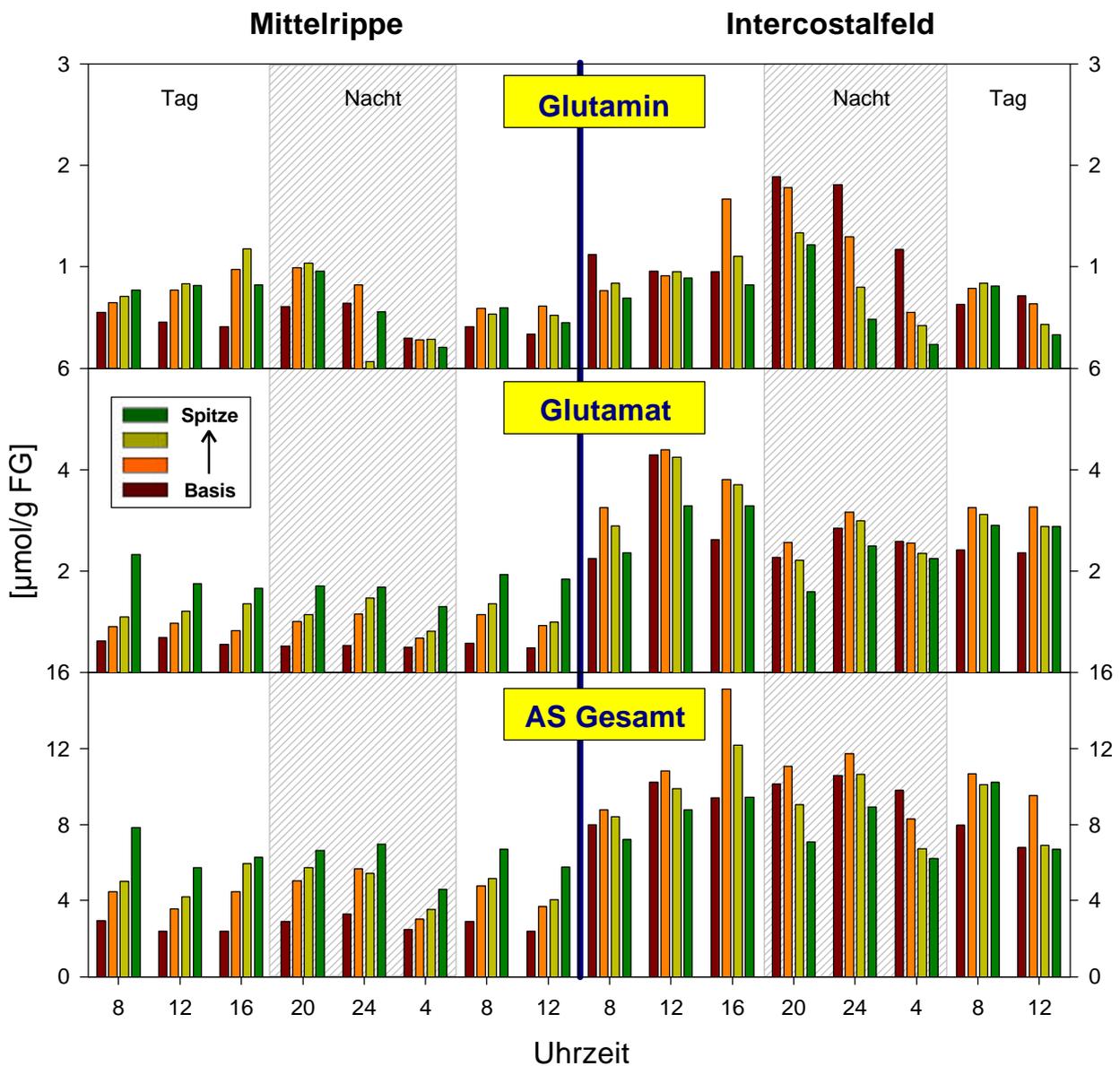


Abb. 7.29 Aminosäuren-Konzentrations-Verteilung in Mittelrippe und Intercostalfeldern von Tabakblättern

Anionen

Bei den Anionen weisen die Nährstoffe Nitrat (Abb. 7.30) und Phosphat höhere Konzentrationen in der Mittelrippe auf (Tab. 7.2). Bei Chlorid sind die Gehalte in Ader und Intercostalfeld vergleichbar, bei Sulfat sind sie im Intercostalfeld höher. Auch Malat und vor allem Citrat weisen erhöhte Konzentrationen im Intercostalfeldbereich auf. Im Fall von Citrat liegen bezüglich der Ader-Intercostalfeld Verteilung noch extremere Verhältnisse als bei Stärke vor: 95 % des im Blatt vorkommenden Citrats sind in den Intercostalfeldern lokalisiert.

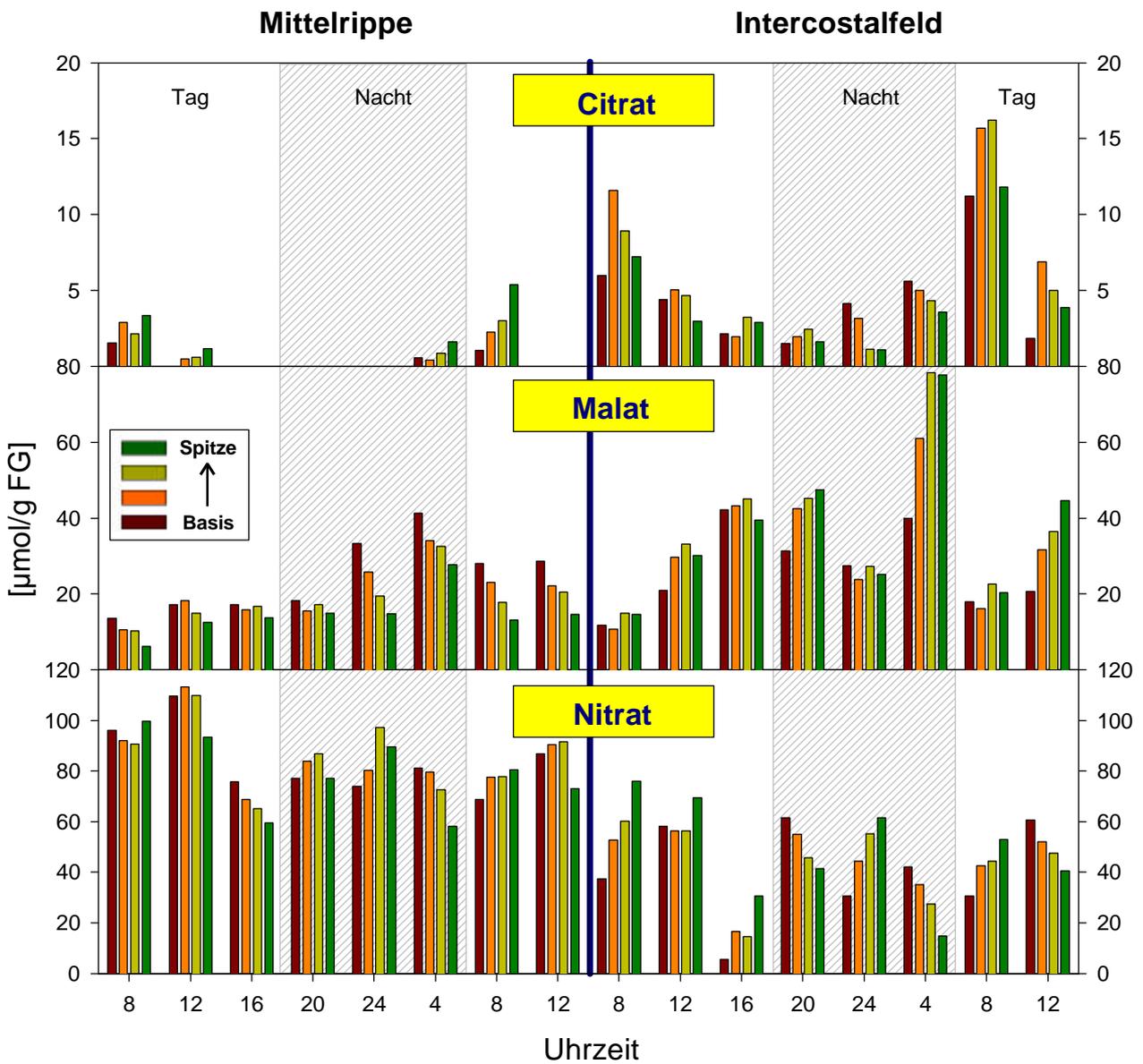


Abb. 7.30 Anionen-Konzentrations-Verteilungen in Mittelrippe und Intercostalfeld von Tabakblättern

**Tab. 7.2 Verteilung von Inhaltsstoffen in Mittelrippe und Intercostalfeld von Tabakblättern (Blatt Nr. 12)**

Die Mittelwerte für MR und IC wurden unter Berücksichtigung der Massen der geernteten Segmente berechnet, die mittlere Konzentration des gesamten Blattes sowie die Mengenanteile von MR und IC unter der Annahme eines Mittelrippenanteils an der Blattmasse von 30 %. rot: höchste Quotienten von MR:IC; blau: niedrigste.

Inhaltsstoff	Konzentrationen [ $\mu\text{mol/g FG}$ ]							Mengen [% v. Gesamtgehalt]	
	Mittelrippe (MR)			Intercostalfeld (IC)			Blatt	MR	IC
	Mittel	Max	Min	Mittel	Max	Min	Gesamt		
<b>Stärke</b>	<b>5</b>	<b>17</b>	<b>1</b>	<b>28</b>	<b>56</b>	<b>4</b>	<b>21</b>	<b>7</b>	<b>93</b>
<b>Glucose</b>	<b>5,6</b>	<b>20</b>	<b>0,3</b>	<b>1,2</b>	<b>8,9</b>	<b>0,04</b>	<b>2,5</b>	<b>67</b>	<b>33</b>
<b>Fructose</b>	<b>1,4</b>	<b>4,7</b>	<b>0,1</b>	<b>0,65</b>	<b>2,8</b>	<b>0,1</b>	<b>0,9</b>	<b>48</b>	<b>52</b>
<b>Saccharose</b>	<b>3,0</b>	<b>4,6</b>	<b>1,2</b>	<b>3,3</b>	<b>6,1</b>	<b>1,8</b>	<b>3,2</b>	<b>28</b>	<b>72</b>
<b>Chlorid</b>	<b>20</b>	<b>34</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>26</b>	<b>13</b>	<b>18</b>	<b>34</b>	<b>66</b>
<b>Sulfat</b>	<b>5,2</b>	<b>14</b>	<b>3,5</b>	<b>9,1</b>	<b>17</b>	<b>3,0</b>	<b>7,9</b>	<b>20</b>	<b>80</b>
<b>Nitrat</b>	<b>80</b>	<b>113</b>	<b>59</b>	<b>43</b>	<b>76</b>	<b>6</b>	<b>54</b>	<b>44</b>	<b>56</b>
<b>Citrat</b>	<b>0,8</b>	<b>5,4</b>	<b>0,0</b>	<b>6</b>	<b>16</b>	<b>1</b>	<b>4,4</b>	<b>5</b>	<b>95</b>
<b>Malat</b>	<b>18</b>	<b>41</b>	<b>6,3</b>	<b>30</b>	<b>78</b>	<b>11</b>	<b>26</b>	<b>20</b>	<b>80</b>
<b>Phosphat</b>	<b>0,9</b>	<b>2,1</b>	<b>0,0</b>	<b>0,3</b>	<b>3,7</b>	<b>0,0</b>	<b>0,5</b>	<b>56</b>	<b>44</b>
<b>AS Gesamt</b>	<b>3,8</b>	<b>7,8</b>	<b>2,3</b>	<b>9,0</b>	<b>15,1</b>	<b>6,2</b>	<b>7,5</b>	<b>15</b>	<b>85</b>
<b>Gln</b>	<b>0,6</b>	<b>1,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,9</b>	<b>1,9</b>	<b>0,2</b>	<b>0,8</b>	<b>22</b>	<b>78</b>
<b>Glu</b>	<b>0,9</b>	<b>2,3</b>	<b>0,5</b>	<b>2,8</b>	<b>4,4</b>	<b>1,6</b>	<b>2,2</b>	<b>12</b>	<b>88</b>
<b>Asn</b>	<b>0,1</b>	<b>0,52</b>	<b>0,04</b>	<b>0,4</b>	<b>0,9</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>14</b>	<b>86</b>
<b>Asp</b>	<b>0,9</b>	<b>1,9</b>	<b>0,4</b>	<b>2,0</b>	<b>3,7</b>	<b>1,0</b>	<b>1,7</b>	<b>15</b>	<b>85</b>
<b>Ser</b>	<b>0,3</b>	<b>0,7</b>	<b>0,2</b>	<b>0,6</b>	<b>1,6</b>	<b>0,2</b>	<b>0,5</b>	<b>18</b>	<b>82</b>
<b>Val</b>	<b>0,3</b>	<b>0,7</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,7</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>20</b>	<b>80</b>
<b>Gly</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,0</b>	<b>0,5</b>	<b>2,3</b>	<b>0,1</b>	<b>0,4</b>	<b>10</b>	<b>90</b>
<b>Ala</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,0</b>	<b>0,4</b>	<b>0,9</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>11</b>	<b>89</b>
<b>Arg</b>	<b>0,03</b>	<b>0,1</b>	<b>0,0</b>	<b>0,04</b>	<b>0,2</b>	<b>0,0</b>	<b>0,04</b>	<b>24</b>	<b>76</b>
<b>GABA</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>1,0</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>26</b>	<b>74</b>

### 7.2.5.3 Basis-Spitze

Bezüglich der räumlichen Konzentrations-Gradienten auf dem Blatt wurden die Inhaltsstoffe in vier Klassen eingeteilt (Tab. 7.3):

- **Klasse BS:** Gehalt an der Basis höher als an der Spitze
- **Klasse SB:** Gehalt an der Spitze höher als an der Basis
- **Klasse H:** Homogen verteilte, vergleichbare Gehalte
- **Klasse U:** Uneinheitliche Verteilung

Diese Klasseneinteilung wurde sowohl für die Verteilungen in der Mittelrippe als auch für diejenigen der Intercostalfelder vorgenommen. Eine Substanz wurde nur dann den Klassen BS oder SB zugeordnet, wenn sie bei sieben der acht Messungen der Zeitreihe einen eindeutigen Konzentrationsgradienten aufwies.

Der Gradient wurde darüber hinaus noch quantifiziert: Es wurde der mittlere Quotient zwischen den Proben an Basis und Spitze errechnet (Tab. 7.3; BS: Basis dividiert durch Spitze; SB: Spitze dividiert durch Basis; vergleiche Abb. 7.31).

Die Zuordnung zu den Klassen H und U geschah nach Berechnung der Streuung relativ zum Mittelwert des jeweiligen Probenzeitpunktes. Die relative Streuung kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Wenn für einen bestimmten Inhaltsstoff der Mittelwert aller relativen Streuungen der acht Probenzeitpunkte unter 0,15 lag, wurde diese Substanz der Klasse H zugeordnet. Alle verbleibenden Stoffe wurden der Klasse U zugeordnet.

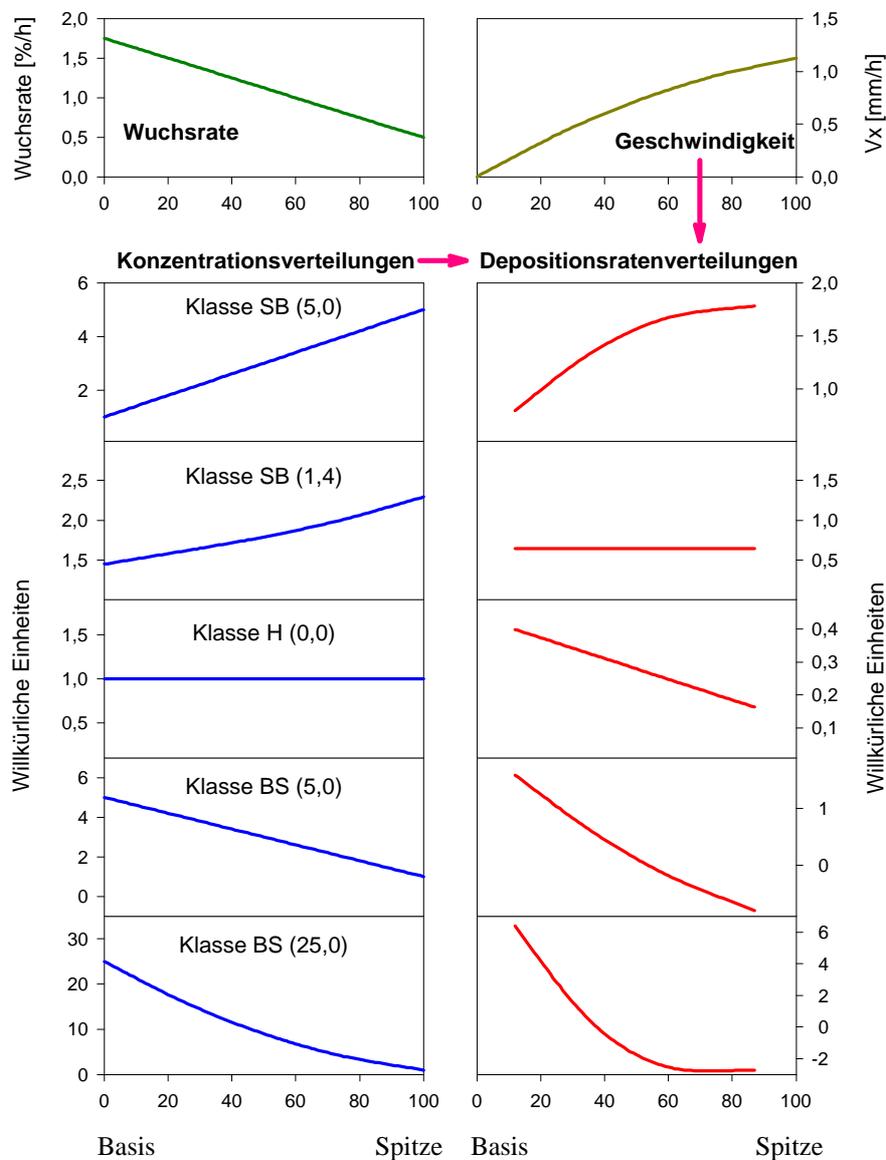
### Aussagekraft der Konzentrationsgradienten hinsichtlich Depositionsratenverteilungen

Die Klassenzugehörigkeit der Stoffe gibt nun nicht nur deren Konzentrationsverteilung in quantisierter Form wieder, sondern sie sagt auch qualitativ aus, wie die **Deposition der Stoffe** über das Blatt verteilt ist. Depositionsraten auf dem Blatt können in analoger Weise wie für die Wurzel berechnet werden (Kap. 2.3 und Kap. 6.1.4). Neben der Kenntnis des Konzentrationsprofils ist die Kenntnis des *Geschwindigkeitsfelds* auf dem Blatt Voraussetzung für die Berechnung von Depositionsraten.

Zur Berechnung dieses Feldes entlang der Blattmittelrippe wurde der mittlere Wuchsratengradient aus Abb. 7.23 herangezogen. Durch Integration erhält man die Geschwindigkeitsverteilung entlang der Rippe (Abb. 7.31 oben). Mit Hilfe dieser Verteilung können modellartig einige Depositionsratenverteilungen aus hypothetischen Konzentrationsverteilungen berechnet werden (Abb. 7.31 unten). Das zur Verfügung stehende Datenmaterial der Inhaltsstoffmessungen verfügt über eine zu geringe räumliche Auflösung sowie über zu große Schwankungen zwischen den einzelnen Erntezeitpunkten und soll daher nicht für eine quantitative Analyse der Depositionsraten-Verteilungen herangezogen werden. Ferner bestehen im Unterschied zur Wurzel im Blatt deutliche Tagesgänge der Konzentrationsverteilungen (Kap. 7.2.5.5), die für eine quantitative Berechnung von Depositionsraten mit wesentlich mehr Daten abgesichert werden müssten.

Die mittleren räumlichen Verteilungen der Stoffe lassen jedoch eine Aussage darüber zu, ob ein bestimmter Inhaltsstoff vorwiegend an der Blattbasis, an der Blattspitze oder gleichmäßig innerhalb des Blattes deponiert wird:

Wenn die Konzentrationsverteilung von der Basis zur Spitze hin monoton abfällt (Klasse BS), dann fällt die Depositionsratenverteilung noch stärker in dieser Richtung ab. Bei konstanten Konzentrationen entlang der Blatt-Mittelrippe liegt das Maximum der Depositionsratenverteilung immer noch an der stärker wachsenden Blattbasis. Erst wenn die Konzentrationsverteilung zur Spitze hin mit einem stärkeren Gradienten als 1,4 ansteigt, wird der betreffende Inhaltsstoff vorwiegend in der Blattspitze deponiert.



**Abb. 7.31 Schematischer Zusammenhang zwischen Konzentrations- und Depositionsratenverteilung**

Das zugrunde gelegte Geschwindigkeitsfeld ist oben rechts dargestellt; oben links: Räumlicher Wuchsratengradient aus Abb. 7.24??. Unten rechts: Depositionsratenverteilungen, die sich aus einigen beispielhaft ausgewählten hypothetischen Konzentrationsverteilungen (unten links) errechnen lassen.

### *Zucker*

Bei den Kohlenhydraten zeigt Glucose einen deutlichen BS-Gradienten mit höheren Gehalten in der Mittelrippen-Basis als in der Spitze (Abb. 7.28; Tab. 7.3). An der Basis sind Konzentrationen von bis zu 20  $\mu\text{mol/g}$  FG zu finden; an der Spitze liegen diese um einen Faktor 10 niedriger. Bei Fructose ist ein geringerer aber dennoch deutlicher BS-Gradient ausgeprägt; die Saccharose-Konzentrationen sind in Rippe wie Intercostalbereich homogen verteilt. Die hohen Konzentrationen und Depositionsraten von Glucose in der Basis der Mittelrippe könnten mit einem hohen Bedarf an Glucose in diesem Bereich korrelieren.

Dieser Bedarf könnte aus dem Zuwachs der hier besonders kräftig ausgeprägten Mittelrippe resultieren, deren Festigungs- und Leitgewebe einen hohen Anteil von strukturellen Kohlenhydraten aufweist, die aus Glucose-Untereinheiten bestehen (z.B. Zellulose). Zur Expansion dieser Strukturen ist eine große Menge von Glucose notwendig.

### *Aminosäuren*

Die Aminosäurenkonzentrationen zeigen im Intercostalbereich keine deutlichen Basis-Spitze-Gradienten, sondern eher ein leichtes Maximum in mittleren Bereichen des Blattes. In der Rippe ist jedoch stets ein SB-Gradient zu finden (Abb. 7.29, Tab. 7.3). Für fast alle Aminosäuren liegt dieser Gradient über 1,4; das heißt, dass Aminosäuren verstärkt an der Spitze in die Mittelrippe deponiert werden. Auch hier fällt, wie bei der Ader-Intercostalbereich-Verteilung, Glutamin aus dem Rahmen, da es keinen klaren SB-Gradienten bezüglich der Konzentration in den Rippen aufweist und im Intercostalbereich inhomogen verteilt ist als die übrigen Aminosäuren.

### *Anionen*

Bei den Anionen sind generell keine besonders deutlichen Gradienten zu finden (Abb. 7.30). Eine Ausnahme stellt hier allenfalls Phosphat dar, dessen Konzentration allerdings nur in den beiden basalen Segmenten von Rippe und Intercostalbereich leicht über der Nachweisgrenze liegt.

Der starke Gradient von Phosphat könnte durch die Hypothese erklärt werden, dass der Phosphatbedarf während der Blattentwicklung besonders stark absinkt und das Blatt deshalb an der weiter ausdifferenzierten Blattspitze einen wesentlich geringeren Gehalt aufweist als an der noch ‚jüngeren‘, weniger ausdifferenzierten Blattbasis.

**Tab. 7.3 Räumliche Verteilung der Inhaltsstoffe in Mittelrippe (MR) und Intercostalfeld (IC) von Tabak**

Die Inhaltsstoffe gehören hinsichtlich ihres Basis-Spitze-Gradienten vier verschiedenen Klassen an: BS: höhere Gehalte in der Basis; SB: höhere Gehalte in der Spitze; H: homogen verteilt; U: uneinheitlich. Für Stoffe der Klassen BS und SB ist in Klammern der entsprechende Gradient angegeben; rot: Verteilungen mit maximalen BS-Werten; blau: Verteilungen mit maximalen SB-Werten. Für Stoffe der Klassen H und U ist in Klammern die relative Streuung angegeben; grün: Verteilungen mit minimaler Streuung.

Inhaltsstoff	Gradienten		Inhaltsstoff	Gradienten	
	MR	IC		MR	IC
<b>Stärke</b>	SB (4,7)	H (0,12)	<b>AS Gesamt</b>	SB (2,3)	H (0,12)
<b>Glucose</b>	BS (10,2)	U (0,41)	<b>Gln</b>	U (0,15)	U (0,24)
<b>Fructose</b>	BS (4,4)	U (0,19)	<b>Glu</b>	SB (3,1)	H (0,11)
<b>Saccharose</b>	SB (1,4)	H (0,05)	<b>Asn</b>	SB (2,7)	U (0,21)
			<b>Asp</b>	SB (2,5)	H (0,12)
<b>Chlorid</b>	H (0,06)	SB (1,3)	<b>Ser</b>	SB (2,2)	H (0,10)
<b>Sulfat</b>	SB (2,1)	BS (1,9)	<b>Val</b>	SB (2,6)	H (0,06)
<b>Nitrat</b>	H (0,04)	H (0,09)	<b>Gly</b>	SB (3,2)	U (0,16)
<b>Citrat</b>	U (---)	U (0,15)	<b>Ala</b>	SB (2,9)	H (0,11)
<b>Malat</b>	BS (1,7)	SB (1,3)	<b>Arg</b>	SB (1,8)	H (0,09)
<b>Phosphat</b>	U (---)	U (---)	<b>GABA</b>	U (0,15)	H (0,11)

#### 7.2.5.4 Versuchsdesign ‚Inhaltsstoffanalyse Rizinus‘

Für dieses Experiment wurden 70 Pflanzen verwendet. Es wurden nicht nur Inhaltsstoffanalysen durchgeführt, sondern auch Versuche zum Einfluss von Zugkräften auf das Wachstum (Abb. 7.32; vergleiche Kap. 7.3). Aufgrund der hohen Anzahl von Pflanzen konnte die Kultivierung nicht in der Plexikammer erfolgen, sondern musste im Gewächshaus durchgeführt werden. Dort wurden hinsichtlich Tageslänge, Lichtintensität, Temperatur und Luftfeuchte dieselben externen Bedingungen eingestellt wie in der Plexikammer.



**Abb. 7.32 Abgespannte Rizinusblätter für Versuch ‚Inhaltsstoffanalyse‘**

Die Pflanzen wurden hinsichtlich des Entwicklungszustandes ihrer Blätter in zwei Populationen gruppiert:

- ‚Junge Blätter‘
- ‚Alte Blätter‘



**Abb. 7.33 Blattpopulationen der Rizinus-Inhaltsstoffanalyse:**

‚Junges‘ Blatt (oben) und ‚altes‘ Blatt (unten)

‚Junge‘ Blätter (F1-Blätter, Abb. 7.33 links) hatten relative Wuchsraten von 40 ( $\pm 10$ ) %/d; die Ausgangslänge ihres mittleren Blattlappens betrug 6 ( $\pm 1$ ) cm; ‚alte‘ Blätter (Primärblätter, Abb. 7.33 rechts) hatten relative Wuchsraten von 8 ( $\pm 4$ ) %/d und Ausgangslängen von 11 ( $\pm 2$ ) cm. Die zeitliche Entwicklungsdifferenz zwischen jungen und alten Blättern betrug etwa zwölf Tage. Sechs Pflanzen der beiden Populationen wurden der Gesamtpopulation als Kontrollen entnommen. Die Blätter dieser Pflanzen wurden keiner Zugbeeinflussung ausgesetzt.

Die Hauptuntersuchungsblätter aller übrigen Pflanzen wurden zu Sechsergruppen zusammengestellt und mit Massen von 2, 5, 12 oder 30 g nach vorne und hinten abgespannt, um ein Abspannen der Blätter wie im DISP-Aufbau zu simulieren. Das Zusammenstellen der Sechsergruppen geschah nach dem Kriterium vergleichbarer Längen-Zuwachsraten der Mittelrippe. Diese Wachsraten wurden mit einer Linealvermessung zwei Tage vor dem Anhängen der Massen untersucht. 52 h nach Anlegen der Zugkraft wurde die Länge der Mittelrippe nochmals gemessen.

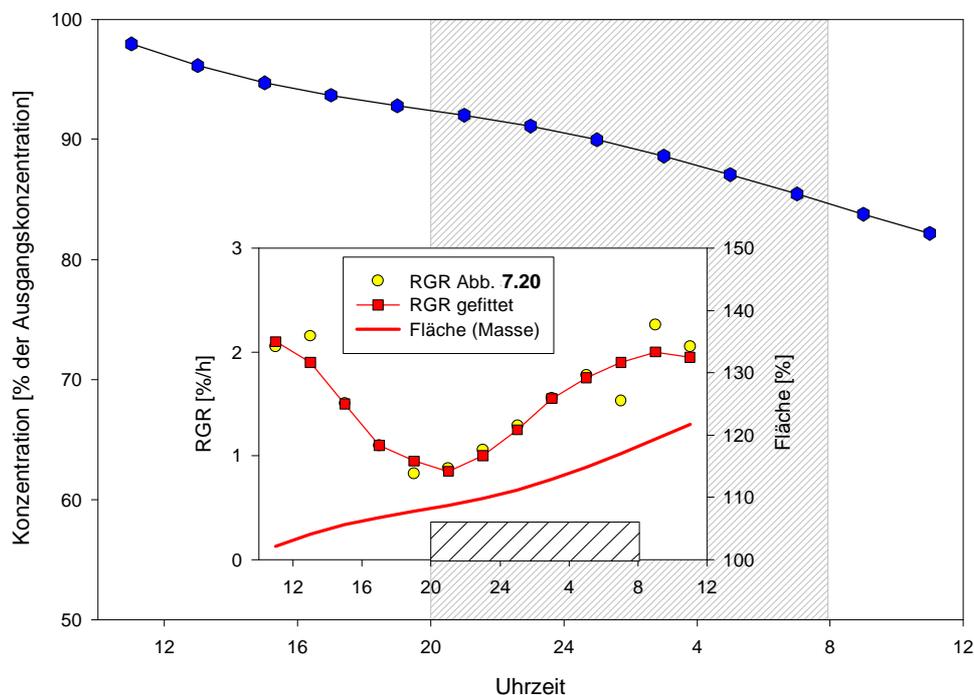
Im Anschluss an diese Messung fand alle vier Stunden eine Ernte statt. Bei jeder Ernte wurden je drei nicht-zugbelastete junge und alte Blätter (zum großen Teil von Pflanzen mit einem anderen, Zug-belasteten Blatt) ausgesucht nach dem Kriterium vergleichbarer mittlerer Wachsraten der Blätter der verschiedenen Ernten. In der Mitte der Nacht sowie zwei Stunden nach Tagesbeginn wurden auch je drei junge und alte Blätter jeder Zugbelastungs-Population geerntet.

Bei der Ernte jedes Blattes wurde zunächst die Expansibilität bestimmt (Kap. 3.3). Dann wurde je eine 8-mm-Blattscheibe von der Intercostalregion an der Blattbasis und an der Blattspitze ausgestochen und vereinigt. Schließlich wurde noch der Interzellular- und Mittelrippenanteil sowie der Trockengewichtsanteil bestimmt.

### 7.2.5.5 Tagesgang

Bei vielen Inhaltsstoff-Konzentrationen ergibt sich neben der oben besprochenen räumlichen auch eine erhebliche zeitliche Variation im Verlauf von 24 Stunden (Abb. 7.28 bis 7.30 und 7.35). Es wäre theoretisch denkbar, dass der Tagesgang der Wachstumsvariation und der damit verbundene zeitlich inhomogene ‚Verdünnungseffekt‘ zu schwankenden Konzentrationen im Blatt führen. Bei näherer Betrachtung wirken sich die variierenden Wuchsraten jedoch nur marginal auf den Verlauf des absoluten Blattzuwachses aus (Abb. 7.34): Unter der Annahme einer diskreten anfänglichen Menge eines Inhaltsstoffes im Blatt würde die Zeitreihe der Konzentration im Verlauf des Tages dementsprechend nahezu monoton abnehmen. Ein derartiger Verlauf konnte für keinen der untersuchten Inhaltsstoffe festgestellt werden. Im Verlauf von 24 h schwanken die gemessenen Konzentrationen zwar; im Mittel kommt es jedoch weder zu einer signifikanten Zu- noch zu einer Abnahme.

Das heißt, dass der Stoffeintransport (bzw. der Metabolismus) so reguliert ist, dass im Tagesmittel die einzelnen Inhaltsstoffe mit derselben Rate deponiert werden, mit der auch das Blatt wächst. Auftretende Konzentrations-Variationen sind durch eine Variation der Stoff-Depositionsrate um diesen Mittelwert der Deposition herum bedingt. Bezieht man die maximal auftretende Konzentrations-Variation pro Zeiteinheit auf den Mittelwert der Konzentration so erhält man ein Maß, das nachfolgend *‘maximale relative Deposition’* genannt wird (analog Kap. 6.2.4).



**Abb. 7.34** Auswirkung des Wachstums-Tagesgangs auf eine Konzentrations-Zeitreihe

Der zu Grunde liegende Tagesgang (Inset) wurde Abb. 7.20 entnommen; hieraus wurde die Zunahme der Blattmasse berechnet (Inset: rote Linie). Unter der Annahme einer zeitlich konstanten Inhaltsstoff-Menge im Blatt wurde dann die zugehörige Konzentrations-Zeitreihe (blaue Kurve) berechnet.

Die **Konzentrations-Zeitreihen** der Inhaltsstoffe von Tabak und Rizinus können auch in diesem Abschnitt wieder in bestimmte **Klassen** gruppiert werden (Tab. 7.4 und Tab. 7.5):

- **Klasse T:** Stoff zeigt einen Tagesgang. Die Mittelwerte der durchgeführten Konzentrationsmessungen liegen entlang einer Sinuslinie. Es darf höchstens ein ‚Ausreisser‘ im Kollektiv der Messungen enthalten sein. Zwischen maximalem und minimalem Wert der Zeitreihe muss ein signifikanter Unterschied bestehen. Der Zeitpunkt des Maximums wird in Klammern angegeben: T (Uhrzeit).
- **Klasse K:** Stoff zeigt einen zeitlich konstanten Verlauf. Die Mittelwerte der durchgeführten Konzentrationsmessungen liegen entlang einer Geraden. Es darf höchstens ein ‚Ausreisser‘ im Kollektiv der Messungen enthalten sein.
- **Klasse V:** Stoff variiert zeitlich sehr stark. Hierzu gehören alle übrigen Inhaltsstoffe.

Für Tabak erfolgt die Klassenangabe nach Mittelrippe und Intercostalbereich getrennt unter Verwendung der Mittelwerte der vier von unterschiedlichen Orten stammenden Proben (Tab. 7.4).

Bei Rizinus wurden nur Intercostalfelder beprobt. Die Klassenangabe erfolgt hier getrennt für ältere Primärblätter (P) sowie jüngere Folgeblätter (F1). Die Werte der einzelnen Zeitpunkte stellen Mittelwerte von 3 Proben dar. Für Rizinus (Tab. 7.5) werden zusätzlich die jeweiligen Zeitreihen-Mittelwerte sowie Minimum und Maximum mit angegeben; für Tabak (Tab. 7.4) kann diese Information Kap. 7.2.5.2 (Tab. 7.2) entnommen werden.

#### *Kohlenhydrate (Tabak)*

Bei Tabak scheinen alle gemessenen Kohlenhydrate einen Tagesgang aufzuweisen (Abb. 7.28; Tab. 7.4). Während Glucose und Fructose in der Rippe in der Mitte der Nacht maximale Werte zeigen, treten die höchsten Gehalte von Stärke und Saccharose im Intercostalbereich am Ende des Tages auf. Die maximalen relativen Depositionen erreichen hierbei Werte von bis zu 20 %/h (Glucose ändert die Konzentration um maximal 80 % in einem 4-h-Intervall).

#### *Aminosäuren (Tabak)*

Die Aminosäuren zeigen zwar summarisch eine sehr konstante Zeitreihe (Abb. 7.29; Tab. 7.4); einzelne Aminosäuren wie Glutamin (Maximum am Ende des Tages) und Asparagin (Maximum in der Mitte der Nacht) verfügen jedoch über ausgeprägte Tagesgänge mit maximalen relativen Depositionen von etwa 15 %/h.

#### *Anionen (Tabak)*

Die Anionen zeigen ein sehr uneinheitliches Bild: Das Spektrum reicht von einem sehr deutlichen Tagesgang bei Citrat bis hin zu weitgehend konstanten Verhältnissen bei Nitrat (Abb. 7.30; Tab. 7.4). Bei Citrat befindet sich das Maximum direkt am Tag-Nacht-Übergang; die Zeitreihe verläuft weitgehend parallel zu derjenigen des Wachstums. Es tritt eine maximale relative Deposition von 25 %/h auf.

**Tab. 7.4 Tagesgänge von Inhaltsstoff-Konzentrationen in Tabakblättern des Blattstockwerks Nr. 12**

Klasse T: Substanz zeigt Tagesgang (Uhrzeit [h] des Maximalwertes), rot: Maximum stimmt zeitlich mit Wachstumsmaximum überein; blau: Maximum tritt zu Zeit des Wachstumsminimums auf;  
 Klasse K: konstante zeitliche Verteilung; Klasse V: Variationen im Verlauf des Tages sehr groß.

Inhaltsstoff	Tagesgang		Inhaltsstoff	Tagesgang	
	MR	IC		MR	IC
<b>Stärke</b>	V	T (20)	<b>AS Gesamt</b>	K	K
<b>Glucose</b>	T (02)	V	<b>Gln</b>	T (20)	T (20)
<b>Fructose</b>	T (02)	V	<b>Glu</b>	K	T(4)
<b>Saccharose</b>	K	T (16)/V	<b>Asn</b>	T (24)	T (24)
			<b>Asp</b>	K	T (24)
<b>Chlorid</b>	V	K	<b>Ser</b>	K	T(16)
<b>Sulfat</b>	K	K	<b>Val</b>	T (24)	K
<b>Nitrat</b>	V	V	<b>Gly</b>	K	T (16)
<b>Citrat</b>	T (08)	T (08)	<b>Ala</b>	K	V
<b>Malat</b>	T (04)	T (19)	<b>Arg</b>	K	V
<b>Phosphat</b>	K	V	<b>GABA</b>	K	K

#### *Kohlenhydrate (Rizinus)*

Bei Rizinus lassen sich bezüglich der Kohlenhydrate (Abb. 7.35, Tab. 7.5) nur für Stärke (maximale relative Deposition 20 %/h) und Saccharose (maximale relative Deposition 5 %/h) Tagesgänge erkennen. Glucose und Fructose zeigen stark schwankende Konzentrationszeitreihen.

#### *Aminosäuren (Rizinus)*

Bei den Aminosäuren ergibt sich ein ganz ähnliches Bild wie bei Tabak: Die Summe der einzelnen Spezies weist eine recht konstante Zeitreihe auf; jedoch treten auch hier in einer Reihe von Stoffen deutliche Tagesgänge auf (Tab. 7.5). Hierzu gehören Glutaminsäure, Asparaginsäure, Asparagin und Alanin (maximale relative Deposition etwa 10 %/h). Der Zeitreihe von Glutamin kann dagegen in Rizinus kein Tagesgang zugesprochen werden (Abb. 7.35).

#### *Kationen (Rizinus)*

Die gemessenen Kationen zeigen hier mit Ausnahme von Magnesium und Ammonium in den jungen Folgeblättern (Klasse V) sehr konstante Zeitreihen (Tab. 7.5), wie dies etwa im Fall von Calcium zu sehen ist (Abb. 7.35).

**Tab. 7.5 Tagesgänge von Inhaltsstoff-Konzentrationen in Rizinusblättern (F1 und P)**

Klasse T: Substanz zeigt Tagesgang (Uhrzeit [h] des Maximalwertes), rot: Maximum stimmt zeitlich mit Wachstumsmaximum überein; blau: Maximum tritt zu Zeit des Wachstumsminimums auf;  
 Klasse K: konstante zeitliche Verteilung; Klasse V: Variationen im Verlauf des Tages sehr groß.

Die Messungen stammen aus Ernten von je drei Blättern (Intercostalfelder von Basis und Spitze vereinigt)  
 Mittel, Max und Min: Mittelwert der Proben aller Ernten, Maximum und Minimum der Zeitreihe

Inhaltsstoff	Konzentrationen bei KH und AS: [ $\mu\text{mol/g}$ FG]; Kationen [ $\mu\text{mol/g}$ TG]							
	Junge Folgeblätter F1				Ältere Primärblätter P			
	Tagesgang	Mittel	Max	Min	Tagesgang	Mittel	Max	Min
<b>Stärke</b>	<b>T (19)</b>	<b>17</b>	34	2	<b>T (23)</b>	<b>48</b>	90	12
<b>Glucose</b>	<b>V</b>	<b>5,7</b>	12	2	<b>V</b>	<b>6,3</b>	10	3
<b>Fructose</b>	<b>V</b>	<b>4,4</b>	8	2	<b>V</b>	<b>5,4</b>	8	3
<b>Saccharose</b>	<b>T (19)</b>	<b>19</b>	24	14	<b>K</b>	<b>20</b>	24	17
<b>Kalium</b>	<b>K</b>	<b>1670</b>	2190	1225	<b>K</b>	<b>1700</b>	1870	1530
<b>Calcium</b>	<b>K</b>	<b>103</b>	159	50	<b>K</b>	<b>488</b>	561	425
<b>Magnesium</b>	<b>V</b>	<b>111</b>	140	85	<b>K</b>	<b>218</b>	240	191
<b>Ammonium</b>	<b>V</b>	<b>49</b>	61	25	<b>K</b>	<b>29</b>	38	17
<b>Lithium</b>	<b>K</b>	<b>25</b>	31	17	<b>K</b>	<b>13</b>	17	10
<b>AS Ges</b>	<b>K</b>	<b>25</b>	31	21	<b>V</b>	<b>12,3</b>	16,7	9,6
<b>Gln</b>	<b>V</b>	<b>4,4</b>	6,6	2,1	<b>V</b>	<b>0,9</b>	1,9	0,3
<b>Glu</b>	<b>T (15)</b>	<b>5,9</b>	8,1	3,2	<b>K</b>	<b>3,8</b>	5,1	2,7
<b>Asn</b>	<b>T (08)</b>	<b>1,1</b>	1,9	0,4	<b>T (08)</b>	<b>0,2</b>	0,4	0,1
<b>Asp</b>	<b>T (02)</b>	<b>3,9</b>	6,2	1,5	<b>T (08)</b>	<b>3,2</b>	4,6	2,6
<b>Ser</b>	<b>K</b>	<b>0,8</b>	1,3	0,6	<b>T (11)</b>	<b>0,9</b>	1,6	0,3
<b>Val</b>	<b>K</b>	<b>2,2</b>	2,6	1,9	<b>K</b>	<b>1,1</b>	1,5	0,8
<b>Gly</b>	<b>V</b>	<b>0,2</b>	0,5	0,07	<b>V</b>	<b>0,1</b>	0,3	0,06
<b>Ala</b>	<b>T (15)</b>	<b>1,2</b>	1,7	0,7	<b>T (15)</b>	<b>0,7</b>	1,1	0,2
<b>Arg</b>	<b>V</b>	<b>2,9</b>	5,2	1,1	<b>K</b>	<b>0,07</b>	0,09	0,03
<b>GABA</b>	<b>T (15)</b>	<b>1,2</b>	1,8	0,9	<b>K</b>	<b>0,5</b>	0,6	0,4
<b>Phe</b>	<b>V</b>	<b>0,13</b>	0,20	0,08	<b>T (23)</b>	<b>0,14</b>	0,20	0,08

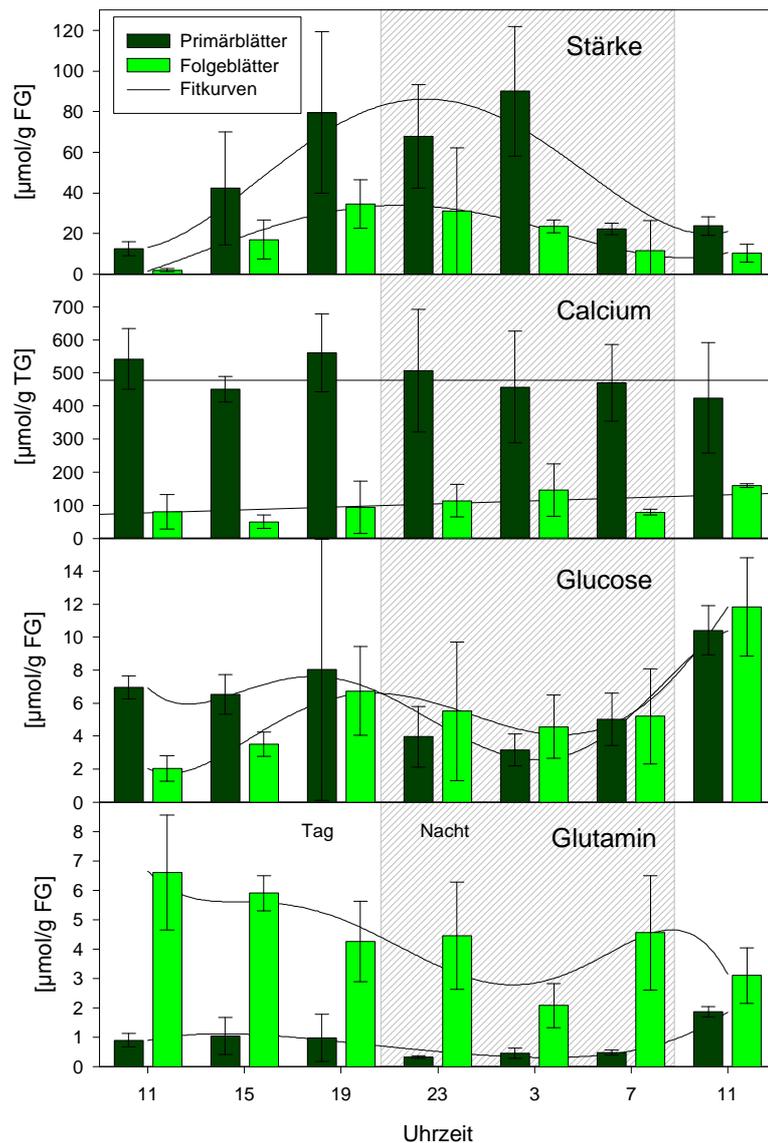


Abb. 7.35 Zeitreihen von Stärke, Calcium, Glucose und Glutamin in Rizinusblättern

### 7.2.5.6 Unterschiedliche Blattstockwerke

Pflanzen sind modular aufgebaute Organismen. Ihre Blätter entwickeln sich nach nahezu identischen Mustern in einem gewissen zeitlichen Abstand zueinander. Die zeitliche Differenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Blättern wird ‚Plastochron‘ (Askenasy 1880) genannt.

Untersucht man gleichzeitig *zwei verschiedene Blattstockwerke*, so gewinnt man mit recht guter Präzision Informationen über *zwei zeitlich aufeinanderfolgende Zustände*, die jedes der beiden Blattstockwerke gleichartig durchläuft. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei den geernteten Rizinuspflanzen zwei; bei den Tabakpflanzen drei Blattstockwerke (T9, T12 und T15) beprobt, um ein Bild über den Entwicklungsverlauf der Inhaltsstoffe über eine größere Zeitskala als einen Tag zu erlangen. Bei Rizinus treten Plastochrone von 10 – 14 Tagen auf. Die Plastochronlänge von Tabak beträgt im untersuchten Entwicklungsstadium etwa 2-3 Tage (siehe Walter 1997).

### Berechnung zeitlicher Entwicklungsgradienten für Inhaltsstoffe

Unter der Annahme, dass zwischen den beiden Rizinus-Blattstockwerken eine zeitliche Entwicklungsdifferenz von 12 Tagen und zwischen den Tabak-Blattstockwerken T9 und T15 15 Tage lagen, wurden die zeitlichen Entwicklungsgradienten der verschiedenen Inhaltsstoffe als Änderung ihrer Konzentration pro Tag berechnet (Tab. 7.6). Ein positiver Gradient drückt aus, dass die Konzentration im Verlauf der Entwicklung zunimmt; negative Gradienten zeigen Konzentrationsabsenkungen an. Die Gradienten wurden wie folgt berechnet:

$$\text{Rizinus: } G_R = \frac{C_P - C_{F1}}{12}$$

$$\text{Tabak: } G_T = \frac{C_{T9} - C_{T15}}{15}$$

Dabei steht  $G_R$  bzw.  $G_T$  für den Gradienten von Rizinus bzw. Tabak und hat die Einheit [ $\mu\text{mol/g FG/d}$ ].  $C_P$  steht für die jeweilige mittlere Konzentration des Rizinus-Primärblattes;  $C_{T9}$  steht für die mittlere Konzentration des Tabakblattes von Position 9.

Normiert man diese Gradienten auf die mittlere Konzentration der beiden verrechneten Blattstockwerke, so erhält man den ‚relativen zeitlichen Entwicklungsgradienten‘  $G_{\text{rel}}$ . Mit Hilfe dieses Quotienten kann die zeitliche Änderung verschiedener Stoffe miteinander verglichen werden.

### Zeitliche Entwicklungsgradienten bei Tabak und Rizinus

Bei Tabak liegen die Mittelwerte der jeweiligen Konzentrationen im Blattstockwerk T12 (Tab. 7.2) fast immer zwischen den Werten von T9 und T15 (Tab. 7.6). Die Konzentrationen aller Inhaltsstoffe scheinen also im Verlauf der Blattentwicklung entweder monoton ab- oder zuzunehmen. Die Differenzen zwischen Werten in T9 und in T15 sind jedoch meist geringer als die tageszeitliche bzw. räumliche Variation in T12. Das heißt, dass die Inhaltsstoffkonzentrationen **im Tagesgang enorm variabel** sind, wie sich am Beispiel von Citrat veranschaulichen lässt: Bei Citrat tritt im Verlauf des Tages in T12 eine Konzentrationsdifferenz von  $14 \mu\text{mol/g FG}$  auf (maximale relative Deposition  $25 \text{ %/h}$ ); die Mittelwerte von T9 und T15 unterscheiden sich jedoch nur um  $7 \mu\text{mol/g FG}$  (Abb. 7.36), was bei einem Mittelwert von  $5 \mu\text{mol/g FG}$  einem relativen zeitlichen Entwicklungsgradienten von  $9 \text{ %/d}$  entspricht.

Die kurzfristigen, tageszeitlichen Schwankungen der Inhaltsstoff-Variation übertreffen die langfristigen, entwicklungsbedingten Variationen also bei Citrat um den Faktor 70!

Stoffe, die einen Tagesgang in T12 aufweisen, verfügen meist auch in T15 über eine tagesrhythmisch variierende Zeitreihe, wie dies nicht nur für Citrat, sondern auch für Saccharose und Glutamin zu sehen ist (Abb. 7.36). In vielen Fällen sind die **Tagesrhythmen um so deutlicher ausgeprägt, je jünger das Blatt** ist (z.B. bei Saccharose). Dies ist eine Analogie zu den Verhältnissen des Wachstum-Tagesrhythmus, dessen Amplitude ebenfalls mit der Zeit abnimmt (vergleiche Abb. 7.17 und Abb. 7.22).

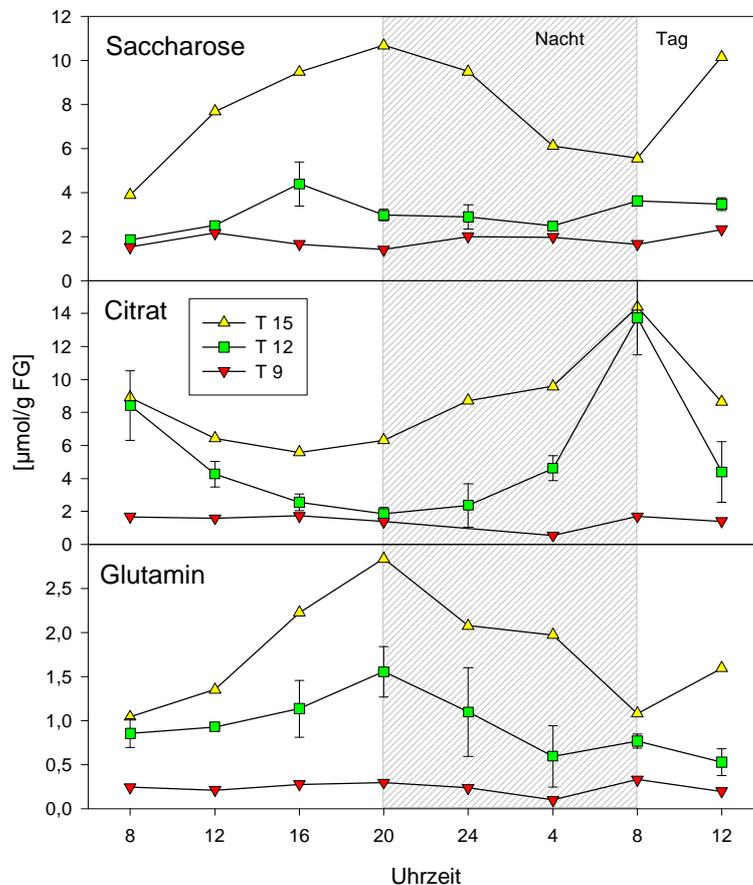
**Tab. 7.6 Tageszeitlich und über Basis und Spitze gemittelte Intercostalfeld-Konzentrationen (C) sowie zeitliche Entwicklungsgradienten (G) in verschiedenen Blattstockwerken von Tabak und Rizinus**Tabak: C<sub>T9</sub>: Mittlere Konzentration [ $\mu\text{mol/g FG}$ ] in Blatt 9; (C<sub>T15</sub>: Blatt 15);G<sub>T</sub> zeitlicher Entwicklungsgradient [ $\mu\text{mol/g FG/d}$ ] zwischen den Konzentrationen beider Blattstockwerke;G<sub>Trel</sub>: relativer zeitlicher Entwicklungsgradient [%/d]; normiert auf mittlere Konzentration der beiden Blattstockwerke.Rizinus: Entsprechende Größen für Primärblatt und Folgeblatt F1. grün: minimale, rot/blau: maximal pos/neg. G<sub>Trel</sub>

Inhaltsstoff	Tabak (keine Kationendaten)				Rizinus (keine Anionen) C <sub>Kation</sub> [ $\mu\text{mol/gTG}$ ]			
	C <sub>T9</sub>	C <sub>T15</sub>	G <sub>T</sub>	G <sub>T,rel</sub>	C <sub>P</sub>	C <sub>F1</sub>	G <sub>R</sub>	G <sub>R,rel</sub>
<b>Stärke</b>	2	12	-0,7	-10	48	17	2,6	8
<b>Glucose</b>	2,0	3,0	-0,07	-3	6,3	5,7	0,05	1
<b>Fructose</b>	2,0	1,1	0,06	4	5,4	4,4	0,08	2
<b>Saccharose</b>	1,8	8,2	-0,43	-9	20	19	0,08	0
<b>Chlorid</b>	17	21	-0,27	-1	-	-	-	-
<b>Sulfat</b>	5,4	15,4	-0,67	-6	-	-	-	-
<b>Nitrat</b>	28	13	1,0	5	-	-	-	-
<b>Citrat</b>	1,4	8,5	-0,47	-9	-	-	-	-
<b>Malat</b>	44	30	0,93	3	-	-	-	-
<b>Phosphat</b>	0	4,0	-0,27	-14	-	-	-	-
<b>Kalium</b>	-	-	-	-	1700	1670	2,5	0
<b>Calcium</b>	-	-	-	-	488	103	32	11
<b>Magnesium</b>	-	-	-	-	218	111	8,9	5
<b>Ammonium</b>	-	-	-	-	29	49	-1,7	-4
<b>Lithium</b>	-	-	-	-	13	25	-1,0	-5
<b>AS Ges</b>	5,9	15,1	-0,61	-6	12,3	25	-1,1	-6
<b>Gln</b>	0,2	1,9	-0,11	-10	0,9	4,4	-0,3	-11
<b>Glu</b>	2,1	4,3	-0,15	-5	3,8	5,9	-0,18	-4
<b>Asn</b>	0,2	0,7	-0,03	-7	0,2	1,1	-0,08	-12
<b>Asp</b>	1,0	3,8	-0,19	-8	3,2	3,9	-0,06	-2
<b>Ser</b>	0,3	0,9	-0,04	-7	0,9	0,8	0,01	1
<b>Val</b>	0,5	0,6	-0,01	-2	1,1	2,2	-0,09	-5
<b>Gly</b>	0,2	0,4	-0,01	-3	0,1	0,2	-0,01	-7
<b>Ala</b>	0,3	0,8	-0,03	-5	0,7	1,2	-0,04	-4
<b>Arg</b>	0,04	0,15	-0,01	-10	0,07	2,9	-0,24	-16
<b>GABA</b>	0,4	0,8	-0,03	-5	0,5	1,2	-0,06	-7

**Die stärksten relativen Zunahmen** werden in Tabak für Nitrat (5 %/d); in Rizinus für Calcium (11 %/d), Magnesium (5 %/d) und für Stärke (8%/d) gefunden. In absoluten Einheiten entspricht dies beispielsweise einer Zunahme für Calcium bei Rizinus von 32  $\mu\text{mol/g FG/d}$ . Diese Zunahme stimmt mit der Fitlinie der Konzentrationsmessungen im Tagesgang der F1-Blätter sehr gut überein (Abb. 7.35). Das deutet darauf hin, dass Calcium tatsächlich mit einer *tageszeitlich sehr konstanten Depositionsrates* im Blatt eingelagert wird. Calcium erreicht mit dem Transpirationsstrom im Xylem das Blatt und kann aufgrund seiner geringen Phloemmobilität von dort schlecht remobilisiert werden (Marschner 1995).

**Die stärksten relativen Abnahmen** im Verlauf der Entwicklung finden sich für Arginin (Tabak: -10 %/d; Rizinus: -16 %/d) sowie Glutamin (Abb. 7.35 und 7.36), für das die Abnahmeraten der beiden Arten nahezu identisch sind (Tabak -10 %/d; Rizinus -11 %/d). Bei Tabak wird auch für Stärke (-10 %/d) und für Phosphat (-14 %/d) eine sehr starke Abnahme festgestellt. Über eine entwicklungsbedingte Abnahme von Phosphat war schon im vorigen Abschnitt im Zusammenhang mit dessen Basis-Spitze-Gradienten spekuliert worden. Bei Rizinus weist Asparagin (-12 %/d) eine sehr hohe relative Abnahme auf.

**Konstante Verhältnisse während der Entwicklung** ( $G_{\text{Trel}}$  etwa Null) werden in Tabak für Chlor; in Rizinus für Kalium, Glucose, Saccharose und Serin festgestellt.



**Abb. 7.36 Saccharose-, Citrat- und Glutamin-Zeitreihen in verschiedenen Blattstockwerken von Tabak**

T9: RGR < 5 %/d; Länge ca. 15 cm; T12: RGR ca. 30 %/d; Länge ca. 10 cm; T15: RGR ca. 100 %/d; Länge ca. 3 cm.

### 7.2.5.7 Relationen von Zuckern und Aminosäuren

Im Verlauf der Entwicklung verändern sich die Relationen sowohl der einzelnen Spezies von Zuckern und Aminosäuren als auch das Verhältnis von Zuckern und Aminosäuren (**C:N-Verhältnis**) insgesamt. Trägt man summarisch die mittleren Konzentrationen auf, die im Verlauf der vorigen Abschnitte für die unterschiedlichen Blattstockwerke von Tabak und Rizinus präsentiert wurden (Tab. 7.2 und Tab. 7.6) und normiert man diese auf die Summe der Konzentrationen des jeweiligen Blattes, so lassen sich die Verschiebungen der Relationen sehr einfach untersuchen (Abb. 7.37).

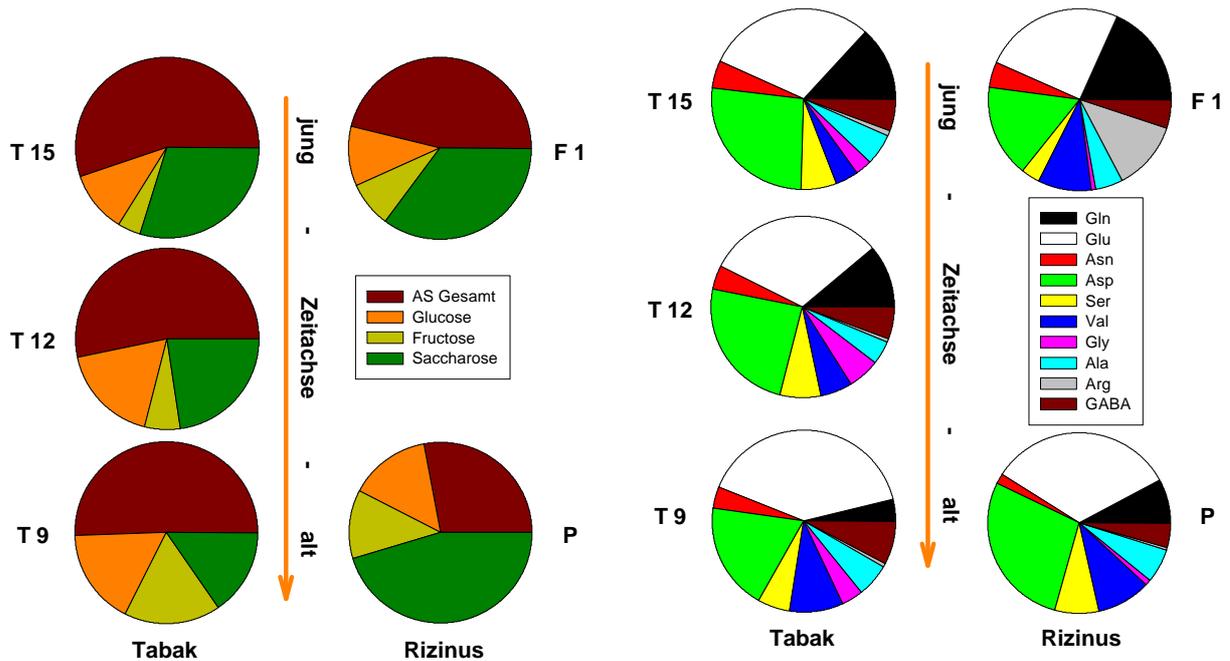


Abb. 7.37 Relationen von Zuckern zu Aminosäuren (links) sowie einzelner AS-Spezies zueinander (rechts)

Sowohl für Tabak als auch für Rizinus ist zu erkennen, dass im Verlauf der Entwicklung das Verhältnis von Zuckern zu Aminosäuren zunimmt. Eine relativ hohe Konzentration von Aminosäuren liegt zu Beginn der Blattentwicklung vor; an deren Ende finden sich dagegen erhöhte Konzentrationen von Zuckern (Zucker:AS Gesamt steigt bei Tabak von 4:5 auf 1:1; bei Rizinus von 6:5 auf 2:1).

Innerhalb der drei untersuchten Spezies löslicher Kohlenhydrate verschiebt sich bei Tabak das Verhältnis von Saccharose zu Hexosen im Verlauf der Entwicklung deutlich auf die Seite der Hexosen. Liegt es im stark zuwachsenden Blatt 15 bei 2:1, so liegt es im nahezu ausgewachsenen Blatt 9 nur noch bei 1:2. Bei Rizinus bleibt es etwa bei 2:1. Dies legt eine Erhöhung der Invertase-Aktivität nahe. Bei beiden Arten ändert sich das Verhältnis von Glucose zu Fructose. Bei Tabak geht es von 3:1 auf 1:1 zurück; bei Rizinus von 4:3 auf 6:5.

Innerhalb der Aminosäuren fällt während der Entwicklung vor allem die Verschiebung der Anteile von Glutamin und Glutamat auf: In jungen Blättern liegt bei beiden untersuchten Arten ein hohes Verhältnis von Glutamin zu Glutamat vor (Tabak: 1:2; Rizinus: 2:3). Dieses Verhältnis sinkt im Verlauf der Entwicklung ab (Tabak: 1:10; Rizinus 1:4). Ein hoher Anteil von Glutamin ist also charakteristisch für gut zuwachsende Blätter. Bei den übrigen Aminosäuren fällt vor allem die Abnahme von Arginin im Verlauf der Entwicklung in beiden Arten auf.

Es wäre denkbar, dass im **im Verlauf des Tagesganges** ähnliche Verschiebungen der Relationen von Zuckern und Aminosäuren auftreten, wie sie oben für den Verlauf der Entwicklung des Blattes aufgezeigt wurden. Dies wäre ein Indiz dafür, dass die Relationen von Aminosäuren und Zuckern Wachstums-regulierende Funktion haben könnten.

Alle vier oben beschriebenen Verhältnisse zeigen während der Blattentwicklung (über mehrere Stockwerke betrachtet) ein Maximum bei hohen Wuchsraten. Würde diese Beziehung auch im Tagesgang auftreten, so müssten Peakwerte am Nacht-Tag-Übergang zu sehen sein.

Bei Untersuchung der Verhältnisse in Rizinus und Tabakblättern während des Tagesganges ergibt sich jedoch keine Verteilung, die in irgendeiner Art und Weise mit der diurnalen Wachstumsverteilung korrelieren würde (Abb. 7.38). Allenfalls lässt sich bei Rizinus für das Glutamin:Glutamat-Verhältnis ein Peak am Ende der Nacht ausmachen; in Tabak liegen die Verhältnisse jedoch genau umgekehrt; dort tritt ein leichter Peak am Beginn der Nacht ein, obwohl in beiden Arten das Maximum des Wachstums am Nacht-Tag-Übergang stattfindet.

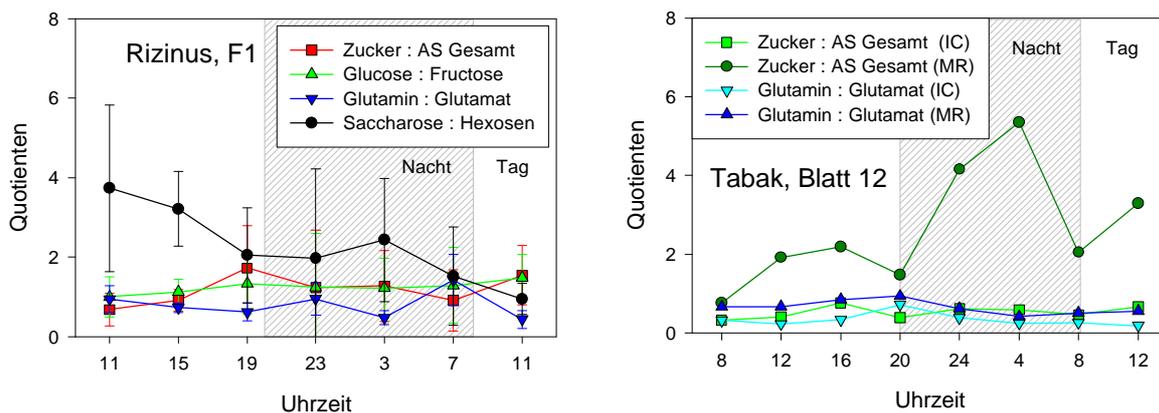


Abb. 7.38 Relationen von Zuckern und Aminosäuren im Tagesgang bei Rizinus- und Tabakblättern

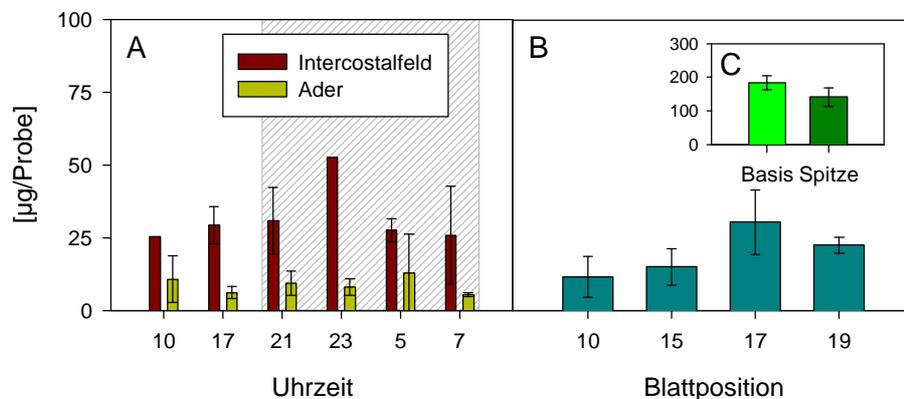
Die im Verlauf der Blattentwicklung auftretenden Verschiebungen in den Relationen zwischen Zuckern und Aminosäuren scheinen also nicht auch mit der Ausprägung des Wachstums-Tagesganges verknüpft zu sein.

## 7.2.6 Expression des Expansin-Gens NtExp1

Expansin ist ein Schlüsselenzym der Regulation von Extensionsvorgängen der Zellwand. Auf der Suche nach einer möglichen genetischen Kontrolle der oben beschriebenen raum-zeitlichen Wachstumsverteilungen lag es daher nahe, in einem ersten Schritt die Expression von Expansin in verschiedenen Blattbereichen zu verschiedenen Tageszeiten zu untersuchen. Die Quantifizierung der Expression von NtExp1 in Tabak erfolgte über eine Quantifizierung des spezifischen NtExp1-mRNA-Gehaltes in Proben äquivalenter Konzentrationen von mRNA (Kap. 4.6).

Die extrahierten mRNA-Mengen waren recht heterogen über die verschiedenen Teile der Pflanze verteilt, blieben zeitlich gesehen jedoch relativ konstant (Abb. 7.39). Die festgestellte räumliche Heterogenität könnte auch aus unterschiedlichen Extraktions-Ausbeuten in unterschiedlichen Geweben resultieren. In der Basis fanden sich jedoch etwas höhere Konzentrationen als in der Spitze, in der Ader niedrigere als im Intercostalfeld, in Blättern mittlerer Blattpositionen traten höhere Konzentrationen auf als bei jüngeren oder älteren Blättern. Im Tagesgang wurden keine signifikanten Variationen der mRNA-Mengen festgestellt.

Im Hinblick auf ein adäquates Bezugssystem für die Quantifizierung der Expansin-Expression bedeutet dies, dass allenfalls beim Vergleich von Intercostalfeld- mit Blattader-Proben eine Quantifizierung der Expression relativ zur Probenmasse (anstatt relativ zur mRNA-Menge) eine andere Aussage liefern würde als unter Verwendung der üblichen Bezugsgröße 'mRNA-Menge'.



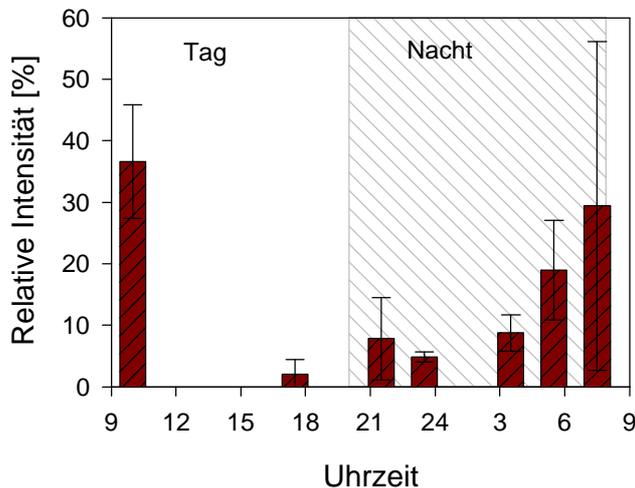
**Abb. 7.39 mRNA-Mengen in Expansinproben**

A: Proben von Ader und Intercostalfeld im Tagesgang, B: Proben von Spreiten verschiedener Blattstockwerke, C: Proben von Basis und Spitze (Blatt 17, andere Pflanzen, höheres Erntefrischgewicht).

Im weiteren wird nun unter Verwendung äquivalenter mRNA-Mengen als Bezugsgröße die Verteilung der Expansinexpression in räumlichen Bereichen und im Tagesgang dargestellt:

### 7.2.6.1 Tagesgang

Hier zeigt sich eine identische Verteilung wie bei den über das Blatt gemittelten Wuchsraten (Vergleiche Abb. 7.20). Die höchsten Werte werden am Ende der Nacht, bzw. am Anfang des Tages gefunden (Abb. 7.40). Dies läßt darauf schließen, dass der Tagesgang der zeitlichen Wuchsratenverteilung entscheidend durch die Expression von NtExp1 reguliert sein kann.

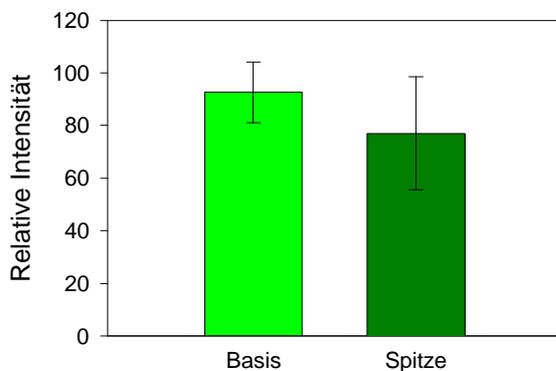


**Abb. 7.40 Tagesgang der Expressionsverteilung**

Drei oder vier Einzelwerte wurden zu jeder Uhrzeit ermittelt (jeweils Ader und Intercostalfeld-Proben zusammengenommen); die höchste Intensität der beiden gleichzeitig ausgewerteten Northern Blots wurde zu 100 % gesetzt.

### 7.2.6.2 Basis-Spitze

Bezüglich der Basis-Spitze-Verteilung ergibt sich kein signifikanter Unterschied der NtExp1-Expression (Abb. 7.41). Die Probenahme für dieses Experiment erfolgte zu einem Zeitpunkt hoher Wachstumsaktivität am Morgen, an dem üblicherweise starke Wachstumsgradienten ausgebildet sind. Auf dem Blatt können dabei durchaus Wachstumsunterschiede vergleichbarer Größenordnung zwischen den maximalen und minimalen Wuchsraten im Tagesgang auftreten.

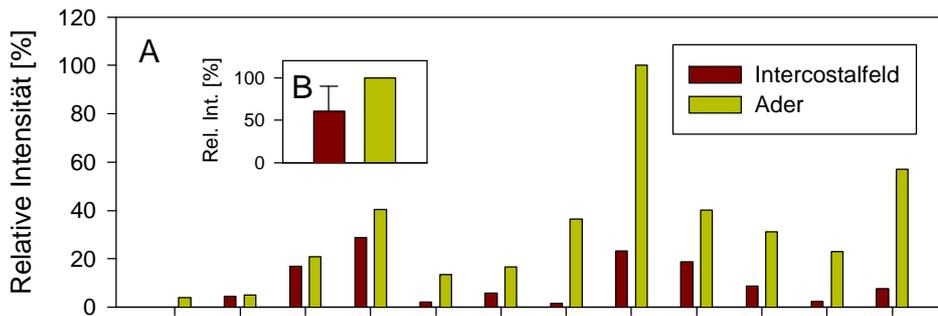


**Abb. 7.41 NtExp1-Expression in Basis und Spitze**

Proben aus Basis und Spitze von sechs Blättern wurden miteinander verglichen; die höhere der beiden Intensitäten wurde zu 100 % gesetzt.

### 7.2.6.3 Ader-Intercostalefeld

Ein deutlicher Unterschied ist dagegen bei der Verteilung der Expression zwischen Ader und Intercostalefeldern zu sehen: In der Ader treten wesentlich höhere Expressionen auf (Abb. 7.42). Im Mittel sind die Werte der Ader um einen Faktor zwei höher. Da die mRNA-Mengen im Adergewebe um etwa einen Faktor drei niedriger waren als in den Proben der Intercostalfelder, bedeutet dies, dass in Ader und Intercostalefeld vergleichbare Expressionsraten auftreten, wenn man diese auf das Frischgewicht der Proben beziehen würde.



**Abb. 7.42 NtExp1-Expression in Ader und Intercostalefeld**

A: Relative Intensität bezüglich der maximalen Einzelintensität in den Blots; 12 Probenpaare aus je einer Ader- und Intercostalefeldprobe sind aufgetragen.

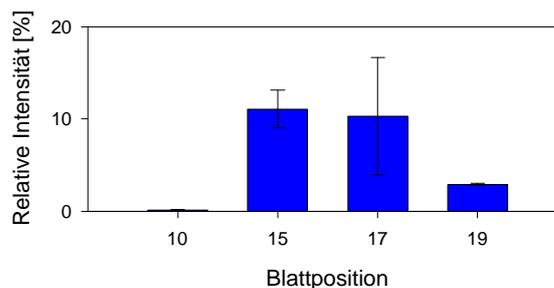
B: Relative Intensität bezüglich der jeweiligen Intensität der Ader-Probe der 12 Probenpaare

### 7.2.6.4 Unterschiedliche Blattstockwerke

Je fortgeschrittener der Entwicklungszustand eines noch wachsenden Blattes ist, desto mehr NtExp1 wird dort exprimiert. Erst nicht mehr wachsende Blätter zeigen keine Expression mehr (Abb. 7.43). Etwa von Position 11 oder 12 ab lagen in den untersuchten Pflanzen noch wachsende Blätter vor. Dies deutet darauf hin, dass Expansin vor allem in der späten Phase der Zellstreckung für das Wachstum von Bedeutung ist. Die Unterschiede in der NtExp1-Expression bei noch wachsenden Blättern sind jedoch – bei stark unterschiedlichen Wuchsraten des Blattmaterials der verwendeten Blätter verschiedener Positionen - bei weitem nicht so deutlich wie im Verlauf des Tagesganges.

**Abb. 7.43 NtExp1-Expression in verschiedenen Blattstockwerken**

Relative Intensität bezüglich maximaler Einzelintensität auf dem Blot.



## Überblick über die nachfolgenden Abschnitte

Nach der Darstellung von Blattwachstumsmustern unter Standardbedingungen erfolgt in den weiteren Abschnitten eine Untersuchung der Wachstumsreaktionen auf die Veränderung einzelner Parameter der Standardbedingungen hin. Begonnen wird dabei mit einem Parameter, der durch die speziellen Gegebenheiten des Versuchsaufbaus bedingt ist; mit dem Einfluss verschiedener Zugkräfte auf das Blattwachstum. Der Turgor stellt den nächsten untersuchten Parameter dar, da er ebenfalls Einfluss auf die Biomechanik bzw. das Kräftegleichgewicht innerhalb des wachsenden Blattes nimmt.

Anschliessend wird untersucht, wie sich eine Änderung der externen Parameter Temperatur, Wasser- und Nährstoffangebot auf das Blattwachstum auswirkt. Eine Variation des Parameters ‚Lichtverhältnisse‘ wird dann hinsichtlich dreier Aspekte betrachtet: Tageslänge, Lichtintensität und differentielle Variation der Lichtintensität durch einen veränderten Blattinklinationswinkel und damit der dem Licht exponierten Blattfläche.

Abschließend wird auf die Interaktion der beobachteten Wachstumsmuster eines Blattes durch andere Organe der Pflanze eingegangen. Auch hier sind es drei Aspekte, die untersucht werden: Die Interaktion mit anderen Blättern; die Interaktion mit der Wurzel sowie die Unterbindung der Interaktion eines Blattbereiches mit allen übrigen Pflanzenteilen: Das Wachstum isolierter Blattscheiben.

### 7.3 Einfluss von Zugkräften

Die im DISP-Aufbau untersuchten Blätter sind mechanischen Belastungen ausgesetzt, die natürlicherweise nicht vorkommen. Zwar treten auch unter natürlichen Bedingungen biomechanische Belastungen auf wie etwa Winddruck oder die Belastung durch Tiere oder Epiphyten, die zu einer Veränderung des Wachstumsverhaltens führen können (*Thigmomorphogenese*); jedoch kommt es nie zu einer Dehnung des Adergewebes, wie es im DISP-Versuchsaufbau der Fall ist. Die Untersuchung von Wachstumsmustern unter dem Einfluss verschiedener Zugkräfte ist daher eine Notwendigkeit im Hinblick auf die Aussagekraft der mit der DISP-Methode gewonnenen Ergebnisse.

Darüber hinaus kann die Untersuchung der Interaktion von Wachstumsmustern und Zugkräften als Methode angesehen werden, die Aussagen über die endogenen biomechanischen Verhältnisse in einer wachsenden Aderstruktur liefern kann.

#### Versuchsdesign

In mehreren Experimenten wurden verschiedene Aspekte der Beeinflussung von Blattwachstumsmustern bei *Rizinus* durch externe Zugkräfte untersucht. Beim ersten Experiment dieser Reihe wurde der Einfluss verschieden schwerer Anhängemassen (eine Masse von 1 g entspricht einer Zugkraft von 10 mN) auf die *Intensität des Wachstums* des gesamten Blattes untersucht. Dabei wurden die Mittelrippen ( $L_1$ ) mehrerer Blätter mit verschiedenen starken Zugkräften belastet und die mittlere Wachstumsrate nach zwei Tagen mit derjenigen von Kontrollblättern verglichen. Bei

diesem Experiment wurde auch eine Analyse der Inhaltsstoff-Verteilung durchgeführt. Das Experiment wurde an anderer Stelle bereits detailliert beschrieben (Kap. 7.2.5.4).

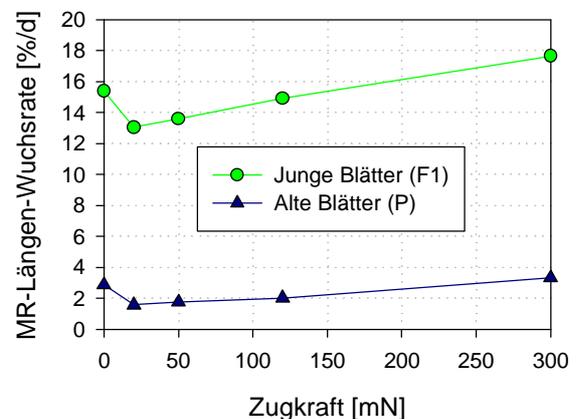
Ein zweites Experiment untersuchte die Beeinflussung des *Blattwachstums-Tagesganges*. Hier standen vier Kontrollblätter zur Verfügung, deren Zuwachs in Intervallen von vier Stunden mit der Faden-Methode vermessen wurde. Gleichzeitig fand die DISP-Aufnahme eines mit 2 g pro Blattlappen abgespannten Blattes von vergleichbarem Entwicklungszustand statt. Eine Anhängemasse von 2 g wurde gewählt, da dies die in Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit üblicherweise verwendete Anhängemasse war. Mit den Ergebnissen dieses Versuches werden die Messresultate mehrerer DISP-Aufnahmen von Blättern verglichen, die mit 12 g pro Blattlappen abgespannt waren.

Schliesslich wurde noch der Einfluss der Zugkraft auf die *Ausprägung des Basis-Spitze-Gradienten* untersucht. Dabei wurde der Basis-Spitze-Gradient von sieben Kontrollblättern mit demjenigen von vier Blättern verglichen, die in Blatthalterungen des DISP-Aufbaus eingespannt waren. Drei der Blätter waren an jedem Blattlappen mit 12 g abgespannt; ein Blatt mit 30 g je Blattlappen. Die Blätter befanden sich bei Experimentbeginn in vergleichbaren Entwicklungszuständen.

### 7.3.1 Wachstum

#### Wachstumsintensität

Bei zeitlicher Integration über 52 h hinweg ergibt sich eine positive Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Zugkraft und der Längen-Wuchsrate eines Blattlappens (Abb. 7.44). Hierbei werden für zwei untersuchte Entwicklungsstadien von Blättern identische Ergebnisse erhalten: Je höher die Zugkraft ist, desto höher ist die Längen-Wuchsrate der untersuchten Blattlappen. Die Wuchsrate der Kontrollen ist jedoch deutlich höher als die Wuchsrate von Blättern, die mit 20 mN belastet werden. Die Wuchsrate der Kontrollen wird durch eine Zugkraft von etwa 120 mN erreicht.



**Abb. 7.44 MR-Längen-Wuchsraten von Rizinusblättern bei unterschiedlichen Zugkräften**  
Dargestellt: Mittelwerte von je sechs Blättern, die zu Versuchsbeginn vergleichbar mit Kontrollen wuchsen.

Blätter, die unter dem Einfluss einer geringen Zugkraft standen, weisen eine etwas aufgewellte Oberfläche auf; Blätter, die mit 120 oder 300 mN behandelt wurden, zeigen eine ähnlich ebene Oberfläche wie die Kontrollblätter (Abb. 7.45). Dies weist auf eine stärkere Wachstumsretardation der Mittelrippe als des Intercostalbereiches hin.

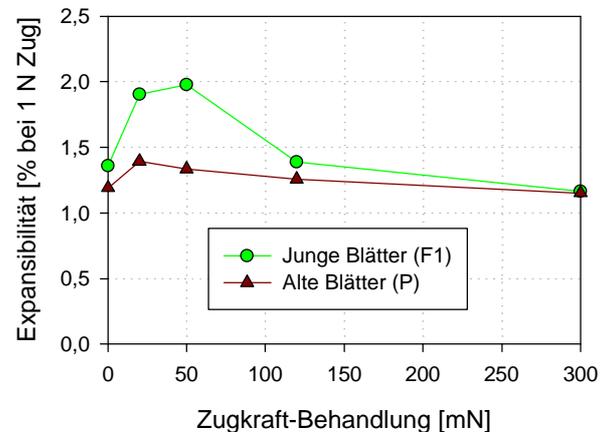


**Abb. 7.45 Junge Rizinusblätter (F1) nach 52 h mit unterschiedlicher Zugbelastung**

Links: Kontrolle (0 mN), Mitte: 20 mN Zugbelastung nach vorne und hinten, rechts: 300 mN. Im mittleren Bild sind leichte Aufwellungen der Intercostalbereiche sowie eine Verdrehung des mittleren Blattlappens um die Rippe herum zu erkennen. Rechts und links: ebene Oberflächen.

## Expansibilität

Auch die Expansibilität der Rippe (Dehnung bei 1 N) zeigt bei Anlegen verschiedener Zugkräfte eine Dosis-Wirkungsbeziehung, deren Funktion bei einer vorherigen Behandlung mit Zugkräften von etwa 120 mN den Wert der Kontrollblätter erreicht (Abb. 7.46). Bei geringeren zuvor angelegten Zugkräften tritt in beiden untersuchten Blattstockwerken eine höhere Expansibilität als in den Kontrollblättern auf. Das bedeutet, dass diese Blätter leichter zu dehnen sind, als die Kontrollblätter. Die gemessene Expansibilität stellt ausschliesslich eine Eigenschaft der Mittelrippe dar; die Intercostalbereiche dehnen sich wesentlich leichter und reissen bei Zugkräften von 0,2 bis 0,8 N in einem etwa 10 % gegenüber der Ausgangslänge gedehnten Zustand ab (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 7.46 Expansibilität von Rizinusblättern**

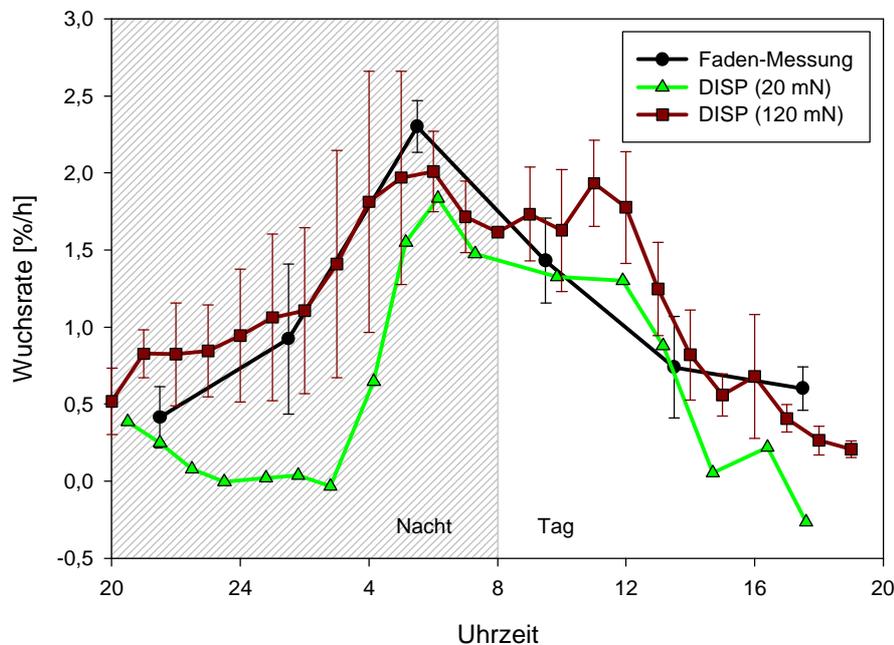
Die Kombination beider Ergebnisse – der Wachstumsretardation sowie der Expansibilitätssteigerung der Mittelrippe – legt die Vermutung nahe, dass bei Fixierung des Blattes in die Horizontale ein wachstumsretardierender Effekt eintritt, dessen Grund die unvollständige Ausschöpfung des Wachstumspotentials der Mittelrippe ist. Bei Anlegen kleiner Zugkräfte wächst diese nicht im normalen Ausmass zu, lässt sich aber leichter dehnen als üblich. Bei Belastung mit Zugkräften von etwa 120 mN werden dagegen die normalen Verhältnisse erreicht. Zwei denkbare Gründe für die nicht vollständige Ausschöpfung des Wachstumspotentials der Blattader bei horizontaler Fixierung und Anlegen zu geringer Zugkräfte sind:

- a) der **Turgor** ist in diesem Fall niedriger als gewöhnlich und kann nicht im normalen Umfang für eine Expansion der Zellwandstrukturen sorgen
- b) die **Synchronisation der Wachstumsaktivität** innerhalb der Rippe ist gestört, sodass zwar jede einzelne Zelle eigentlich wie normal zuwachsen könnte, im Gewebeverband aber von der eingeschränkten Bewegungsfreiheit der Gesamtstruktur gehemmt wird.

### Tagesgang des Wachstums

Bei Anlegen einer Zugkraft von 20 mN erfolgt die Wachstumsretardierung nicht gleichmäßig über den gesamten Tag verteilt, sondern es gibt eine bestimmte Wachstumsphase, während der die Wachstumsaktivität besonders stark eingeschränkt ist: In der Mitte der Nacht treten erheblich niedrigere Wuchsraten auf als in den Kontrollblättern und in den mit 120 mN pro Blattlappen gestreckten Blättern (Abb. 7.47). Die zeitliche Wuchsratenverteilung von Kontrollen und den mit 120 mN gestreckten Blättern stimmt dagegen recht gut überein. Dies legt den Schluss nahe, dass bei Verwendung von 12 g schweren Anhängmassen so natürliche Wachstumsverteilungen als möglich mit der DISP-Methode gemessen werden.

Der Zeitpunkt der Wachstumsretardierung der mit Anhängmassen von 2 g gestreckten Blätter fällt mit dem Zeitpunkt maximaler Blattauslenkung aus der Stellung bei Tag zusammen. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Verhindern der Krümmung der Blattmittelrippe im Zuge der nyctinastischen Bewegungen zu der beobachteten Reduktion der Wachstumsaktivität führt. Treibt man diesen Gedanken noch einen letzten Schritt weiter und verbindet ihn mit der möglicherweise durch Desynchronisation der Wachstumsaktivität in der Mittelrippe zustande



**Abb. 7.47 Tagesgang von Ricinusblättern bei Anlegen unterschiedlicher Zugkräfte bzw. -massen**

Die Kontrollwerte der Faden-Messung stellen Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 Pflanzen dar; den DISP (120 mN) – Werten liegen drei vergleichbare Messungen zugrunde; DISP (20 mN) stellt eine Einzelmessung dar, die jedoch mehrfach in dieser Form repliziert werden konnte.

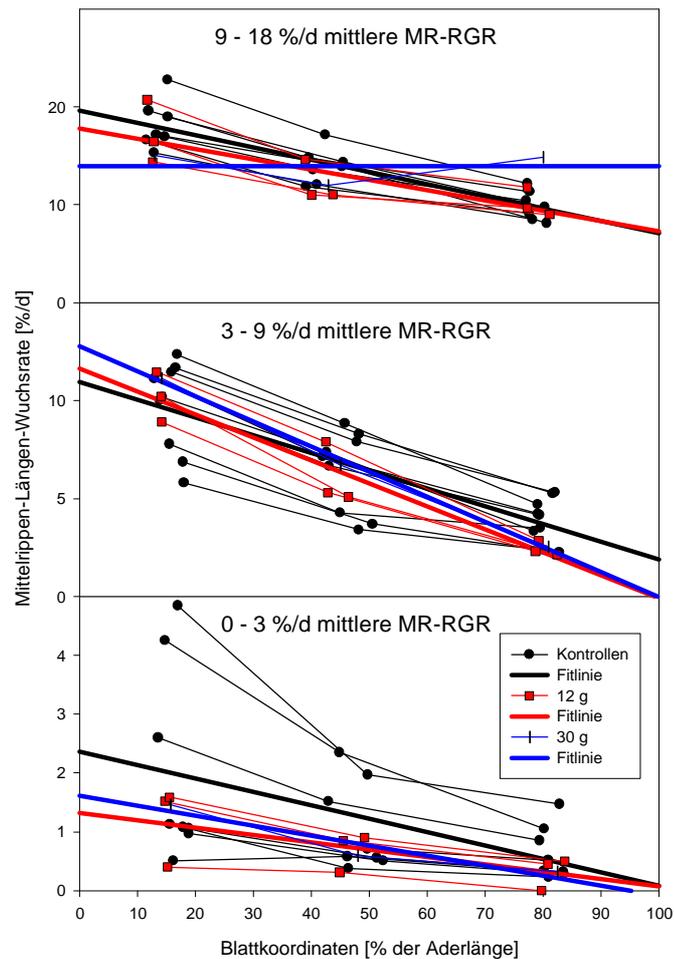
gekommenen unvollständigen Ausschöpfung des Wachstumspotentials, so könnte man zu folgendem Schluss kommen:

*Die während der Nyctinastien ablaufende Krümmungsbewegung der Mittelrippe dient unter natürlichen Wachstumsbedingungen dazu, das Wachstum von Zellen auf verschiedenen Seiten der Mittelrippe zu synchronisieren. Unterbindet man diesen Synchronisationsmechanismus, so wird das Wachstumspotential der Mittelrippe nicht voll ausgeschöpft; es sei denn, man sorgt durch Anlegen einer adäquaten externen Zugkraft für einen kompensatorischen Effekt, der die natürlichen Wachstumsverhältnisse re-etabliert.*

### Räumlicher Gradient der Wuchsratenverteilung

Auch bezüglich des räumlichen Gradienten unterscheiden sich die mit externen Zugkräften von 120 mN belasteten Blätter in keinem der untersuchten Entwicklungszustände von den Kontrollen (Abb. 7.48). Daraus folgt, dass die mit der DISP-Methode untersuchten Wachstumsmuster so gut als möglich den natürlicherweise auftretenden entsprechen. Bei Anlegen von 300 mN wird in einem jungen Blatt eine erhöhte Wuchsrate an der Blattspitze festgestellt; in den beiden älteren betrachteten Entwicklungszuständen ist dagegen kein Unterschied zu den übrigen Blättern zu beobachten. Dieser Effekt könnte dadurch zu erklären sein, dass dünne Aderabschnitte besonders stark von hohen Zugkräften

gedehnt werden (die Ader ist an der Spitze wesentlich dünner als an der Basis und wird im Verlauf ihrer Entwicklung über die gesamte Länge hinweg stärker).



**Abb. 7.48 Räumlicher RGR-Gradient entlang der Rizinus-Mittelrippe bei unterschiedlichen Anhängemassen**

Dargestellt sind Blätter verschiedener Entwicklungsstadien

### 7.3.2 Inhaltsstoffverteilungen

Untersucht wurden hierbei - in der Mitte der Nacht und am Anfang des Tages - die bereits in Tab. 7.5 genannten Kohlenhydrate, Kationen sowie Aminosäuren in jungen und alten Blättern, die den verschiedenen Zugbelastungen ausgesetzt waren (je 3 Replikate). Die behandelten Blätter unterscheiden sich dabei lediglich in einem Fall signifikant von den Werten der Kontrollen; in allen anderen Fällen (verschiedene Substanzen zu verschiedenen Zeitpunkten in verschiedenen Blattstockwerken) werden im Rahmen der Standardabweichung keine Abweichungen der Konzentrationen der Zug-belasteten Blätter gegenüber den Kontrollen gefunden.

Der Stärkegehalt der älteren Blätter zeigt als einziger Parameter eine Korrelation mit den angelegten Zugkräften (Abb. 7.49): Zu Beginn des Tages wird ein um so höherer Stärkegehalt gefunden, je höher die Anhängemasse ist. In der Nacht ist dagegen kein Unterschied festzustellen. Die untersuchten jüngeren Blätter zeigen zu keinem der beiden Zeitpunkte eine Beeinflussung des Stärkegehaltes durch die angelegte Zugkraft.

Das beobachtete Muster der Stärkeverteilung legt es nahe, dass bei Anlegen einer Zugkraft an Blätter, die bereits als Kohlenhydrat-Source für die Gesamtpflanze fungieren, ein geringerer Tagesgang der Stärkeverteilung, bzw. eine geringere Remobilisation aus dem Stärkepool in den letzten Stunden der Nacht auftritt. Zu diesem Zeitpunkt (maximale Wachstumsaktivität) besteht im Blattgewebe ein erhöhter Bedarf an allen Substanzen, die der Vergrößerung zellulärer Strukturen dienen, also auch an Glucose. Falls Glucose nicht nur zum Aufbau der Zellwand, sondern auch als Energielieferant für den Energie verbrauchenden Expansionsprozess der Zellwand benötigt wird, könnte es sein, dass in diesem Fall ein Teil der Energie durch die mechanische Energie, die das Gewebe dehnt, kompensiert wird (siehe auch Kap. 10).

Eine Untersuchung der zeitlichen Variationen von Stärke über mehrere Behandlungstage könnte interessante Aufschlüsse über die Interaktion von Zugbeeinflussung und Stärke geben.

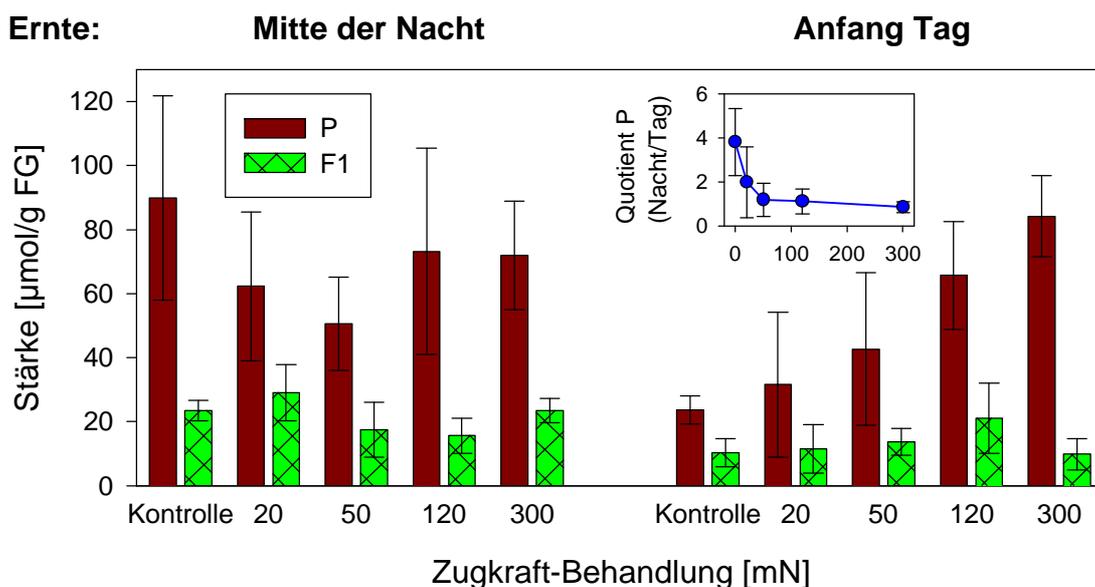


Abb. 7.49 Stärkegehalte in Rizinusblättern (P, F1) der Zugkraft-Experimente zu 2 verschiedenen Zeitpunkten

## 7.4 Einfluss einer Turgorvariation

Neben der Zellwand bzw. der Zellwanddehnbarkeit ist der Turgor des pflanzlichen Gewebes die zweite für den Wachstumsprozess bestimmende physikalische Größe (Lockhart 1965). Da in der AG Schurr Aufbauten zur Verfügung stehen, mit deren Hilfe der an der Wurzel anliegende Druck und damit über das vermittelnde Xylem der Turgor der Pflanze variiert werden kann, lag es nahe, den Effekt der Variation dieses Parameters auf das Blattwachstum zu untersuchen.

Bei Druckerhöhung im Xylem wird eine kurzfristige Steigerung der Wachsrates mit einer ähnlichen zeitlichen Dynamik wie am Tag-Nacht-Übergang beobachtet (Abb. 7.50). Damit konnten Ergebnisse von Schmudt et al (1998) bestätigt werden.

Im durchgeführten Experiment trat unmittelbar nach einer Drucksteigerung von 3,2 auf 3,6 bar ein transientser Peak mit einer Abklingzeit von etwa 15 min auf. Konstant unter erhöhtem Wurzeldruck stehende Rizinuspflanzen zeigten keine signifikant erhöhte oder erniedrigte Wachsrates (Daten nicht gezeigt). Sie stellten jedoch in manchen Fällen nach Erhöhung des Turgors das Wachstum ein.

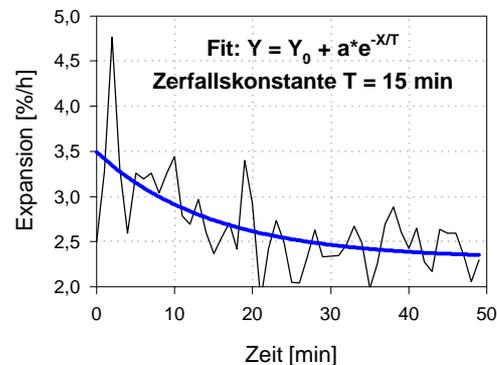


Abb. 7.50 Rizinusblatt-Expansion nach Turgorerhöhung von 3,2 auf 3,6 bar

## 7.5 Einfluss veränderter Temperaturverhältnisse

Die unter Standardbedingungen gewählte konstante Temperatur entspricht nicht den im Freiland üblichen Temperaturverhältnissen, die von starken Differenzen zwischen den Temperaturen bei Tag und Nacht geprägt sind. Um den Einfluss der Temperaturverhältnisse auf die Ausprägung des Wachstums-Tagesganges zu untersuchen wurde eine Reihe von Experimenten unter verschiedenen Anzuchtbedingungen durchgeführt.

## Versuchsdesign

In einem *Freiland-Experiment* mit 45 Rizinuspflanzen wurde der Wachstumstagesgang unter natürlichen Bedingungen untersucht. Da die Pflanzen dort aufgrund der schwankenden Lichtverhältnisse einer DISP-Vermessung nicht zugänglich sind (starker Wechsel der Grauwerte des Bildes), wurde der Wachstumstagesgang mit Hilfe einer Linealvermessung analysiert.

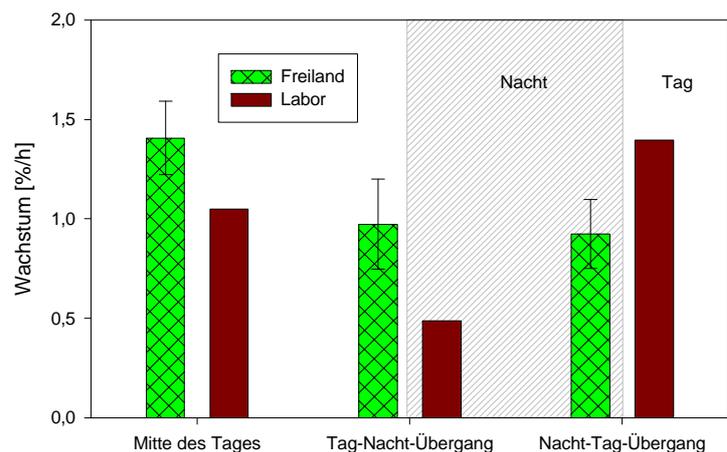
In einem zweiten Experiment wurde in der *Plexikammer* sowohl für Rizinus als auch für Tabak der Tagesgang des Wachstums bei Temperaturbedingungen untersucht, die denjenigen im *Freiland* ähnlich waren. Die Klimatisierung der Plexikammer wurde dabei tagsüber abgeschaltet, sodass die Temperatur bis auf 30 °C ansteigen konnte; während der Dunkelphase wurde die Temperaturregelung auf 15 °C einjustiert. Luftfeuchte und Lichtverhältnisse entsprachen Standardbedingungen.

Aufgrund der Ergebnisse dieser beiden Versuche wurde ein drittes Experiment *mit differentieller Temperierung in der Plexikammer* durchgeführt. Bei diesem wurden die *Wurzeln* auf einer *konstanten Temperatur* von 18 °C gehalten; die *Sprosse* wurden einem *Temperaturwechsel* von 30 °C bei Tag / 18 °C bei Nacht unterworfen. Da bei diesem Experiment im hydroponischen Durchfluss-Rhizotron gearbeitet werden musste, konnten ausschliesslich Tabakpflanzen verwendet werden.

In einem *Vorversuch* zu diesem Experiment wurde geklärt, ob die absolute Wachsrate der Wurzeln auch bei Tabak a) unter konstanten Temperaturverhältnissen keinen Tagesgang aufweist und b) auf Temperaturänderungen reagiert.

## Wachstum im Freiland

Die Phase stärkster Wachstumsaktivität liegt hier in der Mitte des Tages (Abb. 7.51). Im Vergleich zum Wachstums-Tagesgang unter (Labor-)Standardbedingungen ist die Amplitude geringer ausgeprägt. Während der Freilandmessung traten Temperaturdifferenzen von 20 °C auf (Tag: 30 °C; Nacht 10 °C). Die zeitliche Dynamik des Blattwachstums im Freiland wurde mittlerweile auch mit Hilfe der Faden-Methode in höherer Auflösung bestätigt (Resultate eines Praktikums-Experimentes).



**Abb. 7.51 Rizinus-Blattwachstum in Freiland und Labor**

Im Freiland wurden 45 F2-Blätter mit dem Lineal in Abständen von 8 h vermessen; zum Vergleich wurden die entsprechend gemittelten DISP-Werte einer Laborpflanze aufgetragen.

### Wachstum bei Tag/Nacht-Wechseltemperaturen

Sowohl für Rizinus als auch für Tabak entsprechen die mit der DISP-Methode gemessenen Wachstumstagesgänge denjenigen unter Standardbedingungen (Abb. 7.52). Trotz starker Erhöhung der Temperatur in der Plexikammer während des Tages wird hier kein aussergewöhnlicher Peak der Wachstumsaktivität gefunden. Das Maximum befindet sich für beide Arten nach wie vor am Nacht-Tag-Übergang.

Das bei diesem Versuch an den pflanzlichen Wachstumszonen auftretende Temperaturregime hatte allerdings wenig mit den natürlichen Verhältnissen gemein: Bei Pflanzenanzucht in Töpfen ändert sich die Temperatur im Wurzelbereich – wenn auch etwas gedämpft – parallel zur Temperatur des Sprosses, da die Wärmekapazität des Topfes sehr gering ist. Unter Freilandbedingungen bleibt die Temperatur der Erde dagegen wesentlich konstanter; nur die obersten Zentimeter kühlen etwas aus.

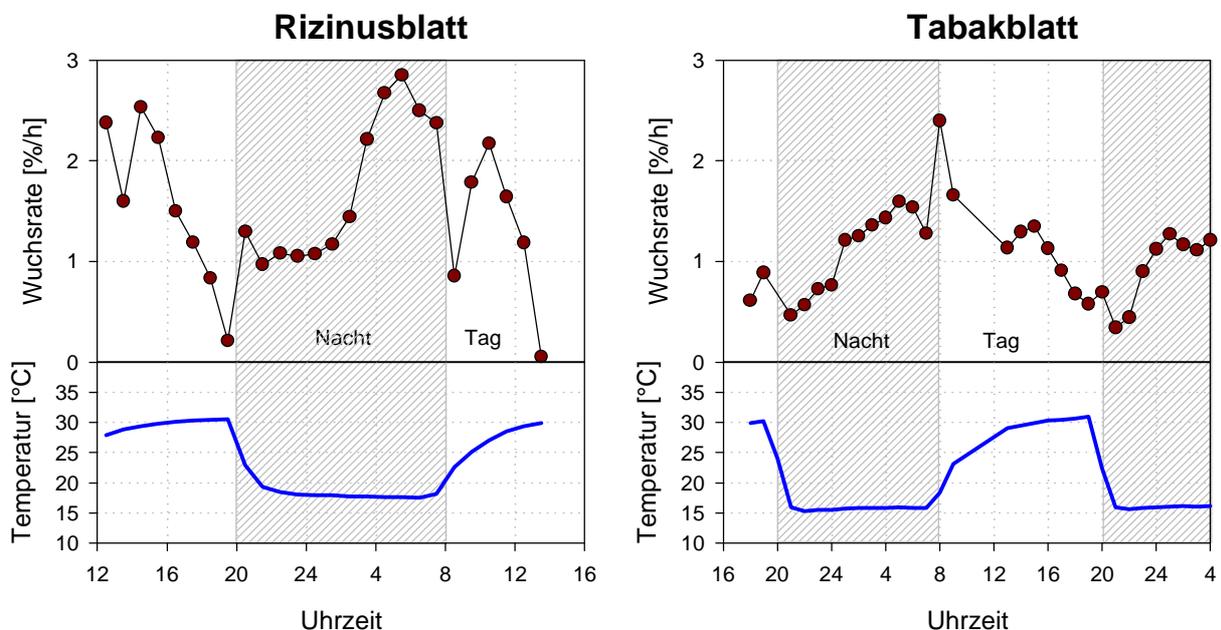


Abb. 7.52 RGR-Tagesgang je eines Rizinus- und Tabakblattes bei wechselnder Tag-Nacht-Temperatur

### Wachstum bei konstanter Temperierung von Spross und Wurzel

Auch in Tabak tritt bei konstanter Temperierung der Wurzel kein Tagesgang der Geschwindigkeit der Wurzelspitze auf (Abb. 7.53). Eine gleichzeitige Messung des Blattwachstumstagesganges zeigt auch unter den Kultivierungsbedingungen im Durchfluss-Rhizotron die übliche Charakteristik. Bei Abkühlungs-Experimenten, während denen der im Rhizotron befindlichen Nährlösung Eis zugegeben wurde, konnte für Tabak (Daten nicht gezeigt) eine ähnlich rasche Reaktion der absoluten Wuchsrate der Wurzel beobachtet werden wie für Mais (Kap. 6.4).

### Wachstum bei differentieller Temperierung von Spross und Wurzel

Bei konstanter Temperatur (18 °C) an der Wurzel und einer Temperierung von 30 °C bei Tag / 18 °C bei Nacht am Spross wird für den Tagesgang des Blattwachstums tatsächlich auch unter Laborbedingungen ein absolutes Wachstumsmaximum in der Mitte der Tag-Phase erhalten (Abb. 7.54). Diese Temperaturbedingungen entsprechen dem im Freiland vorhandenen Temperaturregime am besten. Das Ergebnis zeigt, dass die Interaktion mit der Wachstumsaktivität der Wurzel von großer Bedeutung für die zeitliche Variation des Blattwachstums sein könnte.

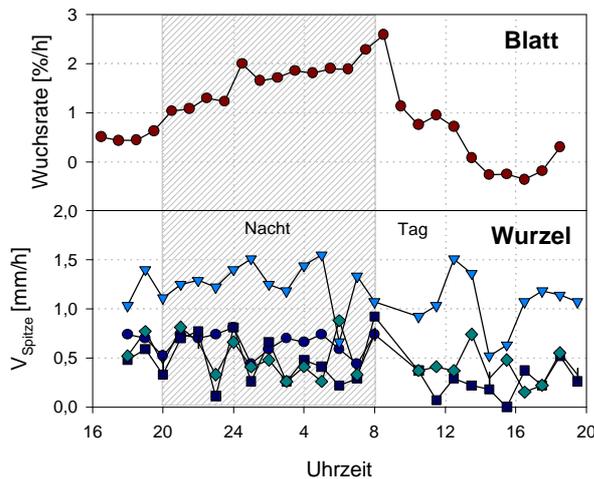


Abb. 7.53: Wachstums-Tagesgänge von 4 Wurzeln und einem Blatt einer Tabakpflanze ( $T=\text{const.}$ )

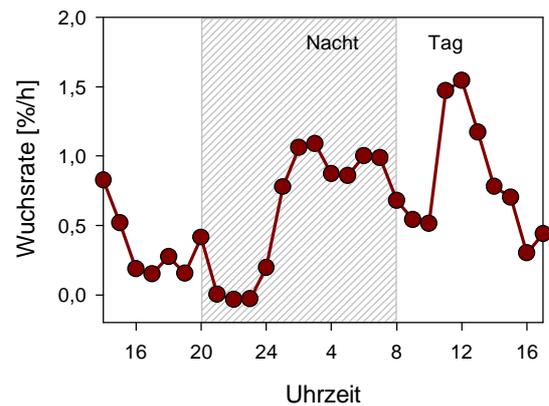


Abb. 7.54 Tabak-Blattwachstum bei konstanter Wurzel-Temperatur und tageszeitlich variierter Blatt-Temperatur

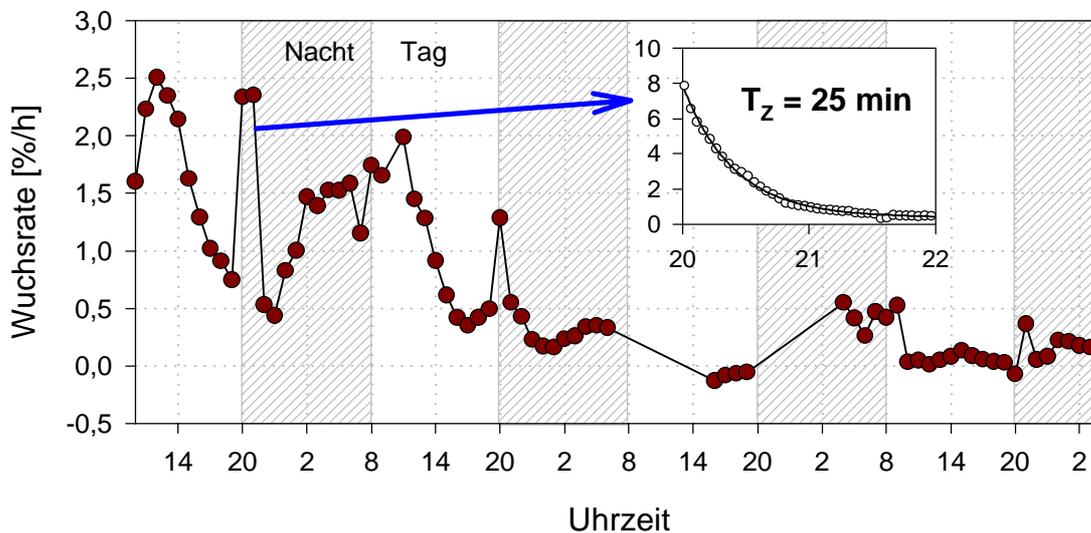
## 7.6 Einfluss von Trockenstress

Die Auswirkungen von Trockenstress auf pflanzliches Wachstum sind seit langem Gegenstand vieler Untersuchungen (Larcher 1994). Es wäre denkbar, dass sich der Tagesgang der Wachstumsverteilung unter Wassermangel-Bedingungen verändert. Um dies zu untersuchen, wurde im Rahmen eines Erdanzucht-Experimentes von Rizinus ein Austrocknungsversuch durchgeführt. Dabei wurde der Pflanze vier Tage vor dem Start einer DISP-Messung (unter Standardbedingungen) letztmals Wasser gegeben. Zu Beginn der Aufnahme fühlte sich die Topferde bereits trocken an; die Wachstumsrate des untersuchten Blattes bewegte sich aber noch im üblichen Rahmen.

Wachstum verlangsamt sich bei Wassermangel etwa um einen Faktor zwei gegenüber den üblichen Verhältnissen. Der Tagesrhythmus wird aber beibehalten (Abb. 7.55). Die Oszillation der Wachstumsraten-Zeitreihe wird durch den Trockenstress nur gedämpft und nicht etwa an einem bestimmten Punkt abgeschnitten oder in ihrer Phase verschoben. Die Abklingzeit des transienten Peaks am Tag-Nacht-Übergang ist jedoch mit 25 min fast doppelt so lang wie bei Experimenten unter ausreichend feuchten Bedingungen.

Die zeitliche Wachstumsreaktion der Pflanze auf den Stressfaktor ‚Trockenheit‘ scheint sich also auf drei unterschiedlichen Skalen abzuspielen: Betrachtet man einen Zeitraum von mehreren Tagen unter Vernachlässigung von tageszeitlichen Wachstumsvariationen, so zeigt sich eine

deutliche Reaktion: Die Wachstumsaktivität eines bestimmten Blattes wird rascher als entwicklungsbedingt eingestellt. Betrachtet man in der nächsthöheren Stufe zeitlicher Auflösung die tageszeitliche Variation des Wachstums, so zeigt sich keine Reaktion der Pflanze; die tageszeitliche Verteilung entspricht den Verhältnissen unter Standardbedingungen. Auf der dritten und feinsten Stufe zeitlicher Auflösung scheint sich dagegen wieder eine Reaktion zu zeigen: Störungen des Wachstums-Gleichgewichtszustandes (z.B. durch einen abrupten Lichtwechsel) können weniger schnell als üblich abgepuffert werden. Dies zeigt, dass Mechanismen höchst unterschiedlicher Kinetiken an der Regulation der Wachstumsantwort auf Trockenstress beteiligt sein müssen, dass aber die Regulation des Wachstums-Tagesganges von Trockenstress weitgehend unabhängig abläuft. Dies bestätigt eine Serie von früheren Untersuchungen (Heckenberger et al. 1998, Schurr et al. 2000) in denen bereits gezeigt wurde, dass die Reaktion des Blattwachstums auf Trockenstress einer beschleunigten Blattentwicklung entspricht.



**Abb. 7.55** Wachstumstagesgang bei Austrocknung einer Rizinuspflanze

Die Wachstumsrate sinkt im Mittel um einen Faktor 2 schneller ab als üblich. Die Tagesgangcharakteristika bleiben gegenüber den ungestressten Verhältnissen erhalten. Inset: Die Abklingzeit der transienten Tag-Nacht-Wachstumspeaks ist etwas länger als bei ungestressten Pflanzen.

## 7.7 Einfluss eines veränderten Nährstoffangebotes

Der Zusammenhang zwischen Wachstumsmustern und dem Nährstoffstatus einer Pflanze war Thema einer vorangegangenen Studie (Walter und Schurr 1999). Ein zentrales Resultat war die Konstanz der *räumlichen Verteilung* von Wachstum (gemessen in Tagesabständen) innerhalb verschiedener Bereiche der pflanzlichen Blattfläche bei unterschiedlichem Nährstoffangebot.

Eine erste Untersuchung der *Beeinflussung des Tagesganges durch das Nährstoffangebot* war daher vorrangiges Ziel der Experimente dieses Themenkreises in der vorliegenden Arbeit. Um einen raschen Wechsel der Nährstoff-Verfügbarkeit durchführen zu können, wurde die Anzucht von Tabak in hydroponischer Kultur im Rahmen dieser Untersuchungen etabliert.

## Versuchsdesign

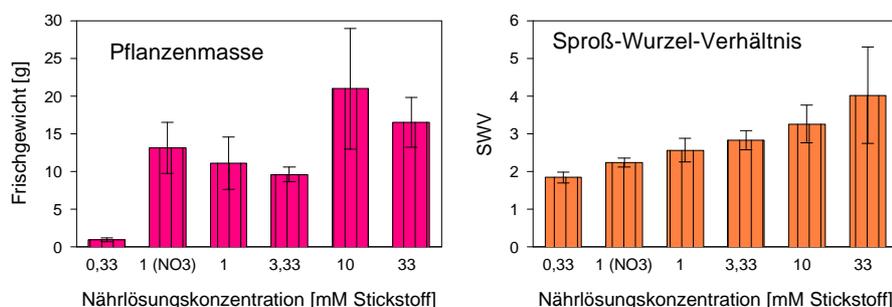
Ein erster Versuch diente der *Etablierung der Anzucht von Tabak in hydroponischer Kultur*. Dabei wurden 6 Populationen von je 20 Pflanzen kultiviert, die unter Standardbedingungen bei *unterschiedlicher Konzentration der Ingestad-Nährlösung* kultiviert wurden. Dabei wurden Ingestad-Nährlösungen mit Stickstoffgehalten von 0,33; 1; 3,3; 10 und 33 mM verwendet, sowie eine modifizierte Ingestad-Nährlösung, in der Ammoniumnitrat durch Kaliumnitrat ersetzt wurde, so dass den Pflanzen kein externes Ammonium zur Verfügung stand (Konzentration 1mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Die Populationen wurden nach und nach auf vier Pflanzen reduziert; am Ende des Experimentes waren die Pflanzen zwei Wochen bei jeweils konstanter Nährlösungskonzentration kultiviert worden; bei der abschliessenden Ernte wurden die Frischgewichte sowie die Spross-Wurzel-Verhältnisse bezüglich der Frischgewichte (SWV) bestimmt.

In einem zweiten Versuch wurde der *Tagesgang des Wachstums* von Pflanzen in *ammoniumfreier* Nährlösung (10 mM N) mit demjenigen von *ammoniumhaltiger* Nährlösung (10 mM N) unter Standardbedingungen verglichen.

Schliesslich fand noch ein Versuch zum Tagesgang des Blattwachstums in einer *Nährstoffmangelsituation mit anschliessender Erhöhung der Nährstoff-Verfügbarkeit* statt. Dabei wurde eine Pflanze in 10 mM Ingestad-Lösung unter Standardbedingungen angezogen und die von der Pflanze verbrauchte Nährlösung lediglich durch Wasser ersetzt. Nach weitgehendem, aber nicht vollständigem Abklingen der Wachstumsaktivität im untersuchten Blatt bei einem Stickstoffgehalt von deutlich unter 1 mM in der Nährlösung wurden der hydroponischen Lösung wieder Nährstoffe beigemischt (Konzentration der Nährlösung wieder 10 mM N) und die Wachstumsreaktion des Blattes vermessen.

## Wachstum von Tabakpflanzen bei unterschiedlichem, aber zeitlich konstantem Nährstoffangebot

Durch die Nährstoffkonzentration wird sowohl die Verteilung von Wachstum zwischen Wurzel und Spross als auch die Wachstumsintensität der Gesamtpflanze beeinflusst (Abb. 7.56). Bei konstanten Stickstoffkonzentrationen von über 1 mM ergibt sich jedoch keine signifikante Steigerung der Wachstumsintensität mehr. Es kann daher für nachfolgende Versuche davon ausgegangen werden, dass Stickstoffkonzentrationen von 1 bis 33 mM in hydroponischer Nährlösung



**Abb. 7.56 Frischgewicht und Spross-Wurzelverhältnis von Tabak in verschiedenen Nährlösungen**

Die Pflanzen wurden beim Einsetzen in die jeweiligen Hydrokulturgefäße hinsichtlich des Frischgewichts gleichmäßig verteilt und anschließend für 14 Tage in unterschiedlich konzentrierten Nährlösungen kultiviert. 1 (NO<sub>3</sub>) steht für eine Population von Pflanzen, die in Ammonium-freier Nährlösung kultiviert wurde.

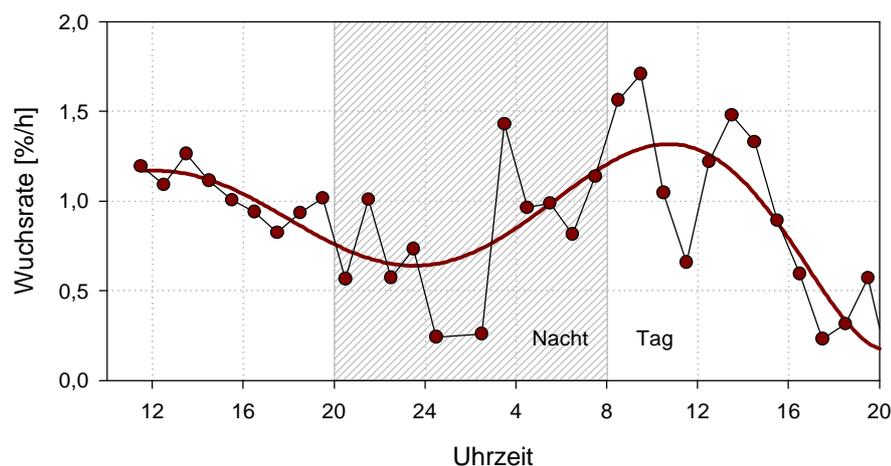
weder zu einer Wachstums-Beeinträchtigung durch Nährstoffmangel noch zu einer Schädigung der Pflanzen in Folge zu hoher Salinität der Nährlösung führen.

Die Pflanzen in ammoniumfreier Nährlösung erreichen dieselbe Größe wie Pflanzen in ammoniumhaltiger Nährlösung (bei vergleichbarer Stickstoffkonzentration). Das bedeutet, dass die Intensität des Wachstums der Gesamtpflanze nicht von der angebotenen externen Stickstoffquelle abhängt.

### Tagesgang des Wachstums in ammoniumfreier Nährlösung

In der Bodenlösung von Erdanzuchtpflanzen sowie in der nicht modifizierten Ingestad-Nährlösung liegt etwa ein Drittel des angebotenen Stickstoffs als Ammonium vor (Marschner 1995). Die Nährstoffsituation der Pflanzen in Erdanzucht und in Hydrokultur unter Verwendung von Ingestad-Nährlösung ist daher weitgehend vergleichbar. Der Tagesgang des Blattwachstums von Tabak in Ingestad-Nährlösung ist – im Rahmen der üblichen Variabilität – ebenfalls vergleichbar mit demjenigen von Tabak in Erdanzucht (Daten nicht gezeigt; drei Replikate).

Stellt man der Pflanze allen Stickstoff ausschliesslich in Form von Nitrat bereit, so ergibt sich teilweise ein etwas unstabilerer Tagesgang der Blattwachstumsverteilung (Abb. 7.57), was jedoch statistisch nicht signifikant belegt werden kann (drei Replikate). Das Maximum und Minimum der Wachstumsverteilung tritt zu den gleichen Zeitpunkten auf, zu denen auch in Pflanzen aus ammoniumhaltiger Nährlösungskultur Extremwerte der Wachstumsaktivität festgestellt werden können. Die Form der Stickstoff-Ernährung scheint sich also auf die Ausprägung des Tagesganges nicht auszuwirken. Eine solche Beeinflussung wäre durchaus denkbar gewesen; z.B. aufgrund der tagesrhythmischen Regulation von Nitratreduktase – dem Schlüsselenzym der Pflanzen-internen Konversion von Nitrat zu Ammonium (Matt et al. 1998).



**Abb. 7.57 Tagesgang des Blattwachstums von Tabak in Ammonium-freier, hydroponischer Anzucht**  
Dargestellt sind Werte einer Einzelpflanze; die Stickstoffkonzentration (Nitrat) betrug 10 mM.

### Blattwachstum bei dynamischer Veränderung der Nährstoff-Verfügbarkeit

Eine sprunghafte Veränderung der Nährstoff-Verfügbarkeit verändert den Tagesgang der Blattwachstums-Intensität hingegen deutlich (Abb. 7.58): Das Blatt der untersuchten Pflanze zeigt bereits kurze Zeit nach Addition von Nährstoffen eine ansteigende Wachstumsrate. Da die Nährstoffzugabe am Ende der Nacht erfolgte, resultierte ein Anstieg des Wachstums während der gesamten Lichtphase. Während der darauffolgenden Nacht sank die Wachstumsrate wieder ab.

Dies zeigt, dass eine spontane Änderung des Nährstoffstatus den Tagesgang des Wachstums massiv beeinflussen kann. Der Effekt ist aber stark vom Zeitpunkt der Zugabe im Tagesrhythmus abhängig und wird stets auch vom endogenen Rhythmus des Blattwachstums überlagert sein.

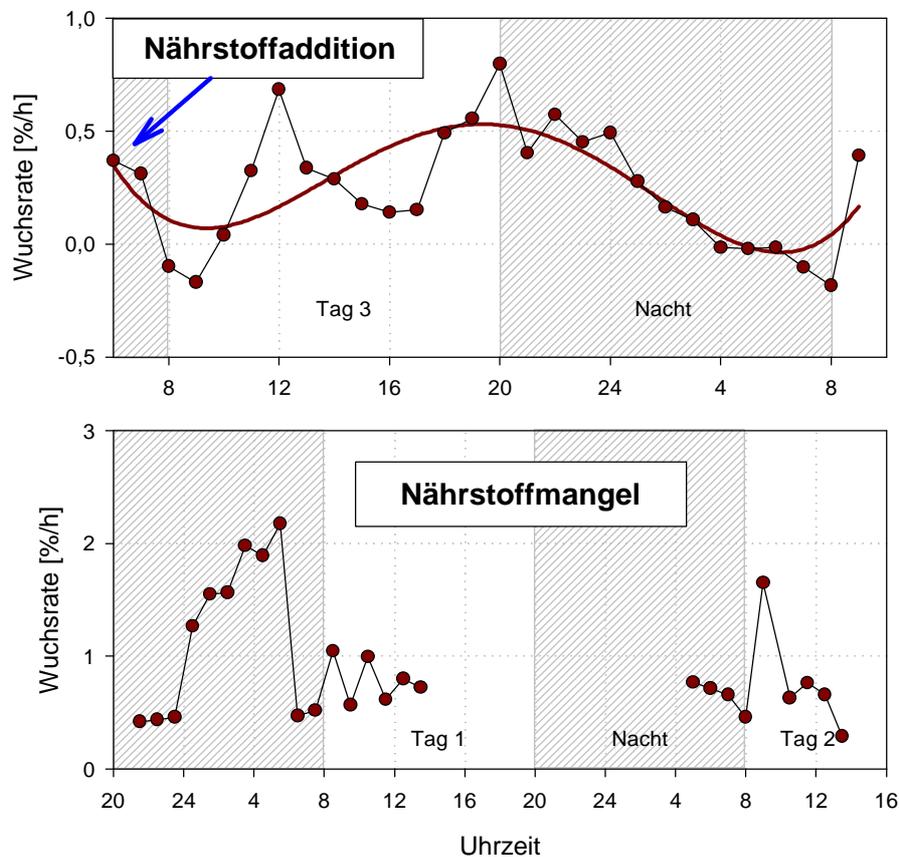


Abb. 7.58 Nährstoffaddition im Anschluss an eine Mangelsituation; Einfluss auf Tabak-Blattwachstum

## 7.8 Einfluss veränderter Tageslänge

Die Tageslänge könnte den entscheidenden externen Faktor für die Ausprägung des unter den gewählten Standardbedingungen beobachteten diurnalen Wachstumsmusters darstellen. Alle übrigen Aussenfaktoren (Temperatur, Luftfeuchte, Nährstoff- und Wasser-Verfügbarkeit, biomechanische Belastung) sind unter Standardbedingungen zeitlich nicht variabel. Daher wurden umfangreiche Untersuchungen sowohl zum Einfluss der Tageslänge (dieses Kapitel), der Lichtintensität (Kap. 7.9) als auch zum Einfluss einer differentiellen Variation der Lichtintensität (Kap. 7.10) durchgeführt.

### Versuchsdesign

In einem ersten Experiment wurden sowohl Rizinus- als auch Tabakpflanzen *aus Standardbedingungen in Dauerlicht* überführt. Über mehrere Wochen hinweg wurde an den Blättern verschiedener Pflanzen der Tagesgang der Wachstumsverteilung gemessen. Bei den untersuchten Tabakpflanzen wurde vier Tage nach deren Überführung in Dauerlicht eine Inhaltsstoffanalyse in Mittelrippe und Intercostalfeld von Blättern mit Wuchsraten von etwa 40 %/d durchgeführt. Die exakte Beprobung verlief nach dem in Kap. 7.2.5.1 beschriebenen Schema. Unmittelbar vor sowie zwei Tage nach Überführung fanden Gaswechsel-Messungen an Rizinuspflanzen statt.

Als nächstes Experiment schloss sich die Überführung von Rizinuspflanzen *aus Standardbedingungen in ein 18 h hell / 6 h dunkel – Lichtregime* an. Bei diesem Experiment wurde die Wachsrates eines jungen F2-Blattes über fünf Tage hinweg kontinuierlich verfolgt. Am sechsten Tag wurde das F3-Blatt derselben Pflanze in ein 2 h hell / 2 h dunkel – Lichtregime überführt und mit der DISP-Methode analysiert.

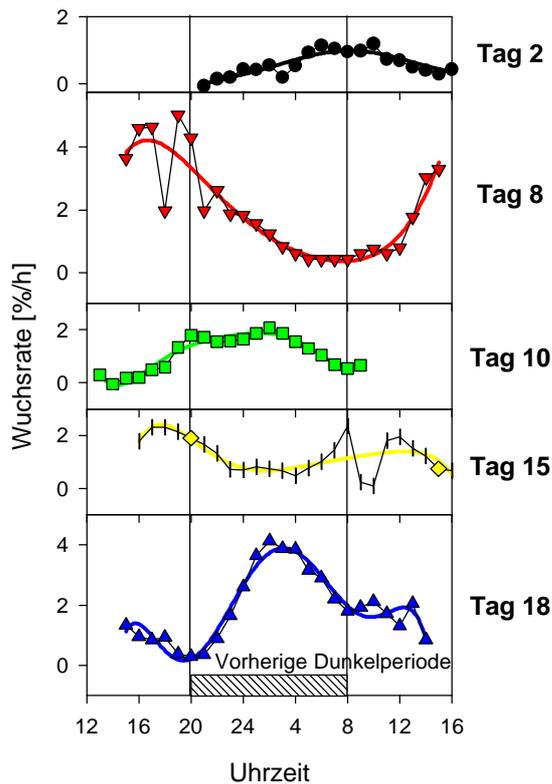
Schließlich wurde in einem letzten Experiment das Wachstum des Blattes einer Rizinuspflanze untersucht, die *seit der Keimung unter Dauerlichtbedingungen* stand. Dabei wurde sowohl die Wachsrates (DISP-Methode) als auch das Heben und Senken der Blätter (Videoaufzeichnung) im Tagesgang vermessen. Die untersuchte Pflanze wurde für Zwecke anderer Experimente in einer besonderen, aeroponischen Anzuchtform (Spraydruckkammer) kultiviert.

### 7.8.1 Wachstum

#### Überführung von Pflanzen aus Standardbedingungen in Dauerlicht

Sowohl die Blätter von Rizinuspflanzen (Abb. 7.59) als auch die Blätter von Tabakpflanzen (Abb. 7.60) zeigen nach Überführung in Dauerlicht weiterhin deutlich ausgeprägte Tagesgänge der Wachstumsaktivität; kurzfristige Wachstumsoszillationen treten jedoch nicht mehr auf.

Bei Rizinus können Wachstums-Tagesgänge mit der DISP-Methode bis zu 18 Tage nach Überführung festgestellt werden (Abb. 7.59). Die Lage des Maximums der Verteilung entspricht bereits nach wenigen Tagen nicht mehr derjenigen unter Standardbedingungen und verschiebt sich mit der Zeit; die Periodenlänge der Verteilung beträgt jedoch nach wie vor etwa 24 Stunden. Dies ist ein Hinweis dafür, dass der diurnale Wachstums-Tagesgang einem circadianen Rhyth-

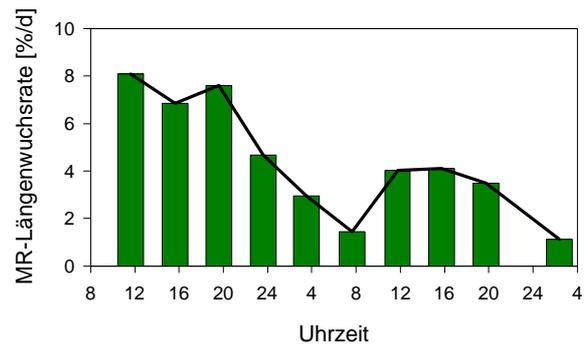


**Abb. 7.59** Messungen zum Tagesgang von Rizinus-Blattwachstum nach Überführung in Dauerlicht

Die Aufnahmen wurden im Verlauf von 18 Tagen an Blättern verschiedener Pflanzen gemacht. Symbole: 1-h-Mittel von DISP-Messungen; farbige Linien: Fitlinien.

mus unterworfen ist. Auch Nyctinastien treten weiterhin auf, jedoch in abgeschwächter Form (Daten nicht gezeigt).

Bei Tabak kann zwei Wochen nach der Überführung in Dauerlicht (Faden-Methode) ebenfalls noch ein Tagesgang des Wachstums von beachtlicher Amplitude gemessen werden (Abb. 7.60). Auch hier beträgt die Periodenlänge etwa 24 Stunden.



**Abb. 7.60** Fadenmessung: Tagesgang Tabak-Blattwachstum zwei Wochen nach Überführung in Dauerlicht

Mittelwerte der Messungen von sechs Blättern vergleichbaren Entwicklungszustandes.

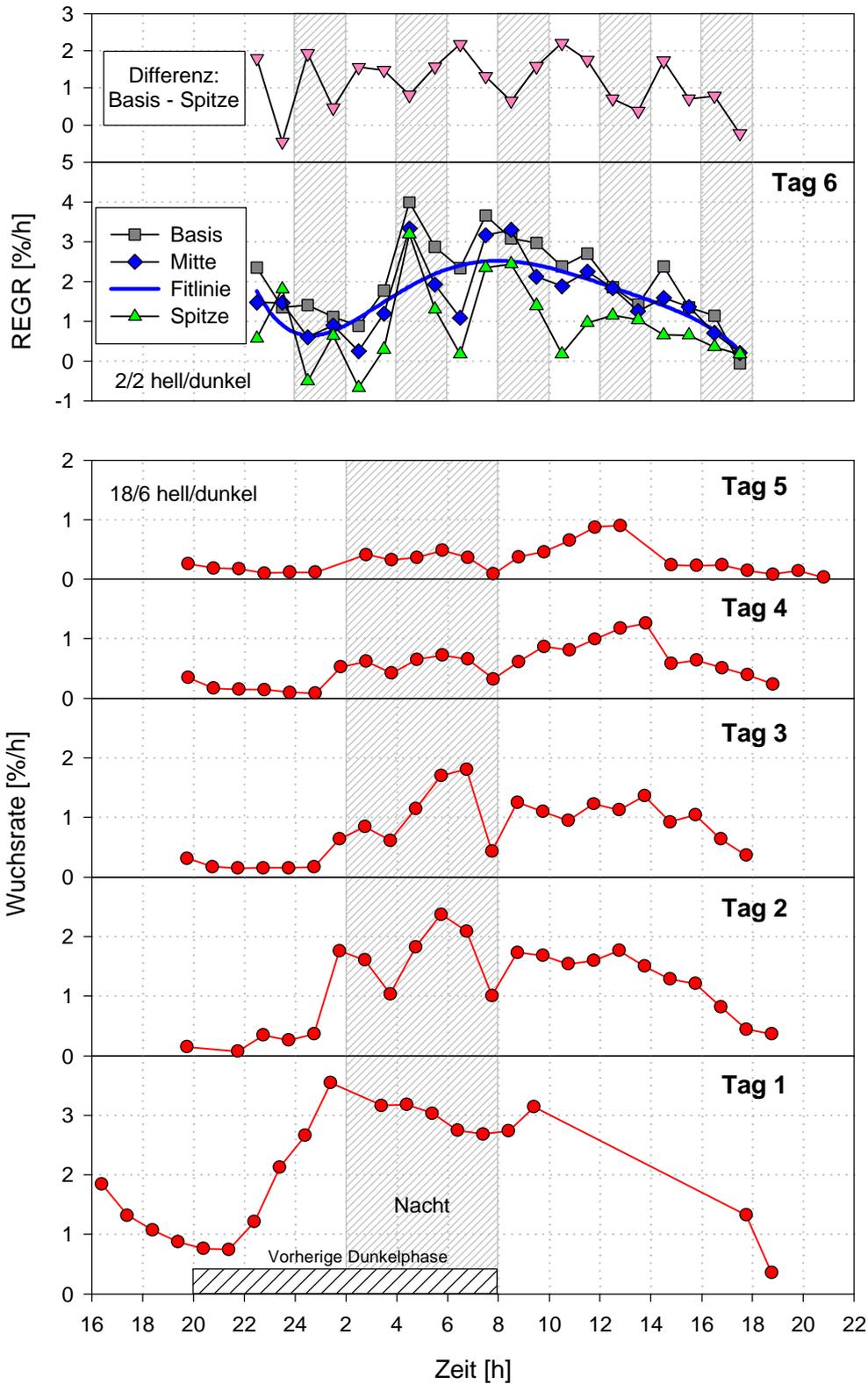
### Überführung von Pflanzen aus Standardbedingungen in 18 h hell / 6 h dunkel

Am ersten Tag nach Überführung der Pflanzen beginnt die Wachstumsrate des untersuchten Blattes zum üblichen Zeitpunkt anzusteigen, obwohl dieser Zeitpunkt nicht mit dem Einsetzen der Dunkelheit koinzidiert (Abb. 7.61). In den folgenden Tagen schiebt sich der Zeitpunkt des Anstieges der Wachstumsrate allmählich hinaus, bis das Minimum der Wachstumsaktivität schließlich am fünften Tag wieder mit dem Tag-Nacht-Wechsel koinzidiert. Die Entwicklung der Wachstumsverteilung ist dabei von der allgemeinen Abnahme der Wachstumsaktivität überlagert: Die Höhe des Wachstumsmaximums nimmt kontinuierlich von etwas über 3 %/h (Tag 1) auf unter 1 %/h (Tag 5) ab.

Bis zum fünften Tag erfolgt jedoch keine deutliche Reduzierung der Dauer des Wachstumsmaximums: Das Wachstumsmaximum befindet sich am fünften Untersuchungstag nicht mehr am Nacht-Tag-Übergang, sondern weit in den Tag hinein verschoben.

Dies könnte damit erklärt werden, dass die **zeitliche Synchronisation** des Blattwachstums-Tagesganges **in der Phase der geringsten** und nicht der stärksten **Wachstumsaktivität** erfolgt.

Am sechsten Tag nach Überführung der Pflanzen wurde die Beleuchtung der Plexikammer auf ein Lichtregime von 2 h hell / 2 h dunkel umgestellt. Das an diesem Tag beobachtete Blatt zeigt



**Abb. 7.61 Rizinus-Blattwachstum unter 18/6-hell/dunkel-Lichtbedingungen sowie in 2/2-hell/dunkel**

Oben: DISP-Messung an jungem Blatt sechs Tage nach Überführung aus Standardbedingungen in 2/2-hell/dunkel  
 Unten: DISP-Messung an fünf aufeinanderfolgenden Tagen unmittelbar nach Überführung in 18/6-hell/dunkel

wieder ein Charakteristikum circadianer Rhythmen (Abb. 7.61 oben): Zwar reagiert es auf den schnellen Lichtwechsel mit einem Ansteigen und Abfallen der Wachsrates; im Mittel wird jedoch der vorher eingestellte, charakteristische Verlauf des Wachstums-Tagesganges erreicht.

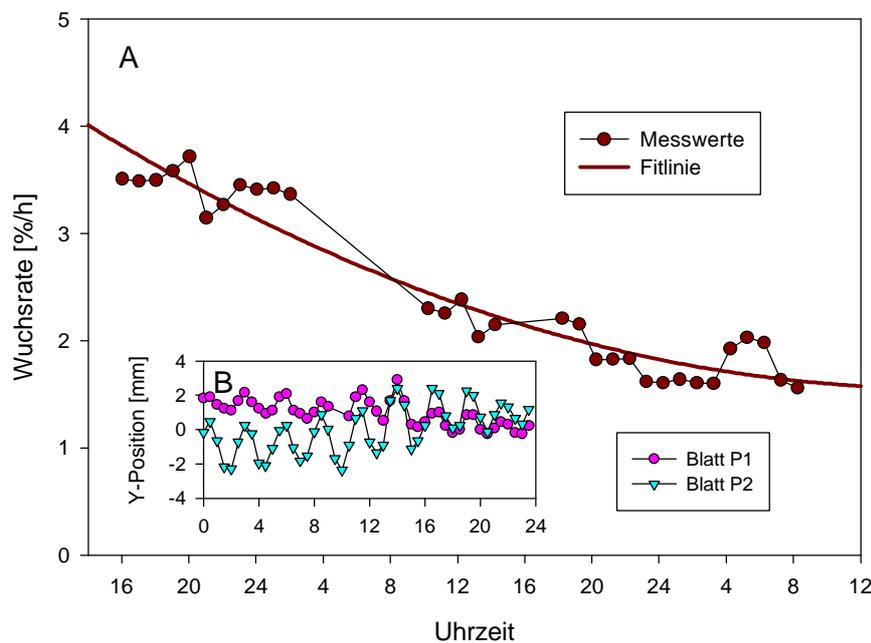
Besonders interessant ist bei dieser Messung die **Zeitreihe des Basis-Spitze-Gradienten** der Element-Wachsrates des Blattes (Abb. 7.61 oben): Zwar ist der Gradient während der kompletten Messphase deutlich ausgeprägt; seine Intensität variiert jedoch im Rhythmus des Lichtwechsels. Zu Beginn jeder Lichtphase tritt ein Maximum des Gradienten auf.

### Blattwachstum von Pflanzen, die ausschließlich im Dauerlicht kultiviert wurden

Das Blatt einer Rizinuspflanze, die ausschließlich im Dauerlicht kultiviert wurde, zeigt keinen Tagesgang der Wachstumsverteilung mehr (Abb. 7.62A). Die Wachsrates nimmt hier streng monoton ab.

Dies steht nicht im Widerspruch zur Vermutung, dass der Wachstumstagesgang einem circadianen Rhythmus unterliegt (und nicht eine reine Reaktion auf die Lichtverhältnisse darstellt), da circadiane Rhythmen stets erst nach einer Prägungsphase einsetzen können.

Nyctinastische Bewegungen der Blätter unterbleiben; lediglich Circumnutationen des Blattes um das Sprossachsensystem der Pflanze herum können beobachtet werden. Diese schlagen sich in elliptischen Auf- und Abbewegungen der Blattspitzen unfixierter Blätter nieder (Abb. 7.62B).



**Abb. 7.62 Blattwachstum einer Rizinus-Pflanze, die bereits in Dauerlicht angezogen wurden**

A: Verlauf der Wachsratesentwicklung; über 2 Tage hinweg ist kein Tagesgang zu erkennen.

B: Blattbewegungen finden noch statt; jedoch keine Nyctinastien, sondern lediglich Nutationsbewegungen von 2-3 h Periodenlänge.

## 7.8.2 Inhaltsstoffverteilungen

Bei Tabak wurden in analogem Umfang zu dem in Kap. 7.5.2 vorgestellten Datenmaterial Inhaltsstoff-Untersuchungen an Pflanzen, die seit vier Tagen im Dauerlicht waren, durchgeführt. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Überführung von Pflanzen in Dauerlicht die Ausbildung konstanter Transpirations- und Assimilationsverhältnisse mit sich bringt. Die Messungen an Pflanzen in Dauerlicht werden nachfolgend mit den Messungen an Pflanzen unter 12 h hell / 12 h dunkel – Standardbedingungen verglichen.

### Transpirations- und Assimilationsraten

Der Tagesgang von Assimilation und Transpiration ist bereits zwei Tage nach Überführung in Dauerlicht zum Erliegen gekommen (Abb. 7.63). Die Transpirationsrate der beiden miteinander verglichenen Rizinuspflanzen beträgt im Dauerlicht im Mittel 1,07 mmol/s/m<sup>2</sup> und damit nur 7 % mehr als die durchschnittliche Transpirationsrate der entsprechenden Messung unter 12 h hell / 12 h dunkel-Bedingungen. Die Assimilationsrate liegt in Dauerlicht im Mittel bei 1,4 µmol/s/m<sup>2</sup> und damit doppelt so hoch wie die über 24 h gemittelte Rate der 12 h hell / 12 h dunkel -Pflanze. Sowohl Transpiration als auch Assimilation sind im Dauerlicht zeitlich sehr konstant.

Dieses Ergebnis impliziert, dass sowohl die Transpiration als auch die Photosynthese unter Dauerlichtbedingungen konstant ablaufen und weder den Tagesgang des Wachstums noch eine möglicherweise variable zeitliche Verteilung von Inhaltsstoff-Konzentrationen induzieren können.

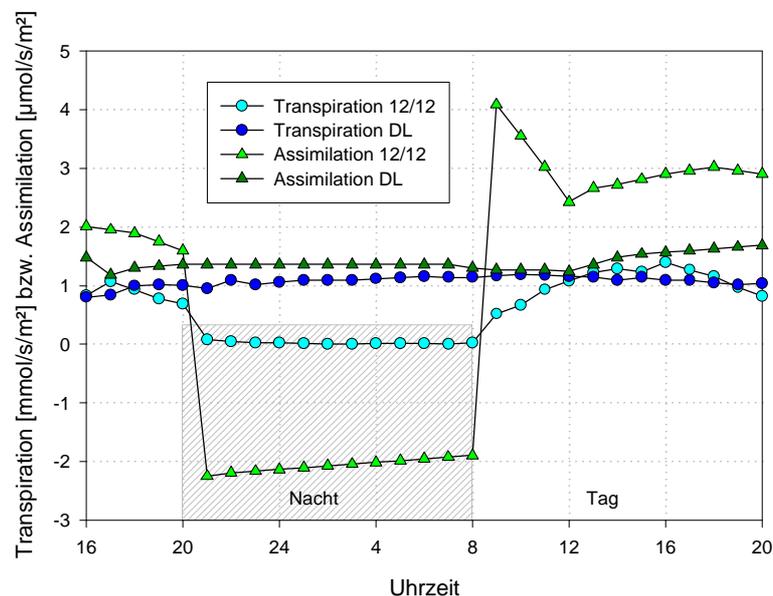


Abb. 7.63 Transpirations- und Assimilationsraten eines Rizinusblattes in 12/12-hell/dunkel sowie zwei Tage nach Überführung in Dauerlicht

### Zucker

Die mittlere Glucose-Konzentration (Abb. 7.64) liegt im untersuchten Blatt bei 11 µmol/g FG und ist damit viermal höher als unter Standardbedingungen (2,5 µmol/g FG). Auch die mittlere Fructose-Konzentration ist viermal so hoch wie unter Standardbedingungen (3,5 gegenüber 0,9

$\mu\text{mol/g}$  FG). Die mittlere Saccharose-Konzentration ist etwa dreimal höher als unter Standardbedingungen (8,7 gegenüber 3,2  $\mu\text{mol/g}$  FG).

Der Ader-Intercostalfeld-Gradient ist für alle drei löslichen Kohlenhydrate unter Dauerlichtbedingungen im Vergleich zu Standardbedingungen (Abb. 7.28) zum Intercostalfeld hin verschoben. Wie unter Standardbedingungen sind auch hier für Fructose und Glucose Basis-Spitze-Gradienten in der Mittelrippe zu erkennen, während für Saccharose ein Spitze-Basis-Gradient auftritt. Für Glucose und Fructose sind nun auch im Intercostalfeld deutliche Tagesgänge zu erkennen, die gegenüber den Verhältnissen unter Standardbedingungen um etwa vier Stunden verschoben sind. Die Maxima treten gegen Ende der Nacht auf, während sie unter Standardbedingungen in der Mitte der Nacht zu finden waren.

Die Verschiebung des Tagesganges der Kohlehydratkonzentrationen könnte mit der Verschiebung des Wachstumstagesganges korrelieren; in zukünftigen Experimenten muss eine gekoppelte Messung von Wachstum und Kohlehydratbestimmungen vorgenommen werden, um diesen Zusammenhang zu klären.

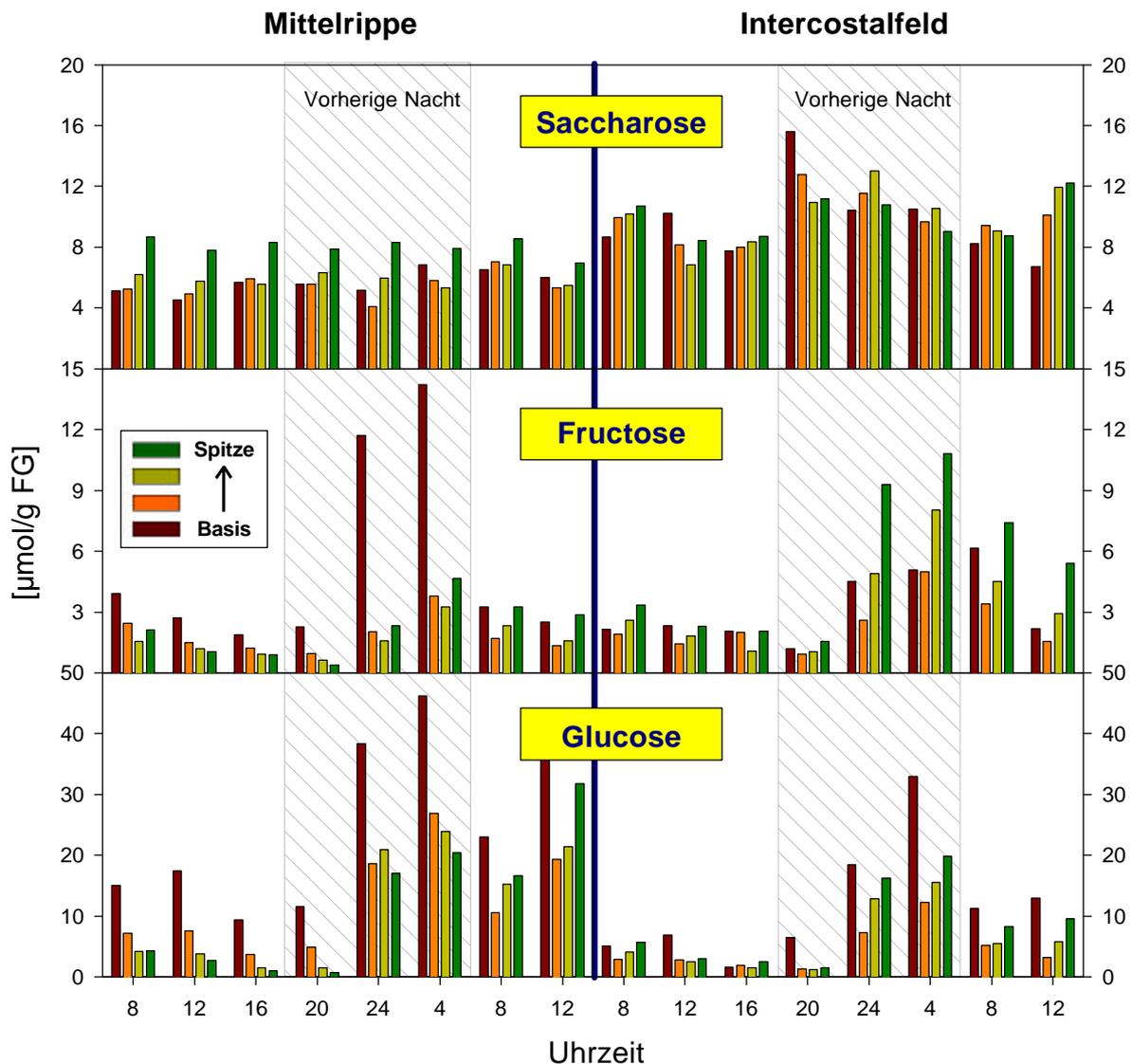
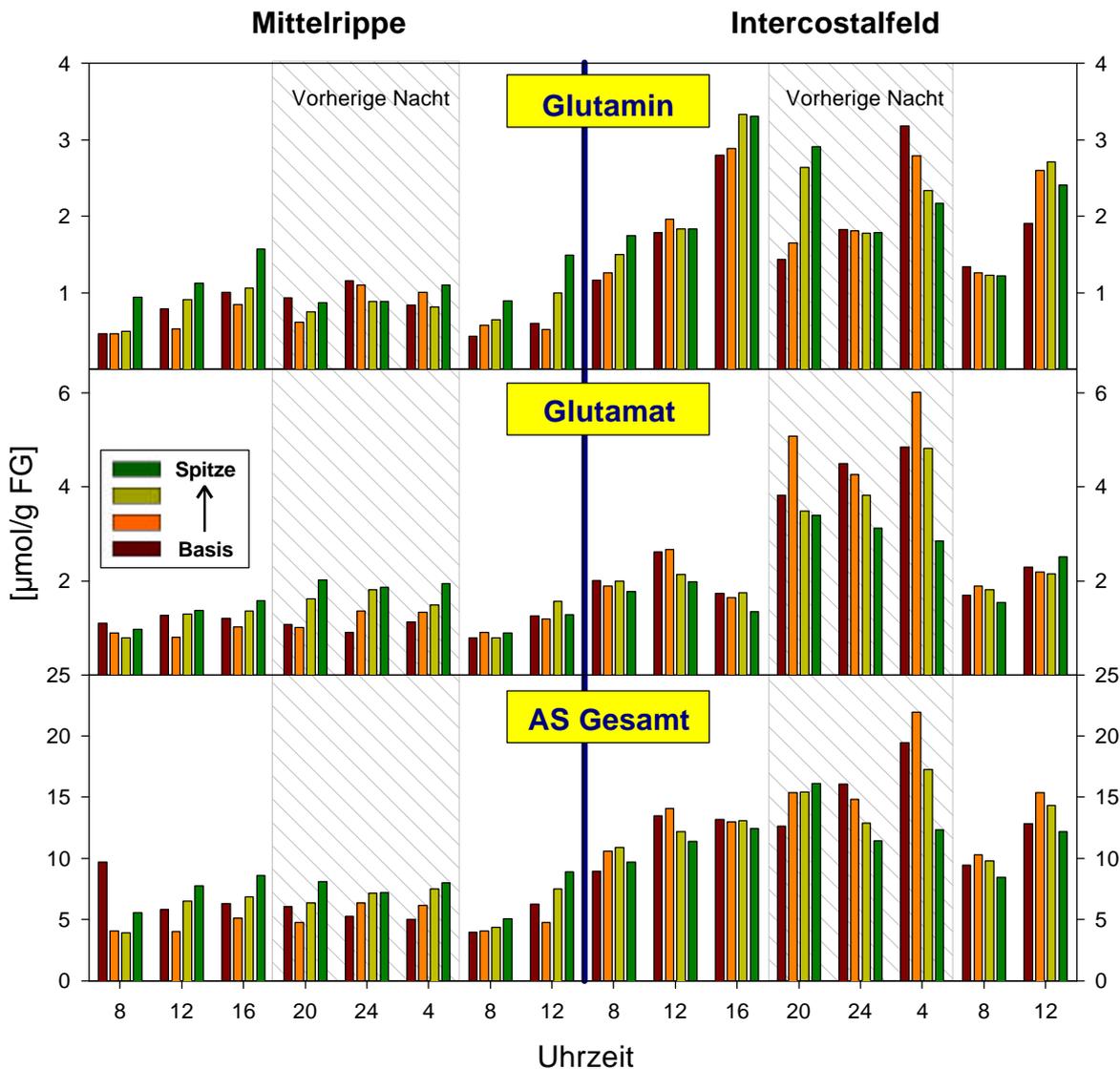


Abb. 7.64 Verteilung der Zuckerkonzentrationen in MR und IC von Tabakblättern unter Dauerlicht

**Aminosäuren**

Bei der Summe aller Aminosäuren-Spezies (Abb. 7.65) tritt unter Dauerlichtbedingungen gegenüber Standardbedingungen im Mittel eine Erhöhung um 50 % auf (von 7,5 auf 11  $\mu\text{mol/g}$  FG). Die Glutamatkonzentration weist dabei vergleichbare Gehalte wie unter Standardbedingungen auf (je 2,2  $\mu\text{mol/g}$  FG); der Glutamingehalt des Intercostalfeldes verdoppelt sich (von 0,8 auf 1,7  $\mu\text{mol/g}$  FG).

Der Ader-Intercostalfeld-Gradient von Glutamin vergrößert sich (unter Dauerlicht ist der Anteil im Intercostalfeld höher als unter Standardbedingungen); für Glutamat ist ein kleinerer Gradient zu finden als unter Standardbedingungen. In der Mittelrippe sind die Spitze-Basis-Gradienten nicht mehr so deutlich wie unter Standardbedingungen. Tagesgänge der Verteilungen sind nicht klar zu erkennen; die einzige Aminosäure, der ein Tagesgang zugesprochen werden könnte, ist Arginin. Wie im Fall der Kohlenhydrate ist das Maximum auch hier gegenüber den Verhältnissen bei Standardbedingungen um vier Stunden nach vorne verschoben.



**Abb. 7.65** Verteilung der Aminosäurekonzentrationen in MR und IC von Tabakblättern unter Dauerlicht

## Anionen

Unter Dauerlichtbedingungen ist im untersuchten Blatt kein Citrat mehr nachweisbar (Abb. 7.66). Die Malatkonzentration ist in Ader und Intercostalfeld deutlich erhöht gegenüber den Verhältnissen unter Standardbedingungen (26 statt 18  $\mu\text{mol/g}$  FG in der Ader; 43 statt 30  $\mu\text{mol/g}$  FG im Intercostalfeld). Die Konzentration von Nitrat ist in der Ader etwa vergleichbar mit den Verhältnissen unter Standardbedingungen (84  $\mu\text{mol/g}$  FG); im Intercostalfeld tritt eine wesentlich geringere Konzentration auf (26 statt 43  $\mu\text{mol/g}$  FG).

Im Intercostalfeld ist für Malat ein Spitze-Basis-Gradient zu erkennen (wie unter Standardbedingungen). Ansonsten treten keine weiteren räumlichen Gradienten bei den Anionen auf. Ein Tagesgang ist allenfalls für Malat in den Intercostalfeldern mit einem Maximum zu Beginn des Tages zu erkennen. Die übrigen Anionen-Zeitreihen weisen einen relativ uneinheitlichen Verlauf auf.

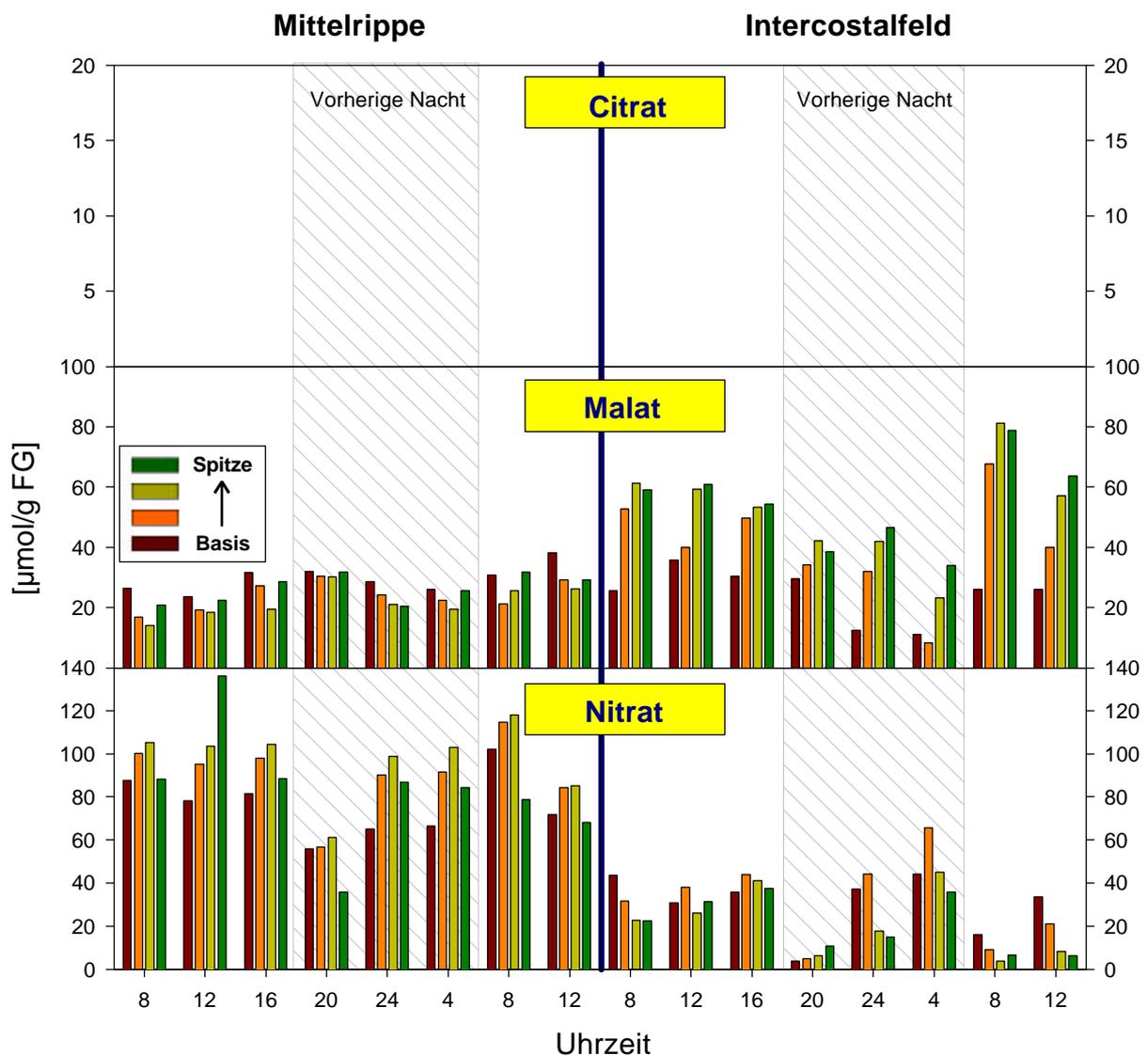


Abb. 7.66 Verteilung der Anionenkonzentrationen in MR und IC von Tabakblättern unter Dauerlicht

## Relationen von Zuckern und Aminosäuren

In den Dauerlichtpflanzen liegt ein höheres Verhältnis von *Zuckern zu Aminosäuren* vor als in den Pflanzen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden (Abb. 7.67). Dies gilt für alle drei betrachteten Blattstockwerke. Das Verhältnis von *Hexosen zu Saccharose* ist in den noch aktiv wachsenden Blattstockwerken T12 und T15 in Dauerlichtpflanzen höher als in Pflanzen aus Standardbedingungen.

Der Anteil von Glutamat ist bei den Dauerlicht-Pflanzen nur in Blattstockwerk T 15 vergleichbar mit demjenigen aus 12 h hell / 12 h dunkel – Pflanzen. In den übrigen beiden Blattstockwerken ist er niedriger. Da gleichzeitig der Glutaminanteil höher ist, ergibt sich unter Dauerlichtbedingungen ein erhöhtes *Glutamin:Glutamat-Verhältnis*. Bezüglich der übrigen Aminosäuren fällt vor allem der erhöhte Anteil von Alanin unter Dauerlichtbedingungen auf.

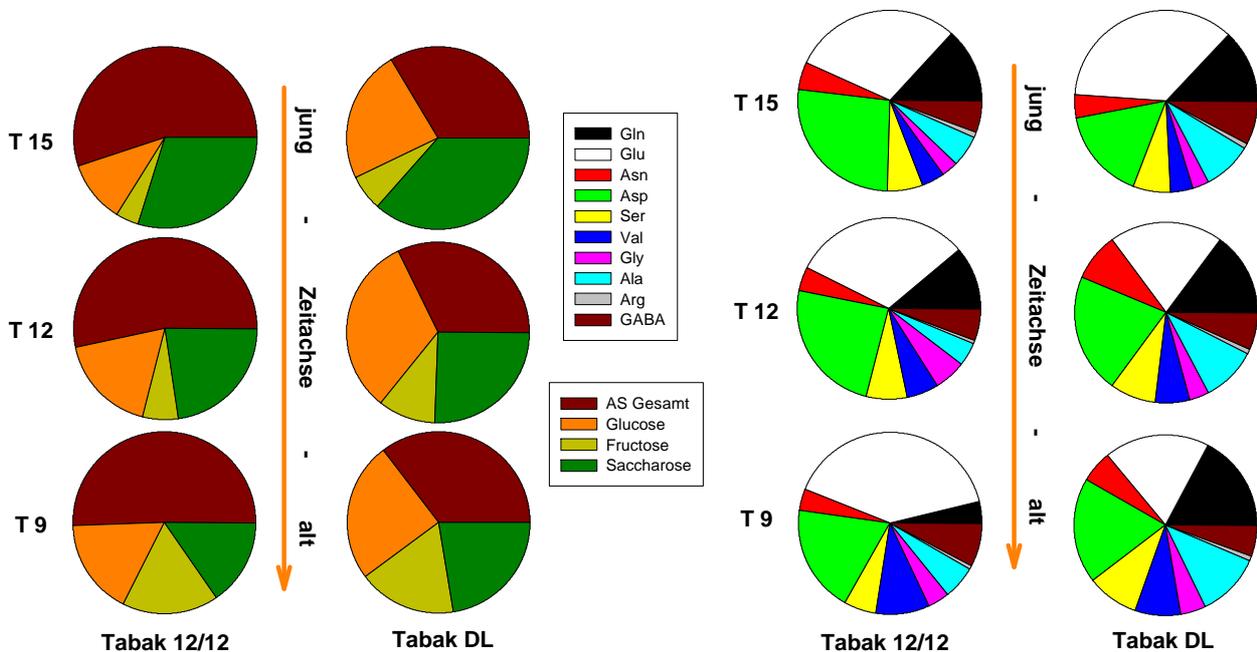


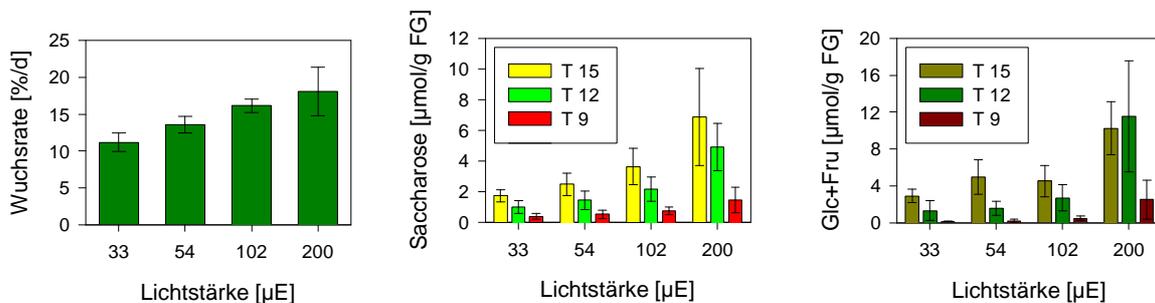
Abb. 7.67 Relationen von Zuckern zu Aminosäuren (links) sowie einzelner AS-Spezies zueinander (rechts) in Blättern aus drei Blattstockwerken von Tabak unter Dauerlicht (DL) und unter Standardbedingungen (12/12)

## 7.9 Einfluss veränderter Lichtintensität

Im vorigen Kapitel wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der Lichtdauer die Kohlehydratgehalte stark beeinflussen kann. Da diese eine parallele Entwicklung zum Tagesgang des Blattwachstums zeigen und möglicherweise eine wichtige Rolle für die Ausprägung von Wachstumsmustern spielen, soll in diesem Abschnitt auf die Beziehung zwischen Lichtintensität, Wachstum und Kohlehydratgehalten eingegangen werden.

Es wurde ein Experiment mit einer Population von 24 Tabakpflanzen durchgeführt, die bei einer Lichtintensität von 150  $\mu\text{E}$  im Rollwagen angezogen wurden. Zum Zeitpunkt der Emergenz des Blattes T 12 wurden unter dem Kriterium einer einheitlichen Wachsrates der Gesamtblattfläche Sechsergruppen der Pflanzen gebildet, die anschließend bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen (33, 54, 102, 200  $\mu\text{E}$ ) weiter kultiviert wurden. Nach fünf Tagen wurde die Wachsrates der Gesamtblattfläche vermessen und es wurden die Intercostalbereiche der Blätter T 9, T 12 und T 15 beprobt (je eine 8-mm-Blattscheibe von Basis und Spitze wurde vereinigt).

Sowohl die Wachsrates dieser Pflanzen (Abb. 7.68 links) als auch die Kohlehydratverteilung (Abb. 7.68 Mitte und rechts) korreliert mit der Lichtintensität: je geringer die Lichtintensität ist, desto niedriger ist die Wachsrates, bzw. desto niedriger ist die Konzentration von Saccharose, Glucose und Fructose. Bezüglich der Kohlehydrate ist der Effekt in allen drei untersuchten Blattstockwerken deutlich zu sehen. Ein Unterschied vom Faktor zwei in der Lichtintensität resultiert dabei in einem Wachstumsunterschied von 10 bis 20 %. Kohlehydratgehalte reagieren stärker; hier zeigt sich bei Verdopplung der Lichtintensität oft auch eine Verdopplung des Gehaltes.



**Abb. 7.68** Wachstum der Gesamtblattfläche (links), Saccharose- (Mitte) und Hexosegehalte (rechts) in Tabakblättern bei verschiedener Lichtintensität

## 7.10 Einfluss eines veränderten Inklinationswinkels eines Blattes

Bei der Etablierung einer optimalen Fixierungstechnik für Tabakblätter im DISP-Aufbau wurde festgestellt, dass diese sich nach ein bis zwei Tagen stark aufzuwellen beginnen, wenn man sie anstatt in die Horizontale (Inklinationswinkel  $0^\circ$ ) in die Vertikale (Inklinationswinkel:  $90^\circ$ ) fixiert (Abb. 7.69 links). Diese Aufwellung tritt unabhängig von der für die Fixierung gewählten Zugkraft sowohl für Tabakblätter als auch für Rizinusblätter ein. Zur Untersuchung dieses Effekts wurden folgende Experimente durchgeführt:

### Versuchsdesign

Es wurde die *Morphologie von Blättern* untersucht, die in *verschiedenen Inklinationswinkeln mit verschiedenen Zugkräften fixiert* sind. Unter Standardbedingungen wurden 15 Tabakpflanzen in Erdanzucht kultiviert. Die Pflanzen wurden bei Experimentbeginn unter dem Kriterium der vergleichbaren Wuchsrates von Blatt 12 in Dreiergruppen zusammengestellt. Eine der fünf Gruppen bildete die Kontrollpopulation; Blatt Nr. 12 der Pflanzen der übrigen Gruppen wurde entweder waagrecht oder senkrecht mit einer Anhängemasse von 5 g oder 30 g fixiert. Nach vierzehn Tagen wurden die dann ausgewachsenen Blätter geerntet, vermessen, gewogen und auf ihren Mittelrippenanteil hin untersucht.

Die *Inhaltsstoff-Verteilung* von Pflanzen, bei denen je ein Blatt in einem bestimmten Inklinationswinkel mit einer Anhängemasse von 30 g fixiert war, wurde in einem zweiten Experiment untersucht. Hierfür wurden 16 Erdanzucht-Tabakpflanzen im Rollwagen wiederum unter dem Kriterium vergleichbarer Wuchsrates von Blatt 12 zu vier Gruppen zusammengestellt: Bei einer Gruppe wurde Blatt 12 in einem Winkel von  $90^\circ$  fixiert; bei einer Gruppe mit  $45^\circ$ , bei einer Gruppe in einem Winkel von  $0^\circ$ ; eine Gruppe diente als unfixierte Kontrolle (Abb. 7.69 rechts). Nach vier Tagen wurden die Blattstockwerke 9, 12 (Basis und Spitze) sowie 15 am Anfang und am Ende des Tages beprobt. In zwei vereinigten 8-mm-Blattscheiben wurden die Gehalte von Stärke sowie löslichen Kohlehydraten gemessen.



**Abb. 7.69 Tabak-Inklinationswinkel-Experimente**

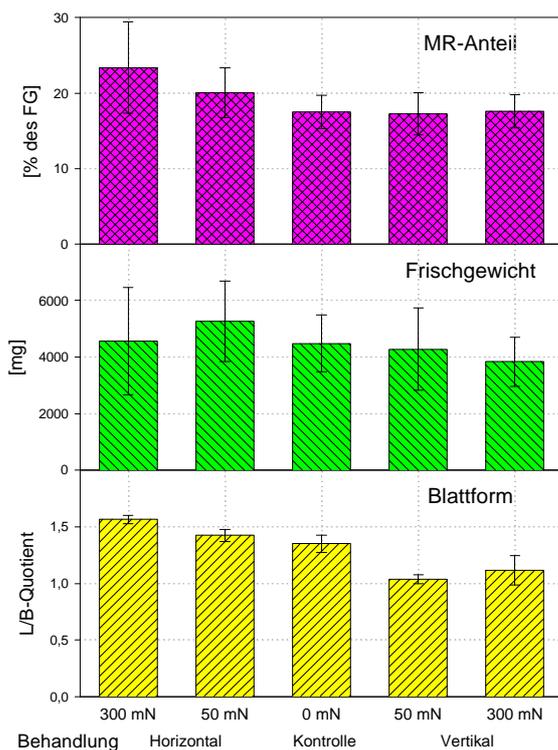
Links: Beginnende Aufwellung eines vertikal (Inklinationswinkel  $90^\circ$ ) mit 30 g abgespannten Blattes.

Rechts: Unter  $45^\circ$  (ganz rechts) sowie unter  $90^\circ$  (linke Bildseite) mit 30 g abgespannte Blätter im Rollwagen.

### 7.10.1 Wachstum

Die Fixierung von Tabakblättern in die Horizontale oder Vertikale führt nicht zu signifikanten Reduktionen des Wachstums, wenn man das Frischgewicht der untersuchten Blätter betrachtet (Abb. 7.70 Mitte). Auch der Mittelrippen-Anteil der Blätter verschiedener Behandlungen unterscheidet sich im Rahmen der Standardabweichung nicht voneinander (Abb. 7.70 oben). Unterschiede bestehen hingegen bezüglich der Blattform (Abb. 7.70 unten): Der Quotient aus Blattlänge und -breite (L/B) ist bei den vertikal fixierten Blättern deutlich geringer als bei den Kontrollen und bei den horizontal fixierten Blättern. Die in die Vertikale fixierten Blätter weisen darüber hinaus starke Aufwellungen der Blattspreite auf (Abb. 7.71).

Die soeben genannten vier Befunde zeigen, dass die beobachtete Wachstumsanomalie aus einem unverminderten Flächenwachstum bei reduziertem Längenwachstum der Mittelrippe folgt. Die Mittelrippe wächst bei Vertikalfixierung nicht mehr im normalen Ausmaß in die Länge zu, sondern kompensatorisch in die Dicke, während das Flächenwachstum der Intercostalbereiche unvermindert anhält, was zu den beobachteten Blattmorphologien führt. Bei den vertikal fixierten Blättern ist also die Balance zwischen Ader- und Intercostalfeld-Wachstum massiv gestört.



**Abb. 7.70 Strukturelle Parameter von horizontal bzw. vertikal fixierten Tabakblättern**  
Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von je vier Blättern (Experimentdauer: 2 Wochen).



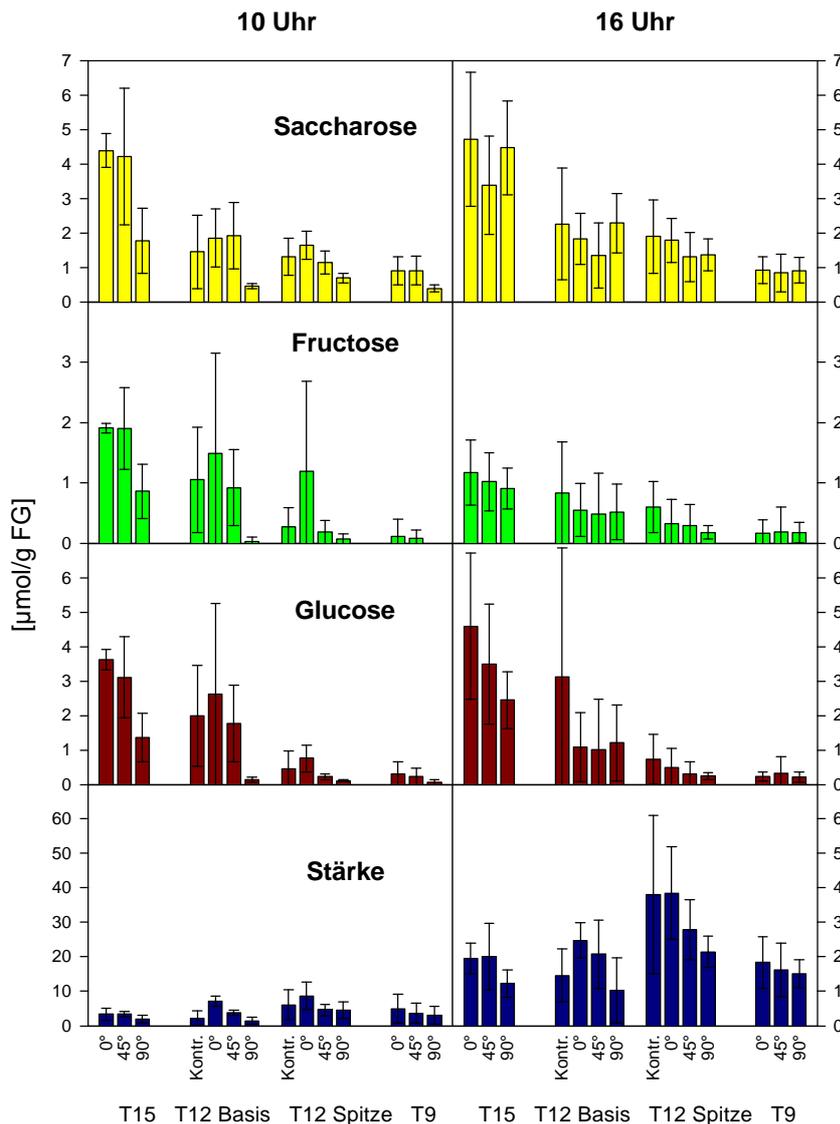
**Abb. 7.71 Typisches Erscheinungsbild eines in die Vertikale fixierten Tabakblattes**  
Die Aufwellungen der Blattspreite sind nach einer Experimentdauer von zwei Wochen gut zu sehen.

### 7.10.2 Inhaltsstoffverteilungen

Bei allen untersuchten Kohlenhydraten treten die geringsten Gehalte in den Pflanzen mit 90° Inklinationswinkel auf (Abb. 7.72). Die Reduktion ist im behandelten Blatt T12 am deutlichsten; auch T9 und T15 zeigen allerdings reduzierte Gehalte. Die Verringerung kann im Verlauf des Tages etwas kompensiert werden (sie ist zu Beginn des Tages deutlicher ausgeprägt). An der Blattbasis ist die Abnahme stärker ausgeprägt als an der Blattspitze. Es ist zu erwarten, dass in Blatt 12 bei vertikaler Fixierung die Kohlehydratpegel absinken (Kap. 7.9), da hierdurch die dem Licht exponierte Fläche des Blattes erheblich verringert wird.

Der Verlust der Balance zwischen Mittelrippen- und Intercostalfeldwachstum dieses Blattes könnte also durch das Absinken der Kohlenhydratpegel unter einen bestimmten Schwellwert im behandelten Blatt T12 verursacht sein. Der Kohlenhydratmangel würde sich dann zunächst auf die Mittelrippe auswirken, während das Intercostalfeld noch weitgehend normal wächst.

Untersuchungen mit direkter Beleuchtung der bei 90° fixierten Blätter müssen noch durchgeführt werden, um diese Hypothese zu bestätigen. Interessant ist auch, dass es hier nicht – wie bei Blättern mit zu geringer Last – zu einer Akkumulation von Stärke kommt.



**Abb. 7.72 Kohlenhydrat-Konzentrationen des Tabak-Inklinationswinkel-Experiments**

Angegebene Winkel sind Inklinationswinkel von Blatt 12; Blatt 9 und 15 waren stets unfixiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von je vier Blättern.

## 7.11 Interaktion mit den übrigen Blättern der Pflanze

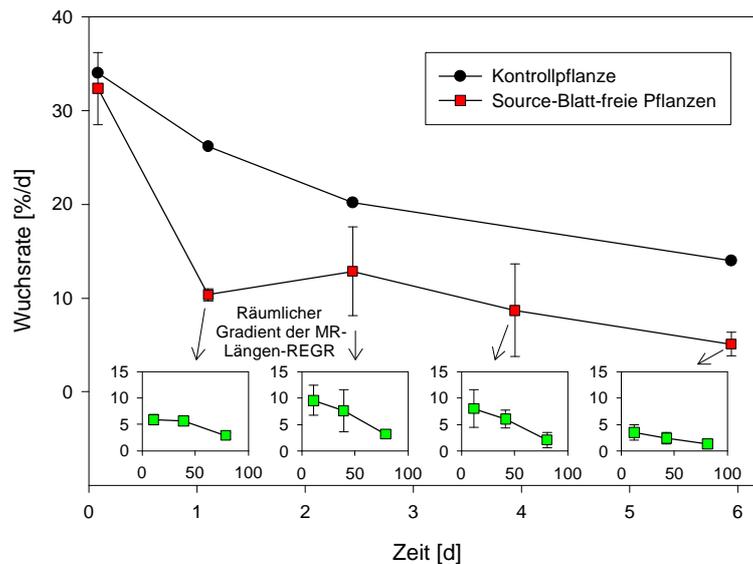
Das Blattwachstum läuft an einer intakten Pflanze stets im ausgeglichenem Zusammenspiel von Stoffimport und -export, also unter Austausch von Stoffen mit anderen Blättern oder pflanzlichen Organen ab. Es ist bisher unklar, ob der beobachtete Tagesgang des Blattwachstums autonom ablaufen kann, oder ob der Tagesgang maßgeblich durch die Stoffflüsse des gesamten pflanzlichen Systems beeinflusst wird. Dass eine derartige Beeinflussung existieren muss, konnte in Kap. 7.5 bereits am Zusammenspiel von Blatt- und Wurzelwachstum bei unterschiedlichen Temperaturregimen gezeigt werden. Untersuchungsgegenstand dieses Abschnittes ist das Wachstum eines Blattes an einer Pflanze, deren restliche Blätter entfernt wurden; die also keine weiteren Assimilat-Sources mehr aufweist.

Hierfür wurden drei Rizinuspflanzen unter Standardbedingungen untersucht. Eine Pflanze diente als Kontrolle; bei den beiden übrigen wurde jeweils das F3-Blatt mit einer Linealmessung untersucht. Die Keimblätter, Primärblätter, F1- und F2-Blätter dieser Pflanzen wurden beim Beginn der Messung von der Pflanze entfernt; die noch in der Knospe befindlichen F4-Blätter wurden an der Pflanze belassen.

In einem darauffolgenden DISP-Einzelexperiment wurde das F3-Blatt einer wie oben beschriebenen behandelten Pflanze auf ihr raum-zeitliches Wachstumsverhalten hin untersucht.

### Ergebnis der Linealmessung

Gegenüber der Kontrollpflanze ist die Wuchsrate der zwei getesteten Blätter am ersten Tag des Experimentes um über einen Faktor zwei reduziert (Abb. 7.73). Die Blattbasis weist dabei besonders niedrige Element-Wuchsraten auf, die diejenigen der Blattmitte kaum übertreffen. Nach zwei Tagen ist eine leichte Erholung der Wuchsrate festzustellen; auch der Basis-Spitze-Gradient



**Abb. 7.73** Wachstum von Rizinusblättern an Pflanzen ohne übrige Blätter

Rot: F3-Blätter zweier Pflanzen, deren übrige Blätter an Tag 0 abgeschnitten wurden. Schwarz: F3-Blatt einer intakten Kontrollpflanze. Insets: räumliche REGR-Verteilung entlang der Mittelrippe (X-Achse: Position in %; Y-Achse: REGR [%/d]) der Blätter der behandelten Pflanzen während des Experiments.

der Wuchsratenverteilung ist wieder annähernd normal ausgebildet. Die Wachsrates des Blattes der Kontrollpflanze wird jedoch bis zum Ende des Experimentes nicht mehr erreicht.

Dieses Experiment zeigt deutlich, dass das gesamte wachsende Blatt; besonders aber die ontogenetisch jüngere Blattbasis nicht nur im Hinblick auf biochemische Prozesse, sondern auch im Hinblick auf die Wachstumsaktivität auf den Import von Stoffen aus anderen Blättern angewiesen ist. Unterbleibt dieser Import, so kann die räumliche Verteilung der Wachstumsaktivität allerdings innerhalb weniger Tage in einen normalen Zustand zurückversetzt werden.

### Ergebnis der DISP-Messung

Der Tagesgang des Wachstums wird von der Entfernung der Source-Blätter nicht beeinflusst (Abb. 7.74). Hier wird ein zeitlicher Verlauf gefunden, der demjenigen unter Standardbedingungen sehr gut entspricht. Auch hier ist nur ein sehr geringer Unterschied zwischen den Element-Wuchsraten von Basis, Mitte und Spitze zu erkennen, was die Ergebnisse der Linealmessung bestätigt.

Das bedeutet, dass der Stoffexport und -import in bzw. aus anderen Blättern nicht von entscheidender Bedeutung für die Ausprägung des Tagesrhythmus der untersuchten Entwicklungsstadien von Blättern sein kann. Der Austausch von Assimilaten erhält aber die Intensität des Basis-Spitze-Gradienten der Wachstumsaktivität im Blatt aufrecht.

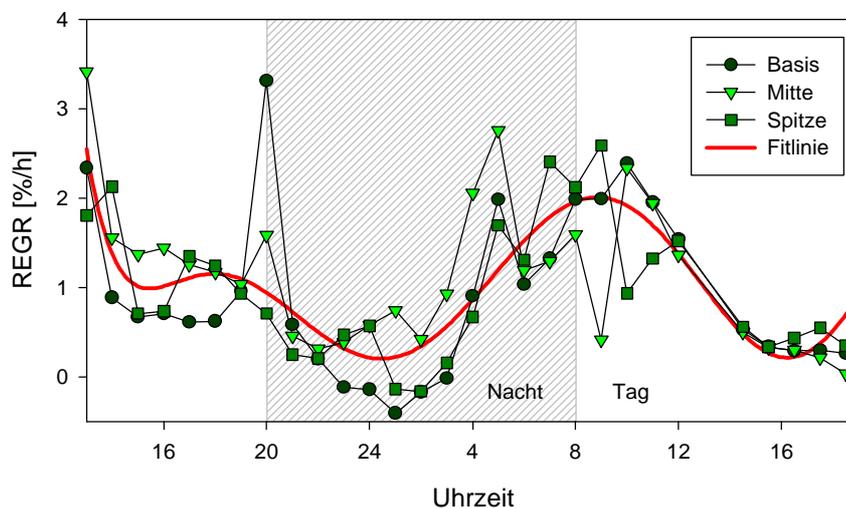


Abb. 7.74 DISP-Messung eines Ricinusblattes an einer Pflanze, deren übrige Blätter entfernt wurden

## 7.12 Wachstum isolierter Blattscheiben

Die Untersuchung von Blattwachstumsprozessen in Abwesenheit der natürlichen pflanzlichen Stoffimport- und -exportprozesse wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch einen Schritt weiter getrieben: Das Wachstum von dem Blatt entnommenen, auf Nährlösung flotierenden Gewebescheiben wurde untersucht. Die Untersuchung der Wachstumsaktivität von Blattscheiben ist aus verschiedenen Gründen sehr interessant:

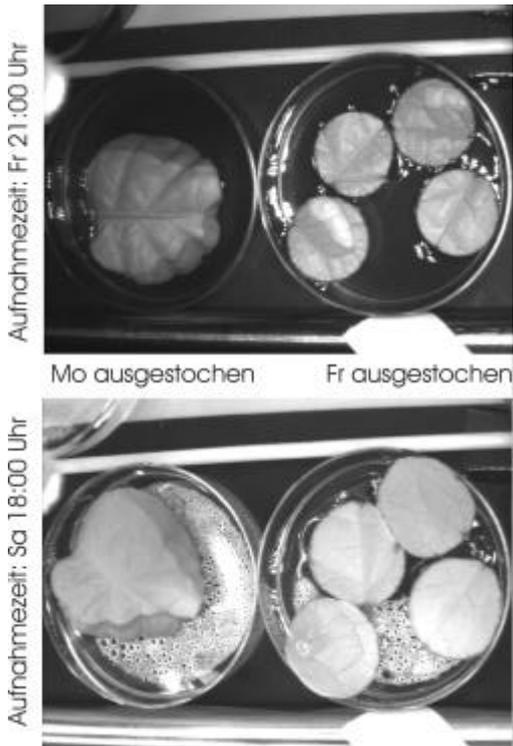
- Blattscheiben stellen ein System reduzierter Komplexität dar, da nur bedingt Prozesse des Stoffferntransportes für ihre Physiologie berücksichtigt werden müssen
- Die Wirkung verschiedenster Substanzen auf die Wachstumsaktivität pflanzlichen Gewebes kann sehr leicht durch Applikation der Substanz in die Nährlösung erreicht werden
- Die technische Umsetzung von Experimenten mit einer hohen Anzahl von Fragestellungen oder Replikaten kann mit Hilfe von Blattscheiben erheblich erleichtert werden, da sie einen geringeren Platzbedarf als Blätter an intakten Pflanzen haben und keine komplexen Bewegungsmuster auftreten können (Nyctinastien, Circumnutationen), die einen optischen Messprozess stets stören würden.

### Versuchsdesign

In ersten *Vorversuchen* wurde mit Hilfe von Schieblehrenmessungen überprüft, ob isolierte Blattscheiben bei Inkubation auf Ingestad-Nährlösung noch für eine gewisse Zeit weiterwachsen. Hierzu wurden mit Hilfe von Korkbohrern (8 bis 20 mm Durchmesser) Blattscheiben aus wachsenden Blättern ausgestanzt und auf Ingestad-Nährlösung (10 mM N) inkubiert (Abb. 7.75). Die Nährlösung wurde in Petrischalen gegeben, Tabakblattscheiben schwimmen aufgrund ihrer Oberflächenbeschaffenheit sehr gut auf Flüssigkeitsoberflächen.

In einem auf *hohe Präzision* ausgelegten Versuchsansatz wurde das Wachstum von einzelnen Scheiben mit Hilfe der DISP-Methode untersucht. Die Blattscheiben wurden in der Plexikammer mit dem üblichen DISP-Aufbau unter Einsatz einer stärker vergrößernden Optik vermessen (ein 10 mm Zwischenring zwischen Objektiv und Kamera erlaubt eine minimale Bildgröße von etwa 13 \* 18 mm). Die Blattscheiben flottierten auf Nährlösung in Petrischalen.

In einem zweiten Versuchsansatz, der auf einen *hohen Durchsatz von Blattscheiben* angelegt war, wurde ein Feld von 24 Blattscheiben innerhalb von fünf Minuten von Hand unter einer Kamera verschoben und die Größen der Blattscheiben durch eine Bestimmung ihrer Randlinie ermittelt. Für diese Versuche wurden Blattscheiben von 4 mm Durchmesser verwendet, die auf gut befeuchtete, in den Wells einer ELISA-Platte befindliche schwarze Schaumstoffpolster gelegt wurden (Abb. 7.76). Die Größenbestimmung der Blattscheiben erfolgte mit Hilfe von Einzelbildverarbeitung: In jeder Aufnahme einer Blattscheibe wurde die helle Fläche der Scheibe mit Hilfe eines heurisko-Unterprogrammes vom dunklen Hintergrund getrennt, wobei eine definierte Helligkeit (Grauwert 30) als Schwellwert der Segmentierung diente. Die Pixelanzahl ‚heller‘ Pixel steht für die Fläche der Blattscheibe. Mit diesem System war es möglich, eine zeitliche Auflösung von etwa zwei Stunden zu erreichen.



**Abb. 7.75** Zuwachsende Tabak-Blattscheiben in Petrischalen mit Ingestad-Nährlösung

Zwischen dem oberen und dem unteren Bild liegen 24 h; man sieht deutlich den Zuwachs der vier rechten Scheiben. Die linke Scheibe wurde vier Tage zuvor mit einem Bohrer derselben Größe ausgestochen und ist seitdem auf etwa die vierfache Fläche zugewachsen. Wie zu erkennen ist, verkrümmen sich die Blattscheiben mit der Zeit. Der Durchmesser der Petrischalen beträgt 5 cm.



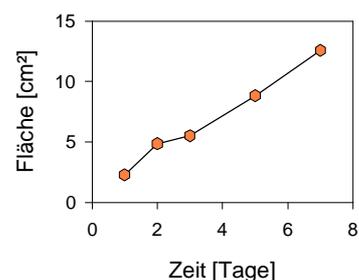
**Abb. 7.76** Blattscheiben in ELISA-Wells

Die Blattscheiben liegen auf Flüssigkeits-durchtränktem Schaumstoff, um eine Flotation zu minimieren, den Bildkontrast zu erhöhen und die Scheiben auch bei sinkendem Flüssigkeitspegel in derselben Höhe zu halten.

### Vorversuche zur Untersuchung von Blattscheibenwachstum

*Blattscheiben*, die Blättern einer Wuchsrate von etwa 50 %/d entnommen werden, *wachsen noch für mehrere Tage zu* (Abb. 7.77). In einem Fall konnte noch nach 14 Tagen ein Zuwachsen der Blattscheibe registriert werden. Das Blattgewebe, dem die Scheibe entnommen wird, darf keine zu hohe Wuchsrate aufweisen. Bei Wuchsraten des Ausgangsgewebes von etwa 100 %/d wird für das isolierte Blattstück kein Wachstum mehr registriert (Daten nicht gezeigt). Eventuell ist bei derartigen Schieben die Photosyntheseleistung noch nicht groß genug.

In Einzelfällen konnte registriert werden, dass die ausgestanzten Blattscheiben mit derselben Wuchsrate weiterwachsen wie das Gewebe des Blattes, dem sie entnommen wurden (Abb. 7.78). Dieses wiederum wies vergleichbare Wuchsraten wie Kontrollblätter auf; es war durch die bei der Blattscheibenentnahme auftretende Verwundung nicht in seiner Wachstumsaktivität eingeschränkt.



**Abb. 7.77** Flächenzunahme einer Blattscheibe

Dies zeigt deutlich, dass das wachsendes Blattgewebe (zumindest im untersuchten Entwicklungsstadium) nicht notwendigerweise auf den Import von Assimilaten oder Phytohormonen aus anderen Bereichen des Blattes oder der Pflanze angewiesen ist.

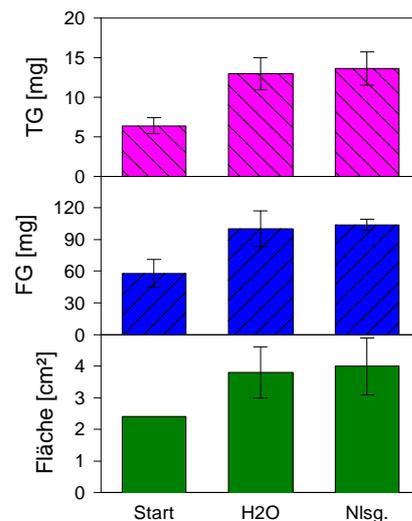


**Abb. 7.78 Wachstum von Blattscheiben und Blättern, denen die Scheiben entnommen wurden**

Links: nach 2 Wochen war die entnommene 12-mm-Blattscheibe auf einen Durchmesser von 27 mm zuge wachsen (gleich groß wie das beim Ausstanzen entstandene Loch). Oben: Ähnliche Resultate nach vier Tagen für ursprünglich 8 mm große Blattscheiben.

Bei der beobachteten *Flächenzunahme* handelt es sich in der Tat um eine *Biomassenzunahme* – und nicht nur um einen osmotisch bedingten Quellungsprozess – wie Messungen von Frisch- und Trockengewicht an Blattscheiben in verschiedenen Inkubationsmedien belegen (Abb. 7.79). Selbst bei Inkubation in Wasser erfolgt eine Zunahme der Blattscheibenmasse.

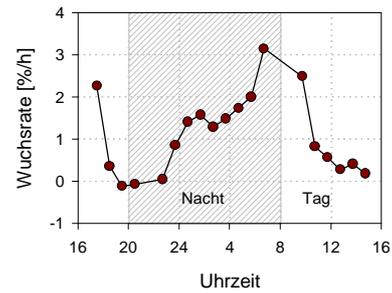
Dabei wird von der Pflanze vermutlich auf gespeicherten Stickstoff aus der Vakuole zurückgegriffen, um die für eine Zunahme des Trockengewichts notwendige Aminosäuren- und Protein-Biosynthese zu ermöglichen. Auch dies könnte erklären, wieso die gering vakuolisierten Zellen der bei einer hohen Wuchsrates entnommenen Blattscheiben nicht zuwachsen.



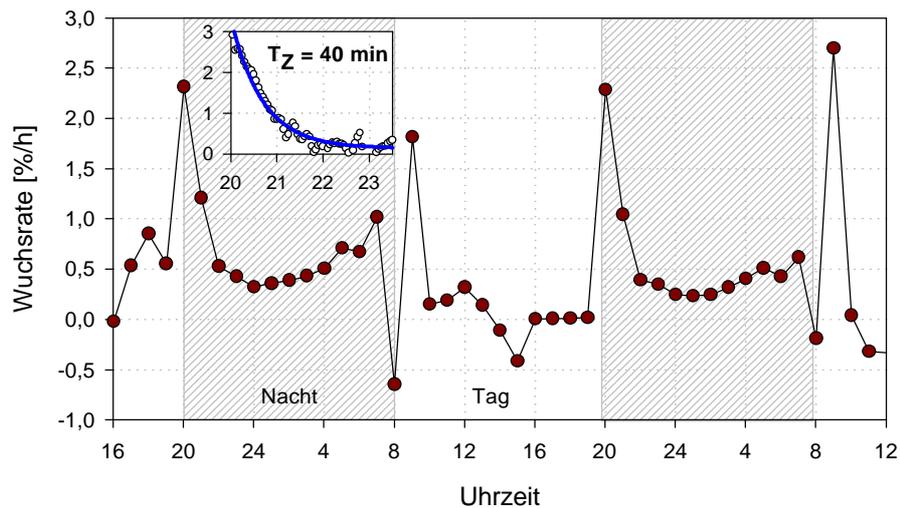
**Abb. 7.79 Flächen-, FG- und TG-Zunahme von Blattscheiben in Wasser und Nährlösung nach vier Tagen**

## DISP-Vermessung einzelner Blattscheiben mit hoher Präzision

Der Tagesgang des Wachstums ist selbst nach der Entnahme von Gewebe aus dem intakten Blatt heraus weiterhin unabgeschwächt vorhanden (Abb. 7.80 und Abb. 7.81). Die Charakteristika der Wachstumszeitreihe treten zu denselben Zeiten auf wie beim intakten Blatt: Das Maximum der Verteilung findet sich am Nacht-Tag-Übergang wieder; das Minimum am Tag-Nacht-Übergang. Die transienten Wachstumsvariationen bei Lichtwechsel sind wie auch im intakten Blatt unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Wachstumspeaks können in manchen Blattscheiben überhaupt nicht beobachtbar sein (Abb. 7.80), während in anderen Blattscheiben Wachsraten dieser Peaks bis zum Fünffachen des Tagesmittelwertes betragen können (Abb. 7.81). Wird eine transiente Wachstumsvariation bei Lichtwechsel beobachtet, treten relativ lange Abklingzeiten von bis zu 40 Minuten auf.



**Abb. 7.80** Blattscheibe ohne transiente Wachstums-Peaks



**Abb. 7.81** Tagesgang Blattscheiben-Wachstum in 12 h hell / 12 h dunkel

Inset: Transienter Wachstumspeak am ersten Tag-Nacht-Übergang; die Abklingzeit ist mit  $T_Z = 40$  min relativ lange.

## Dauerlichtversuche

Bei mehrfach replizierten Versuchen wurde gefunden, dass selbst im Dauerlicht der Wachstumstagesgang der Blattscheiben über längere Zeit hinweg erhalten bleibt (Abb. 7.82). Dies zeigt deutlich, dass auch die Fähigkeit zur Ausbildung des endogenen Rhythmus nicht entscheidend durch von aussen ins Blattgewebe importierte Substanzen abhängen kann, sondern eine intrinsische Fähigkeit ist.

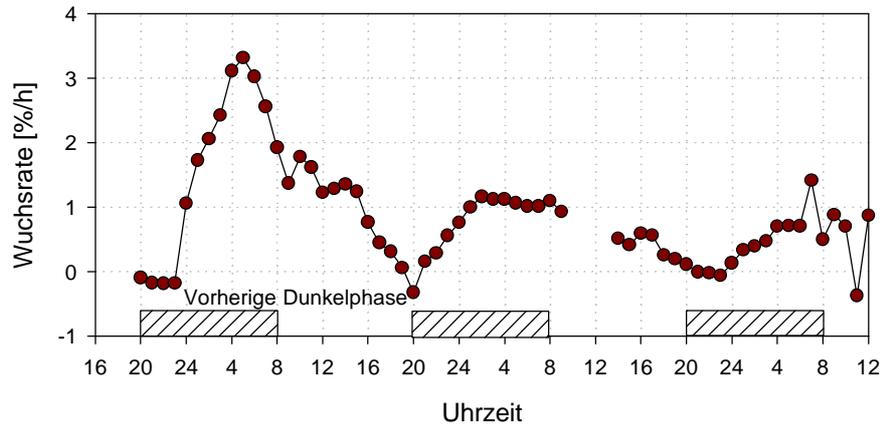


Abb. 7.82 Wachstums-Tagesgang einer Blattscheibe im Dauerlicht

### Vermessung von Blattscheiben in hoher Probenanzahl in Elisa-Wells

Zwei Populationen mit je 10 von 24 eingesetzten Blattscheiben konnten vermessen werden. Die Blattscheiben waren entweder in HEPES-Puffer oder einer Glutaminlösung inkubiert (Abb. 7.83). Der typische zeitliche Verlauf des Wachstums-Tagesganges ist gut zu erkennen; die Blattscheiben der beiden Behandlungen wiesen keine signifikant verschiedene zeitliche Verteilung der Wachsraten auf.

Dieses Ergebnis gibt zur Hoffnung Anlass, dass es dieser Ansatz in künftigen Studien ermöglicht, eine wesentlich höhere Anzahl von Proben während eines Experimentes untersuchen zu können. Dadurch wäre die Basis für eine verbesserte Untersuchung der Regulation von Wachstum durch Signale der verschiedensten Art geschaffen.

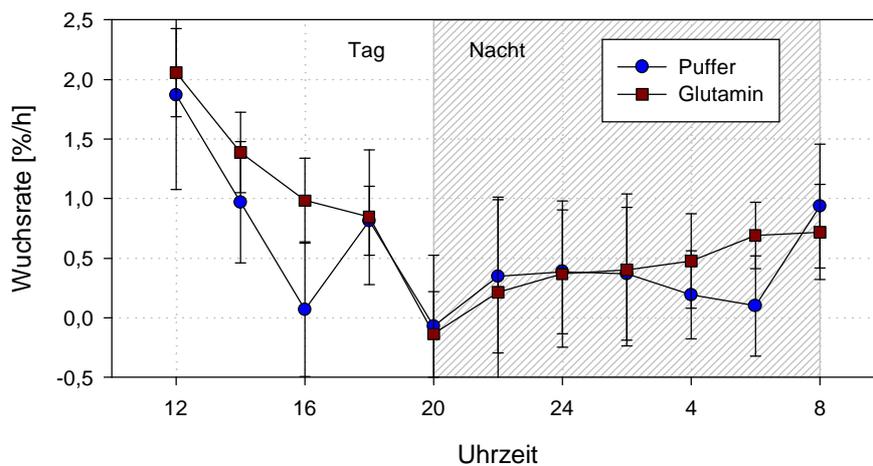


Abb. 7.83 Blattscheiben-Tagesgang bei Vermessung in Elisa-Wells

Zwei Populationen mit je 10 von 24 eingesetzten Blattscheiben konnten vermessen werden. Die Blattscheiben waren entweder in HEPES-Puffer oder einer Glutaminlösung inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Wachsraten.



# Diskussion

In der vorliegenden Studie konnten erstmals die für wachsende **Blätter** und **Wurzeln** charakteristischen **raum-zeitlichen Muster des Wachstums** mittels innovativer **Bildanalysemethoden** quantitativ mit **hoher Genauigkeit** erfasst werden. Viele aus der Literatur bekannte Muster konnten dabei erstmals mit einer Genauigkeit untersucht werden, die eine **Anknüpfung an biophysikalische, biochemische und molekulare Regulationsprozesse** ermöglicht. Ein großer Teil der Muster wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals charakterisiert bzw. erstmals in Verbindung mit **Inhaltsstoff-Verteilungen** und **Anzuchtbedingungen** der Pflanze gebracht. Die Wachstumsmuster werden dabei durch interne Parameter reguliert, hängen von externen Parametern ab und können nur aufgrund der Einbettung der untersuchten Organe in das **Gefüge der gesamten Pflanze** sowie aufgrund des anatomischen Aufbaus der Organe verstanden werden.

In der anschließenden Diskussion erfolgt daher eine integrierte Betrachtung von Wurzel und Blatt hinsichtlich ihrer Wachstumsmuster (Kap. 9), Inhaltsstoff-Verteilungen (Kap. 10) sowie hinsichtlich der möglichen Mechanismen der Wachstumsregulation (Kap. 11) auf den untersuchten Organisationsebenen der Pflanze. Da die Weiterentwicklung der Bildanalysemethoden der Schlüssel zu den vorgestellten neuen Erkenntnissen dieser Arbeit war, beginnt die Diskussion mit einer Einordnung und Bewertung der verwendeten Analysemethoden (Kap. 8).

## 8 Erfassen von Wachstumsmustern mittels verschiedener Techniken

Eine zentrale Entwicklung der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung der DISP-Methodik (digital image sequence processing) als Standardverfahren für Wachstumsbestimmungen in der Pflanzenphysiologie. Die Vor- und Nachteile der DISP-Methodik gegenüber den klassischerweise benutzten Techniken werden nachfolgend herausgearbeitet. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit weitere Verfahren zur Untersuchung von Wachstumsmustern mit hoher zeitlicher (kleiner 1 Tag) und räumlicher Auflösung entwickelt bzw. innovativ ergänzt, deren Aussagekraft anschließend besprochen wird.

### 8.1 Vergleich der DISP-Methodik mit anderen Methoden

#### 8.1.1 Räumliche und zeitliche Auflösung

Bei **Wurzeln** wurden in der vorliegenden Arbeit räumliche Wachstumsmuster mit einer Auflösung von bis zu 0,05 mm (Verteilung der Wachstumsaktivität entlang der Wachstumszone) sowie zeitliche Wachstumsmuster mit einer Auflösung von bis zu einer Minute (Transversal-Oszillationen) untersucht. Die räumliche Auflösung ist damit höher als in allen bisher publizierten Studien.

Die **ortsaufgelöste Vermessung des Wachstums** wird in der Regel durchgeführt, indem die Rhizodermis in regelmäßigen Abständen mit dunklen Partikeln versehen und die zeitliche Entwicklung des Abstandes verschiedener Partikel vermessen wird (siehe Kap. 2.2). Dabei werden Tintenpunkte (Erickson und Sax 1956), Graphit- bzw. Aktivkohlepartikel (Beemster und Baskin 1998) oder Tonerpartikel von Laserdruckern (pers. Mitteilung G. Beemster) verwendet. Beim Aufbringen der Punkte muss stets mit grosser Sorgfalt vorgegangen werden, um das Wachstumsverhalten der Wurzel nicht zu sehr zu beeinflussen. Nach dem Anbringen der Partikel dauert es eine gewisse Zeit, ehe die Wurzel wieder ein normales Wachstumsverhalten zeigt. Üblicherweise wird mit dem Beginn der Messung 30 min gewartet. Für Mais beträgt die maximal erreichte Auflösung in der Literatur 0,2 mm (Sacks et al. 1997) bei einer zeitlichen Auflösung von 2 h (15 min für die Basis der Elongationszone). Zeitliche Abstände zwischen den Aufnahmen von weniger als 15 min wurden nie realisiert.

Nur in wenigen Studien wurden die **Zellwände als natürliche Markierungen** verwendet:

Die Kartierung von Wuchsraten-Verteilungen gelang in zwei frühen Studien (Brumfield 1942; Goodwin und Stepka 1944) bei Wurzeln von *Phleum pratense*. Das Wachstum der Wurzel wurde mit einem Mikroskop ständig verfolgt; von Zeit zu Zeit wurden mittels eines Camera-Lucida-Projektors Zeichnungen der Zellgrenzen der Wurzelwachstumszone erstellt. Aufgrund des immensen Arbeitsaufwandes wurde dieser Ansatz jedoch nicht weiter verfolgt.

Eine weiterer Ansatz ist die kinematische Analyse von Zell-Längen-Profilen. Für Wurzeln (Beemster und Baskin 1998) sowie für Blätter von Monokotylen (z.B. Gandar und Rasmussen 1991, Beemster et al. 1996), die eine klare, lineare Differenzierung in Zonen von Zellteilung und Zellstreckung zeigen, kann die Verteilung der Elongationsraten aus der Ermittlung der durchschnittlichen Zell-Länge an verschiedenen Positionen des Organs rekursiv berechnet werden. Da es sich hierbei um eine destruktive Methode handelt, muss jedoch auf jegliche zeitliche Analyse der Prozesse verzichtet werden.

Bezüglich der **zeitlichen Analyse von Wachstumsmustern** der Wurzel liegen in der Literatur Berichte über Circumnutationsbewegungen (Shabala und Newman 1997a, Simmons et al. 1995) sowie über die absolute Wuchsrate ( $V_{\text{Spitze}}$ ) der Wurzel (Bengough und MacKenzie 1994; Cramer et al. 1988) vor. Dabei wurden jeweils Auflösungen von einer Minute erreicht. Im Fall der Circumnutationen wurden einzelne Abbildungen der Wurzel analysiert. Die Analyse der Bewegungsgeschwindigkeit der Wurzelspitze geschah entweder mittels Einzelbild-Analyse (Gordon et al. 1992) oder durch eine Vermessung mit LVDTs (linear variable displacement transducers; übrige obige Zitate). Dabei wird der Zuwachs der Wurzel registriert, indem die Ortsveränderung eines Fadens, der über eine Wachsschicht an der Kalyptra der Wurzel befestigt ist, mit elektronischen Mitteln registriert wird. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich Messgenauigkeiten im Bereich von Mikrometern erzielen. Das Messprinzip geht auf Julius Sachs zurück, der es im 19. Jahrhundert in einem ‚Auxanometer‘ genannten Aufbau erstmals zur Vermessung von Spross-Zuwachsraten einsetzte (Sachs 1887).

Während derartiger Messungen kann es leicht zu Veränderungen der natürlichen Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzel kommen, da die Befestigung des LVDT-Fadens in unmittelbarer

Nähe der meristematisch aktiven Region erfolgt. Die Zugkraft, die über die LVDT-Anlage auf die Wurzel ausgeübt wird, kann zudem die Wachstumsgeschwindigkeit des Organs stark beeinträchtigen (siehe Kap. 8.1.2).

Bei **Blättern** wurden in der vorliegenden Arbeit während ein- und derselben Messung räumliche Wachstumsmuster mit einer Auflösung von bis zu 1 cm (Verteilung der Wachstumsaktivität entlang der Mittelrippe) sowie zeitliche Wachstumsmuster mit einer Auflösung von bis zu drei Minuten (Tagesgang und kurzfristige Oszillationen des Wachstums gesamter Blätter) untersucht. Eine derartig hohe raum-zeitlich kombinierte Auflösung wurde bisher in keiner Studie einer anderen Arbeitsgruppe erreicht.

Die **ortsaufgelöste Vermessung des Wachstums** der Blattspreite wird in der Regel durchgeführt, indem in regelmäßigen Abständen Punkte aufmarkiert und die Punktabstände zu verschiedenen Zeitpunkten vermessen werden. Die Blätter werden dabei üblicherweise unter Zuhilfenahme eines Maßstabs fotografiert und die Bilder anschließend von Hand vermessen (Avery 1933, Maksymowych 1973, Walter und Schurr 1999). Zum Teil geschieht die Bildvermessung unter Einsatz von Rechnern und Standardsoftware (z.B. Granier und Tardieu 1998). Die Verwendung natürlicher Marken (z.B. Aderkreuzungspunkte) wurde bisher vernachlässigt.

Insgesamt beschäftigten sich nur wenige Studien mit der ortsaufgelösten Vermessung von Blattwachstum. Häufiger sind Studien zu finden, die sich mit der **zeitlichen Verteilung von Wachstumsaktivitäten in kompletten Blättern** befassen. Die Mehrzahl dieser Untersuchungen wurde mit Hilfe von LVDTs durchgeführt (siehe Tab. 9.1). Dabei wurde der Zuwachs des zu messenden Blattes registriert, indem das Blatt mit der Basis fixiert und die Ortsveränderung eines Fadens, der an der Blattspitze befestigt ist, registriert wurde. Eine Reihe von Untersuchungen wurde, wie auch in der vorliegenden Arbeit, mit Hilfe von weniger fein auflösenden Linealmessungen durchgeführt (siehe Kap. 8.2.1).

Eine zeitlich nur mit geringer Auflösung arbeitende, aber hochgradig automatisierte Messmethode erlaubt die Vermessung von auf die Horizontale projizierten Blattflächen (z.B. Leister et al. 1999). Dabei wird ein Verfahren der Einzelbildanalyse benutzt, um Blattfläche und Hintergrund optisch voneinander zu trennen. Eine separate Bestimmung von Wuchsraten einzelner Blattregionen ist dabei allerdings nicht möglich.

### 8.1.2 Biomechanische Beeinflussung des zu untersuchenden Organs

Aus technischen Gründen muss das zu untersuchende Organ im Rahmen einer DISP-Messung in die Focalebene der Kamera fixiert werden (Kap. 4.1, Kap. 7.2.3). Dabei treten Beeinflussungen des natürlichen Wachstums auf, deren Analyse Gegenstand umfangreicher Untersuchungen im Verlauf der vorliegenden Arbeit war (Kap. 7.3). Die Resultate dieser Untersuchungen führten nicht nur zu einer Optimierung des DISP-Aufbaus hinsichtlich der verwendeten Abspanntechniken der Blätter, sondern auch zu neuen Erkenntnissen über mögliche biomechanische Regulationsmechanismen des Blattwachstums.

Bei gleichmäßiger mechanischer Belastung des untersuchten Blattes zeigt sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen angelegtem externen Zug sowie der Wachsrates des untersuchten Blattes. Dieses Resultat wird von bisherigen Arbeiten an Blättern monokotyler Pflanzen bestätigt (pers. Mitteilung B. Moulia). Derartige Dosis-Wirkungsbeziehungen werden erst seit Bekanntwerden der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutiert.

Eine Beeinflussung des Wachstumsprozesses durch Zugkräfte tritt ebenfalls in **LVDT**-Studien auf. Auch dort müssen nyctinastische und circumnutatorische Blattbewegungen durch Strecken des Blattes verhindert werden, um eine Messung durchführen zu können. Die dabei verwendeten Zugkräfte wurden bislang allerdings unreflektiert eingesetzt und oft nicht einmal dokumentiert. In den dokumentierten Fällen reichen die verwendeten Zugkräfte von 20 mN (Heckenberger 1997) bis 0,5 N (Watts 1974); das entspricht an das Blatt angehängten Massen von 2 bis 50 g.

Vollkommen **berührungsfreie Techniken** zur Vermessung des Blattwachstums sind derzeit in Entwicklung (Kap. 4.2). In der Literatur sind vergleichbare Techniken bislang nur für Bewegungsanalysen bzw. für Wachstumsmessungen der absoluten Wachsrates und Circumnutationsfrequenz von Koleoptilen eingesetzt worden (Laser-Interferometer, Jiang und Staude 1989; Laser-Scanning, Barron und Liptay 1997).

Untersuchungen über **Wurzelwachstum** bei unterschiedlichen mechanischen Bodenwiderständen zeigen, dass Kräfte, die in longitudinaler Richtung an der Wurzelwachstumszone angreifen, einen erheblichen Einfluss auf Wachstumsprozesse ausüben (Masle et al. 1990). Daher ist zu erwarten, dass die mit LVDTs an Wurzeln durchgeführten Wachstumsmessungen weit davon entfernt sind, das Verhalten des Organs unter natürlichen Bedingungen zu beschreiben.

### 8.1.3 Einfluss der Lichtquelle auf die Bestimmung von Wachstumsmustern

Die bei der DISP-Messung verwendeten Infrarot-Dioden senden Licht in einem **physiologisch inaktiven Wellenlängenbereich** (nahes Infrarot) aus. Die Ausbildung von natürlichen Wachstumsmustern wird daher durch die Beleuchtung nicht beeinflusst. Alle anderen zitierten Studien, bei denen Blatt- oder Wurzelwachstum anhand von Fotografien oder projizierten Mikroskop-Aufnahmen vermessen wurde, verwendeten sichtbares Licht zur Aufnahme.

In Wurzeln kann dies zu negativ phototropen Wachstumseffekten führen (Strasburger 1998). Bei Blättern kann in der Nachtphase eine Beeinflussung des diurnalen Rhythmus des Wachstums bzw. eine kurzfristige Wachstumsoszillation analog zu den Verhältnissen am Beginn des Tages eintreten (Kap. 7.2.4.1).

Die für die DISP-Methode gewählte Lichtquelle führt darüber hinaus zu einem weiteren positiven Effekt: Der **Kontrast des Bildmaterials ist im Infraroten wesentlich höher als im Bereich des sichtbaren Lichtes** (Kap. 4.1, Schmundt 1999). Dadurch erhöht sich die Textur der Organ-Oberfläche und mit ihr die Verlässlichkeit (Informationsdichte) der DISP-Methode.

Beim **Blatt zeichnen sich die Adern** als dunkle Strukturen ab; in der Wurzel entsteht vermutlich durch die Heterogenität des dort ebenfalls vorhandenen **Interzellularraumes** (Nultsch 1995), der sich oft als Kontinuum durch die gesamte Pflanze hindurch erstreckt (Prat et al. 1997), ein strukturreiches Muster. Unterschiede in der Bildhelligkeit von kompaktem (z.B. Ader) und von Lufträumen durchsetztem Gewebe (Interzellularräume; Schwammparenchym) entstehen durch die unterschiedlichen optischen Eigenschaften dieser Gewebe:

Lichtreflektion tritt allgemein beim Übergang zwischen zwei Materialien unterschiedlicher optischer Dichte auf (Gerthsen 1986). Licht des nahen Infrarotbereiches kann wesentlich weiter in pflanzliches Gewebe eindringen als Licht aus dem sichtbaren Bereich des Spektrums, da die Absorption von Licht im nahen Infrarot in pflanzlichem Gewebe um einen Faktor 10 bis 100 niedriger als diejenige von sichtbarem Licht oder Licht im fernen Infrarot ist (Gausman und Allen 1973). Dies bedingt, dass ein signifikanter Anteil von Licht bis an die Grenze von Schwammparenchymzellen und Interzellularraum bzw. Rhizodermis und Interzellularraum gelangt und von dieser Grenzfläche reflektiert wird. Die Streuung und die Reflektion von Licht im nahen Infrarot ist dagegen höher als diejenige von Licht anderer Wellenlängenbereiche (Gausman und Allen 1973). Dadurch entsteht im nahen Infrarot ein wesentlich stärkerer Kontrast zwischen luftgefülltem und kompaktem Gewebe als in sichtbarem Licht. Beim Blatt kann dieser Effekt nur deswegen so stark ausgeprägt werden, weil Licht nach dem Durchdringen der oberen Epidermis in den Palisadenzellen focussiert und in besonderem Maß in die Gewebeschicht des Schwammparenchyms geleitet wird (Vogelman 1993). Hierbei spielen die spektralen Dispersionseigenschaften des Palisadenparenchyms eine entscheidende Rolle.

### 8.1.4 Zusammenfassende Wertung

Die Wachstumsvermessung mittels digitaler Bildsequenzverarbeitung (DISP-Methode) hat gegenüber anderen Methoden entscheidende **Vorteile**:

- Sowohl hohe zeitliche als auch räumliche Auflösung als auch eine Kombination dieser beiden Aspekte
- Die Applikation künstlicher Markierungen ist nicht notwendig. Da die gesamte ‚Textur‘ der Organ-Oberfläche (Grauwertkontraste) ausgenutzt wird, ist nicht einmal eine Identifizierung von konkreten Objekten auf den einzelnen Bildern notwendig (Kap. 4.1). Im Vergleich mit Einzelbildanalysemethoden reduziert dies die benötigte Rechenzeit enorm und führt zu einer erheblich verbesserten raum-zeitlichen Auflösung.
- Automatisierte Auswertprozeduren und ‚data mining‘-Funktionen (Extraktion relevanter, gemittelter Parameter der Messresultate) führen zu einer Erhöhung der Effizienz der Methode
- Für den Messprozess wird physiologisch inaktives Licht im nahen Infrarot verwendet, das zudem für sehr strukturreiche Bilder der zu vermessenden Organe sorgt

Als prinzipielle **Nachteile** der DISP-Methodik sind demgegenüber zu nennen:

- Die Methode erfordert großen technischen Aufwand (DISP-Aufbau, Soft- und Hardware)
- Die hohe Informationsdichte der Resultate muss auf relevante Inhalte hin gefiltert werden
- Das untersuchte Organ muss in die Focalebene einer Kamera fixiert werden, um Messartefakte zu vermeiden

*In der Summe dieser Argumente kann konstatiert werden, dass die DISP-Methode auf dem derzeitigen Stand der Technik eine Schlüsseltechnologie zur präzisen Vermessung von Wachstumsmustern verschiedenster Art in Wurzeln und Blättern darstellt. Die Effizienz, Präzision und breite Anwendbarkeit der Methode machen sie zu einem Werkzeug ungeahnter Mächtigkeit, mit dessen Hilfe sich ein weites Spektrum von Fragestellungen bearbeiten lässt.*

## 8.2 Übrige Methoden der Wuchsanalyse

Die übrigen, in der vorliegenden Arbeit flankierend eingesetzten Methoden zur Bestimmung von Wachstumsmustern können in zwei Gruppen eingeordnet werden: Nichtdestruktive und destruktive Methoden.

### 8.2.1 Nichtdestruktive Methoden

Zur Ermittlung der **absoluten Wuchsrates in einer Population von Wurzeln** wurden Linealvermessungen des Zuwachses einzelner Individuen durchgeführt. Hierzu wurde die momentane Position jeder Wurzelspitze im Durchfluss- oder Sandanzucht-Rhizotron durch Anbringen eines Punktes auf der durchsichtigen Aussenwand (Folie) markiert. Die Abstände zwischen diesen Punkten wurden in bestimmten zeitlichen Abständen vermessen.

Dies diente sowohl a) der Bestimmung der mittleren Wuchsrates der Population (Kap. 6.1) als auch b) der Selektion von Individuen einer durchschnittlichen absoluten Wuchsrates für eine anschließende DISP-Vermessung. Aus diesen zwei Gesichtspunkten heraus wird dieses Verfahren auch in der Literatur eingesetzt (z.B. Sacks et al. 1997, Beemster und Baskin 1998). Seine Vorteile liegen in der raschen Durchführbarkeit und der damit verbundenen Möglichkeit, eine grosse Anzahl von Individuen innerhalb eines Experiments mit einer beschränkten Genauigkeit auf einen Parameter hin zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe dieser Methode sogar eine Vermessung des Wurzelwachstums-Tagesganges (zeitliche Auflösung etwa 4 h) durchgeführt (Kap. 6.1.1).

Bei der **Analyse von Blattwachstum** stellt die Vermessung der Blattlänge und –breite mittels eines **Lineals** die dazu analoge Messmethode dar. Mit ihrer Hilfe wurden in dieser Arbeit Analysen von Wuchsraten der Gesamtheit aller Blätter (Kap. 7.1 und Kap. 7.2.1), der Blätter ver-

gleichbarer Blattstockwerke zur Selektion von Individuen (z.B. Kap. 7.2) oder der Längen von Mittelrippen aus Populationen vergleichbarer Blätter (Kap. 7.3.1) durchgeführt.

Bei der Auswahl von Blättern wurde das **Kriterium einheitlicher Wuchsraten** verwendet. Dies ist in vergleichbaren Studien der Literatur nur selten der Fall (Shackel et al. 1987). Dort wird bei der Zusammenstellung von Populationen bzw. bei der Auswahl von Individuen für LVDT-Messungen oft die absolute Blattlänge (z.B. Bunce 1976); oder die Blattposition (z.B. Christ 1978) als Kriterium herangezogen. Dies ist ein Schwachpunkt der genannten Studien zur Analyse von Wachstum, da die Kriterien einheitlicher Blattlänge oder Blattposition hinsichtlich des Ziels der Untersuchungen weniger aussagekräftig sind als das Kriterium einheitlicher Wuchsraten der untersuchten Blätter (Walter 1997).

Die **Genauigkeit** einer Lineal-Messung ist zwar beschränkt (etwa 0,5 mm); sie reicht aber aus, um in schnellwachsenden Arten eine Analyse der tageszeitlichen Variation der Wachstumsaktivität bei einer großen Anzahl von Individuen durchzuführen. Dies zeigen nicht nur die Resultate der vorliegenden Arbeit (Kap. 7.5), sondern auch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (z.B. McDonald et al. 1992; vergleiche Tab. 9.1).

Eine wesentlich höhere Präzision wird mit Hilfe der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten **Faden-Methode** erreicht, da hierbei der Anfangs- und Endpunkt der Längenmessung strenger definiert sind (Kap. 3.2). Die Genauigkeit dieser Methode beträgt etwa 0,1 mm; bei den untersuchten Blatt-Zuwachsraten konnte damit eine zeitliche Auflösung von 2 bis 4 Stunden erreicht werden (Kap. 7.2.4.1 und Kap. 7.3.1). Der wesentliche Vorteil der Faden-Methode gegenüber der DISP-Methode liegt darin, dass das Blatt während der gesamten Dauer der Studie in seinem natürlichen Krümmungszustand verbleibt.

Die **Vorteile beider Methoden gegenüber der DISP-Methode** liegen a) in der Möglichkeit, eine grosse Anzahl von Individuen parallel zu untersuchen und b) in der geringeren biomechanischen Beeinflussung des untersuchten Blattes. Bei beiden Methoden wird jedoch von Zeit zu Zeit ebenfalls mechanischer Stress auf das Blatt ausgeübt: Durch das Geradedrücken des Blattes während der Linealmessung bzw. bei der Fadenmethode (in geringerem Maß) dadurch, dass über den Faden am Blattstiel gezogen wird. Eine derartige mechanische Stimulation kann durchaus bereits Wachstumsreaktionen in der Pflanze hervorrufen (Mouli 2000b), die eventuell durch sogenannte ‚touch-genes‘ (Braam et al. 1997) reguliert wird.

### 8.2.2 Destruktive Methoden

In der älteren Literatur wird unter dem Begriff ‚Wachstum‘ stets die (nur destruktiv zu ermittelnde) Zunahme des Trockengewichts eines Organes verstanden (Hannam 1968; Williams und Rijven 1965). Wie die folgende Überlegung zeigt, ist **die Analyse kleinskaliger Wachstumsmuster auf Basis destruktiv zu ermittelnder Größen aus mehreren Gründen nicht möglich** (siehe hierzu auch Messungen in Heckenberger 1997; Walter 1997):

Die Analyse von Wachstum erfordert definitionsgemäss (Kap. 1.4) mehrere, zeitlich aufeinanderfolgende Messungen an ein- und demselben zu untersuchenden Gewebe oder Organ, da sich die Zunahme einer Größe stets nur aus der Differenz zweier Messungen ableiten lässt.

Die hohe intraspezifische Variabilität würde in der Praxis folgendes prinzipielles Analyseschema zur Ermittlung von Wachstum unumgänglich machen: Die zur Verfügung stehende Pflanzenpopulation wird hinsichtlich der Messgröße in homogene Teilpopulationen unterteilt; zu jedem Erntezeitpunkt wird jeweils eine komplette Teilpopulation beprobt. Dieses Verfahren hat den entscheidenden Nachteil, dass die Klassifizierung in Teilpopulationen dabei notwendigerweise nicht nach der Messgröße selbst vorgenommen werden kann (diese ist ja nur destruktiv zu ermitteln). Die Klassifizierung muss vielmehr aufgrund einer eng korrelierenden Messgröße erfolgen. Selbst wenn die Klassifizierung in Teilpopulationen erfolgreich durchgeführt werden könnte, würde bei der Interpretation der anhand der Ernten ermittelten Daten jedoch noch ein weiterer Unsicherheitsfaktor bestehen: Trotz erfolgreicher Klassifizierung kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Messgröße sich in den Teilpopulationen gleichartig weiterentwickelt hat.

Aufgrund dieser Unsicherheiten wurde der Ansatz, raum-zeitliche Wachstumsmuster in hoher Auflösung durch destruktive Verfahren zu analysieren im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht verfolgt.

**Destruktive Messungen** waren im Verlauf der vorliegenden Arbeit allerdings unerlässlich, um folgende **Messgrößen** der zuwachsenden Organe (im wesentlichen der Blätter) zu untersuchen:

- die zeitliche Variation von Gewebeverteilungen, wie etwa des Mittelrippenanteils (Kap. 7.3.1) oder des Interzellularvolumens (Kap. 7.1)
- die Verteilungen von Frisch- und Trockengewicht (Kap. 6.2.1 und Kap. 7.1)

Durch die Untersuchung des Mittelrippenanteils konnte ein Hinweis darauf erhalten werden, dass die Blattader im Tagesgang wesentlich gleichmäßiger zuwächst als die Intercostalfelder (Kap. 7.2.4.4). Die Untersuchung von Frisch- und Trockengewichts-Verteilungen waren notwendig, um einerseits die Gültigkeit der Korrelation zwischen der Wachstumsdynamik der Organ-Oberfläche und der Masse des Organs zu zeigen (Kap. 7.1); andererseits, um die Berechnung von Depositionsraten der Inhaltsstoffe zu ermöglichen (z.B. Kap. 6.1.4).

Auch die Analyse von Inhaltsstoffen, die einen wesentlichen Aspekt der vorliegenden Arbeit darstellt, wurde auf Basis destruktiver Methoden durchgeführt. Bei der Interpretation von Zeitreihen der Inhaltsstoff-Verteilung bestehen daher die gleichen Probleme, die oben für die Interpretation von Wachstumsmustern anhand destruktiv ermittelter Messgrößen genannt wurden.

## 9 Wachstumsmuster in Blatt und Wurzel

Nachfolgend wird die Musterbildung diskutiert und mit Ergebnissen der Literatur verglichen, die im Zuge der raum-zeitlichen Aktivitätsverteilung pflanzlichen Wachstums auf dessen verschiedenen Organisationsebenen abläuft. Dabei werden aus Gründen der Übersichtlichkeit vier Typen von Wachstumsmustern unterschieden, die in Wirklichkeit stets miteinander interagieren: Tagesgänge (Kap. 9.1), räumliche Gradienten (Kap. 9.2), Nutationen bzw. Krümmungsbewegungen (Kap. 9.3) sowie kurzfristige dynamische Änderungen der Wachstumsaktivität aufgrund von Änderungen der externen Bedingungen (Kap. 9.4).

### 9.1 Tagesgänge

#### 9.1.1 Wurzel

Für den Zuwachs der Wurzel konnte **kein deutlicher Tagesgang** gefunden werden (Kap. 6.1.1). In der Literatur gibt es nur sehr wenige Berichte über die tageszeitliche Variation des Wurzelwachstums; diese weisen jedoch ebenfalls auf ein tageszeitlich sehr gleichmäßiges Wachstum der Wurzeln verschiedener Arten hin (Reis und Hirse: Iijima et al. 1998; *Arabidopsis thaliana*: pers. Mitteilung S. Wilms). Als Maß für den Zuwachs der Wurzel wird dabei stets die absolute Wachstumsrate der Wachstumszone, also  $V_{\text{Spitze}}$  verwendet. Die in den Aufbauten der vorliegenden Arbeit für Mais gemessenen Werte (Kap. 6.1 und Kap. 6.2) stimmen mit den Ergebnissen aus der Literatur gut überein (z.B. Barlow und Rathfelder 1985, Felle 1998, Fortin und Poff 1991, Silk et al. 1989). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte (Kap. 6.1.1) unterliegt  $V_{\text{Spitze}}$  allerdings im Verlauf des Tages auch unter konstanten Aussenbedingungen gewissen kurzfristigen zeitlichen Schwankungen mit einer maximalen Änderung von  $0,1 \text{ mm/h}^2$  (entspricht  $5 \text{ \% / h}$ ).

#### 9.1.2 Blatt

Für die Wachstumsrate der untersuchten Blätter konnte dagegen ein **deutlicher Tagesgang** festgestellt werden. Sowohl für Rizinus als auch für Tabak wurde ein Maximum des Wachstumstages am Nacht-Tag-Übergang registriert. Die meisten Experimente, bei denen externe Bedingungen verändert wurden, führten nicht zu einer veränderten Lage des Maximums (Ausnahme: differentielle Temperierung von Spross und Wurzel, Kap. 9.1.3). Es kam allenfalls zu einer Verbreiterung des Maximums (Verlängerung der Lichtdauer) oder zu einer gedämpften Amplitude des Wachstums-Tagesganges (Verringerung der Wasser- oder Nährstoff-Verfügbarkeit). Aus der Literatur wird ein entsprechendes Resultat für die zeitliche Wachstumsratenverteilung bei Austrocknung von *Festuca* berichtet (Durand et al. 1995).

Die genaue Ausprägung des Tagesganges ist allerdings sehr variabel: Die Uhrzeit, zu der der Maximalwert der Verteilung festgestellt wurde, variierte um einige Stunden; auch die maximale Amplitude der Verteilung kann aufgrund der am Lichtwechsel auftretenden kurzfristigen Wachstumserscheinungen (Kap. 9.4) nicht exakt angegeben werden. Dennoch lassen die Messungen an beiden Arten keinen Zweifel daran, dass unter den vorgegebenen Standardbedingungen der Wachstums-Tagesgang in der beschriebenen Weise reproduzierbar auftritt. Er ist mit gewissen

Mustern von Inhaltsstoff-Verteilungen korreliert (Kap. 10.1.3) und könnte von verschiedenen internen regulatorischen Mechanismen beeinflusst sein (Kap. 11); unter anderem wurde eine enge Korrelation mit der Expression von Expansin-Genen festgestellt (Kap. 7.2.6).

In der Literatur wurden auch bei verschiedenen anderen Arten höherer Pflanzen Blattwachstumstagesgänge festgestellt (Tab. 9.1). Über das definitive Ausbleiben eines Wachstums-Tagesganges wurde dagegen in keiner dem Autor bekannten Studie berichtet.

Es ist nicht auszuschliessen, dass verschiedene Arten ihren Wachstums-Höhepunkt zu verschiedenen Tageszeiten haben. Ein Faktor, der beim Vergleich der Peaklage der Wachstums-Tagesgänge verschiedener Arten jedoch unbedingt berücksichtigt werden muss, sind die Anzuchtbedingungen der Pflanzen. Wie gezeigt wurde (Kap. 7.5), fällt in Freilandanzuchten auch bei *Rizinus* das Maximum des Tagesganges in die Mitte des Tages. Viele der in Tab. 9.1 erwähnten Studien fanden im Freiland statt. Es ist anzunehmen, dass sich hier - insbesondere durch die veränderten und wesentlich variableren Licht- und Temperaturbedingungen - gegenüber Laborbedingungen oft andere Wachstums-Tagesgänge ausbilden können.

**Tab. 9.1 Tagesgang des Blattwachstums: Zeitliche Lage der Maxima bei verschiedenen Arten**

Gattung (Mono/Dikotyle)	RGR – Peak		Messmethode	Autor
	Tag	Nacht		
<i>Zea</i>	X		LVDT	Watts (1974)
	X		Lineal	Acevedo et al. (1979)
<i>Triticum</i>	X		LVDT	Christ (1978)
	X		Lineal	Kemp und Blacklow (1980)
<i>Sorghum</i>	X		Lineal	Acevedo et al. (1979)
<i>Festuca</i>		X	LVDT	Durand et al. (1995)
<i>Oryza</i>	X		LVDT	Seneweera et al. (1995)
<i>Helianthus</i>		X	Lineal	Boyer (1968)
<i>Glycine</i>		X	Lineal	Bunce (1977)
<i>Phaseolus</i>	X		LVDT	Davies und VanVolkenburgh (1983)
<i>Vitis</i>	X		LVDT	Shackel et al. (1987)
<i>Salix</i>	X		Lineal	McDonald et al. (1992)
<i>Betula</i>	X		LVDT	Taylor und Davies (1985)
<i>Acer</i>		X	LVDT	Taylor und Davies (1985)
<i>Ricinus</i>		X	DISP	Schmundt et al. (1998)
<i>Nicotiana</i>		X	DISP	Walter und Schurr (2000)

### 9.1.3 Kombinierte Untersuchungen von Tagesgängen an Blatt und Wurzel

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals kombinierte Untersuchungen von Tagesgängen an Blatt und Wurzel durchgeführt (Kap. 7.5). Die dabei für Tabak gewonnenen Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass die Ausprägung des Blattwachstums-Tagesganges durch die Temperierung der Wurzel entscheidend beeinflusst wird. Dies könnte auf zeitlich variable Sink-Source-Verhältnisse zwischen beiden Organen hinweisen (Kap. 11.3).

Bei **konstanter Temperatur sowohl am Spross als auch an der Wurzel** wird weder an der Wurzel von Tabak (Kap. 7.5) noch von Mais (6.1.1) ein Wachstums-Tagesgang festgestellt. Tabakblätter zeigen dagegen einen Tagesgang der Wachstumsaktivität mit einem Maximum am Nacht-Tag-Übergang.

Bei **erhöhter Temperatur während des Tages am Spross und an der Wurzel** (Tabak), die sich in einem Topf mit geringer Wärmekapazität befindet, tritt das Blattwachstumsmaximum weiterhin am Nacht-Tag-Übergang auf (Kap. 7.5). Zwar konnte bei diesem Versuch das Wurzelwachstum nicht parallel registriert werden, aber aus Befunden sowohl an Mais (Kap. 6.4; auch Pahlavanian und Silk 1988) als auch an Arabidopsis (pers. Mitteilung S. Wilms) kann gefolgert werden, dass auch die Tabakwurzel auf eine Temperaturänderung mit einer gleichsinnigen Änderung der absoluten Wuchsrates reagiert hat. Für diesen Fall könnte sich also eine tageszeitliche Variation der Wurzelwachstumsgeschwindigkeit mit einem Maximum zum Zeitpunkt der höchsten Temperatur (Tag-Nacht-Übergang) ergeben haben.

Bei **differentieller Temperierung von Spross und Wurzel** konnte bei Tabak eine Verlagerung des Blattwachstums-Aktivitätspeaks in die Mitte des Tages hinein erreicht werden, indem die Wurzel auf konstanter Temperatur gehalten wurde und der Spross am Tag höheren Temperaturen ausgesetzt war als in der Nacht (Kap. 7.5). Bei Rizinus konnte anhand des im Freiland untersuchten Tagesganges des Blattwachstums ebenfalls eine Verlagerung des Aktivitätspeaks zur Mitte des Tages hin unter den genannten Temperaturbedingungen festgestellt werden. Auch in der Literatur existieren Berichte über gesteigerte Wachstumsaktivitäten von Sprossorganen, die unmittelbar auf die Behandlung der pflanzlichen Wurzel mit einem Kältepuls folgen (z.B. Lecharny et al. 1985).

Dies legt den Schluss nahe, dass die Ausprägung der Tagesrhythmik in Blatt und Wurzel einer **integrativen regulatorischen Funktion** der Pflanze unterliegt (Kap. 11.3), die die Verteilung von Wachstum zwischen Blättern und Wurzeln auf das jeweils vorherrschende Temperaturregime anpasst: Bei konstanten Temperaturen an beiden Organen folgen beide Wachstumsverteilungen den Grundmustern unter Standardbedingungen. Bei wechselnden Temperaturen an beiden Organen ist die Wurzel in wesentlich stärkerem Ausmaß zu einer Anpassung ihrer Wachstumsaktivität in der Lage als das Blatt. Dieses reagiert in seinem Wachstumsverhalten erst dann auf ein Wechseltemperatur-Regime, wenn eine Wachstumsreaktion der Wurzel ausbleibt.

Hinsichtlich der diurnalen Wachstumsmuster an Blatt und Wurzel gilt zusammenfassend:

*In Blättern tritt auch unter konstanten Aussenbedingungen ein Wachstums-Tagesgang auf; in Wurzeln dagegen nicht. Zwischen beiden Phänomenen bestehen Wechselwirkungen.*

Welcher Art das Signal ist, mit dem die Pflanze die Aktivität der beiden Wachstumszentren aufeinander abstimmt, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht entschieden werden. Prinzipiell sind hydraulische Signale (Yoshida und Eguchi 1991) wie der Turgor oder nicht-hydraulische Signale wie Phytohormone (z.B. Tachibana 1988), pH-Verhältnisse im Xylem (Gerendas und Schurr 1999) sowie die Gehalte von Inhaltsstoffen wie Kohlenhydraten oder Nitrat (Scheible et al. 1997a) speziell diejenigen im Xylemsaft (Schurr und Gollan 1990) dazu in der Lage, eine Rolle für die Spross-Wurzel-Kommunikation zu spielen und auf die Ausprägung des Spross-Wurzel-Verhältnisses Einfluss zu nehmen (Zhang und Forde 2000).

Hydraulischen Signalen wird dabei eine eher transiente Wirkung zugesprochen (Pardossi et al. 1994), was sich mit den Befunden des Turgorvariations-Experimentes der vorliegenden Arbeit deckt (Kap. 7.4 und Kap. 9.4). Von entscheidender Bedeutung könnte auch das Sink-Source-Gefüge der Kohlenhydrate innerhalb der Pflanze sein (Kap. 10 und 11).

Der im Blatt auftretende Tagesrhythmus kann zwar durch die Interaktion mit den übrigen Organen der Pflanze beeinflusst sein; er wird jedoch nicht dadurch verursacht. Untersuchungen an Pflanzen, denen bis auf ein Blatt alle emergenten Blätter entfernt wurden (Kap. 10.5.1) sowie an **isolierten Blattscheiben** (Kap. 10.5.2) zeigen, dass der Wachstums-Tagesgang auf lokal regulierte Ursachen zurückzuführen sein muss.

Blattscheiben werden seit langem als System zur Untersuchung wachstumsregulierender Substanzen genutzt (z.B. Van Volkenburgh und Davies 1983; Nielsen und Ulskov 1992).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass in Blattscheiben derselbe Tagesgang registriert wird, wie in kompletten Blättern an intakten Pflanzen. Auch beim Wechsel in Dauerlichtbedingungen bleibt dieser Tagesgang über lange Zeit hinweg erhalten.

Die Fähigkeit, diesen Tagesgang auszubilden, ist demnach eine **intrinsische Fähigkeit** jedes Flächenelementes innerhalb des Blattes. Anders formuliert: Die Ausbildung des Tagesganges kann nicht durch Faktoren verursacht sein, die von aussen in das Blatt hineintransportiert werden (z.B. Phytohormone). Da die Blattscheiben weiterhin Photosynthese betreiben - sie sind grün und wachsen auch im Trockengewicht weiterhin zu - ist es möglich, dass der Tagesgang durch Kohlenhydrate beeinflusst wird, für deren Konzentrationen auch unter Dauerlichtbedingungen trotz konstanter Assimilation zum Teil noch Tagesgänge gefunden werden (Kap. 7.2.8.2).

Daher kann über den Tagesgang des Blattwachstums folgende Aussage gemacht werden:

*Die Fähigkeit zur Ausbildung eines Wachstums-Tagesganges hängt nicht vom Sink-Source-Gefüge der Pflanze ab, sondern ist eine intrinsische Eigenschaft des Blattgewebes.*

Innerhalb des Blattgewebes könnten jedoch unterschiedliche Tagesgänge des Wachstums von Blattadern und Intercostalfeldern ausgeprägt sein. Durch die Untersuchung der zeitlichen Entwicklung des Mittelrippenanteils konnte gezeigt werden, dass die Blattadern von Rizinus vermutlich einen schwächeren Tagesgang aufweisen als die Intercostalbereiche (Kap. 7.2.4.4).

### 9.1.4 Endogene Rhythmik des Blattwachstums

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, zeigt das Blattwachstum viele wesentliche Charakteristika eines circadianen Ablaufs (Kap. 1.3, Kap. 7.8.1): bei Überführung von Pflanzen in Dauerlicht-Bedingungen läuft der Tagesrhythmus mit einer Periode von etwa 24 h weiter; nur bei Kultivierung der Pflanzen in von der Keimung an konstanten Bedingungen tritt kein Tagesgang auf. Bei 18 h Licht / 6 h Dunkelheit wirkt der Beginn der Nacht als Zeitgeber, der den Rhythmus der Pflanze triggert.

Weitere Kriterien, die erfüllt sein müssen, um das Vorhandensein eines Tagesganges auf einen circadianen Rhythmus zurückführen zu können (Kap. 1.3) konnten im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht untersucht werden. Dennoch kann die Hypothese formuliert werden:

*Der Tagesgang des Blattwachstums stellt einen endogenen, circadianen Rhythmus dar.*

Die diurnale Wachstumsaktivität bestimmter Algen (Familie Laminariales; auch Gattung Porphyra) kann mit Sicherheit als endogener Rhythmus angesehen werden (Lüning 1994; Lüning et al. 1997). In höheren Pflanzen sind circadiane Wachstumsprozesse für Infloreszenzen und Internodien nachgewiesen (Jouve et al. 1998; Jouve et al. 1999; Neily et al. 1997, Ruiz Fernandez und Wagner 1994). Ebenso gelten Circumnutationen von Keimlingen (Schuster und Engelmann 1997) als tagesrhythmische Wachstumsprozesse.

Wichtig für das Zustandekommen der endogenen Rhythmik ist die Existenz einer inneren Uhr der Pflanzen, über deren Natur seit Jahren bei verschiedenen Organismengruppen intensiv geforscht wird (z. B. Kondo und Ishiura 1999). Das üblicherweise als Zeitgeber dienende Lichtsignal wird von den Pflanzen dabei via Phytochrom perzipiert (Satter et al. 1977). Die weiteren Mechanismen, die an der Kontrolle circadianer Rhythmen beteiligt sind, sind im Einzelfall völlig unterschiedlich.

## 9.2 Räumliche Wachstumsmuster

### 9.2.1 Wurzel

In der Wurzel wird eine räumliche Verteilung des Wachstums entlang der Wurzelwachstumszone gefunden, die der in der Literatur zitierten sehr ähnlich ist (z. B. Goodwin und Stepka 1944; Pahlavanian und Silk 1988). Die Wuchsraten sind an der Wurzelspitze sehr niedrig, da sich dort die Zone der Zellteilungen befindet (Esau 1965). Nach Durchlaufen dieser Zone werden die generierten Zellen gestreckt, wobei das Maximum der Zellstreckung - die Zone des stärksten Wurzelwachstums - bei Mais (26 °C) etwa 4 mm hinter der Wurzelspitze liegt (vorbehaltlich des hier erstmalig dargestellten Befundes von zwei getrennten Zonen maximaler Wachstumsaktivität).

Die räumliche Verteilung der Wuchsraten innerhalb der Wachstumszonen wird durch den externen **pH-Wert** nicht beeinflusst (Kap. 6.3.1). Dieses Resultat wird für unterschiedliche pH-Werte in der Literatur bestätigt (Peters und Felle 1999). Die Wachstumsverteilung entlang der Wurzelspitze ist eng mit dem an der Rhizodermis-Oberfläche messbaren pH-Wert korreliert (Pilet et al. 1983; Felle 1998, Peters und Felle 1999), wobei die Zone stärksten Wachstums mit der Zone der stärksten pH-Änderung gegenüber den in der Rhizosphäre vorkommenden pH-Werten übereinstimmt.

Die Temperatur sowie die **externe Nährstoff-Verfügbarkeit** wirkt sich dagegen auf die räumliche Verteilung der Wachstumsaktivität aus, indem die Amplitude der gesamten Verteilung geändert wird (Kap. 6.4 und Kap. 6.2.1). Bei Erniedrigung der Temperatur sowie bei Erhöhung der externen Nährstoff-Verfügbarkeit sinken die Wuchsraten generell an allen Positionen ab. Im Fall der Temperatur wird dieses Ergebnis durch die Literatur bestätigt (Pahlavanian und Silk 1988); die Veränderung bei Variation der externen Nährstoff-Verfügbarkeit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden.

Die **Länge der Wachstumszone** verändert sich in keinem der untersuchten Fälle signifikant. Dies ist keine unabänderbare Eigenschaft der Wurzelwachstumszone. Bei Trockenstress bzw. Veränderung des Boden-Wasserpotentials ergibt sich beispielsweise ein anderes Bild: Hier verringert sich die Länge der Wachstumszone deutlich (Spollen und Sharp 1991, Silk 1992). Dies geht einher mit einer verringerten Empfänglichkeit oder Suszeptibilität des proximalen Endes der Wachstumszone für Expansin (Wu et al. 1996; Wu und Cosgrove 2000). Die Expansinaktivität ist dabei in der gesamten Wachstumszone unter Wasserstress erhöht, was die Aufrechterhaltung der Wuchsrates im apikalen Teil der Wachstumszone mit sich bringt.

Die Länge der Wachstumszone ist darüber hinaus einer **zeitlichen Entwicklung** unterworfen: Sie nimmt in den ersten Tagen der Entwicklung der Pflanzen zu (Beemster und Baskin 1998; Walter et al. 2000) und erreicht dann einen konstanten Plateauwert.

Ein höchst interessantes Detail der Wachstumsverteilung konnte in der vorliegenden Arbeit aufgrund der hohen raum-zeitlichen Auflösung der verwendeten DISP-Methodik erstmals festgestellt werden: **In vielen DISP-Messungen sind zwei voneinander getrennte Wachstumspicks** zu finden, die erst bei Mittelung über genügend lange Zeiten oder über eine gewisse Anzahl von Individuen zu einem einzigen Peak verschmelzen. In keiner bisher publizierten Studie wurde auf eine derartige Zweiteilung des Wachstumsmaximums hingewiesen (für einen Überblick siehe Morris und Silk 1992).

Bei Anzucht von Wurzeln in Wasser ist der apikalere Peak der Wachstumsverteilung stärker ausgeprägt; bei Anzucht in Nährlösung ist der etwas proximaler liegende Peak deutlicher ausgeprägt (Kap. 6.2.1 und Kap. 6.4). Es ist denkbar, dass diese leicht unterschiedliche Wachstumsverteilung eine Struktur- oder Funktionsänderung der Pflanze widerspiegelt. Aufgrund von Befunden der Literatur könnte als Ursache des zweigipfligen Aktivitätsmaximums eine cytologische Eigenheit der Zelldifferenzierungsprozesse innerhalb der Wurzelwachstumszone in Frage kommen, auf die nachfolgend kurz eingegangen wird. Eine mikroskopische Untersuchung des zellulären Aufbaus der Wurzelspitzen aus unterschiedlichen Anzuchten dieser Arbeit konnte leider aus Zeitgründen noch nicht durchgeführt werden.

### Mögliche zelluläre Grundlage des zweigeteilten Aktivitätsmaximums

Entlang der Wachstumszone der Wurzel differenzieren sich Gewebe an unterschiedlichen Positionen und in unterschiedlichen Tiefen des Organs. Die Differenzierung innerhalb der Wurzel schreitet von aussen nach innen fort (Strasburger 1998). Das **Protophloem** wird dabei etwas früher (unmittelbar hinter dem Ende der Zellteilungszone, Esau 1965) angelegt als das **Protoxylem**. Dies wurde für Phloem (Goodwin und Stepka 1944) mit Hilfe anatomischer Untersuchungen gezeigt: hier setzt die Phloembildung auf halber Strecke zwischen der Wurzelspitze und dem Zentrum der Wachstumsaktivität ein; die Xylembildung bei 75 % dieser Streckenlänge. Im Zentrum der Wachstumsaktivität sind beide Gewebetypen klar erkennbar. Die Phloementladung geschieht in der Wurzelspitze direkt in die Zellen der Elongationszone hinein (Farrar et al. 1995). Nimmt man an, dass das Protophloem nicht nur früher angelegt wird, sondern auch seine Funktion näher an der Wurzelspitze aufnimmt als das Protoxylem, dann wäre es aus der **Struktur und Funktion** des beteiligten Gewebeverbandes begründbar, die beiden getrennt voneinander detektierbaren Wachstumspicks den maximalen Streckungszonen von Protophloem und Protoxylem zuzuordnen. Eine Auswirkung des Zelldifferenzierungsprozesses auf die makroskopisch erfassbare Wachstumsverteilung muss dabei nicht unbedingt direkt durch die Streckung der fraglichen Zellen vermittelt werden. Sie könnte auch aus damit verbundenen physiologischen Differenzierungsprozessen der Zellen des umliegenden Gewebes resultieren. Hierfür kommen unter anderem Prozesse der Nährstoff-Versorgung oder der Assimilat-Anlieferung in Frage. In Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe wurde beispielsweise eine analoge Zweiteilung des Aktivitätsmaximums bestimmter Invertasen beobachtet (pers. Mitteilung K. Koch, Gainesville, USA).

Folgt man dieser Argumentation, würde das bedeuten, dass bei Anzucht in Wasser der mit der Ausdifferenzierung des Protophloems assoziierte (apikale) Wachstumspick eine stärkere Aktivität aufweist als bei Anzucht in Nährlösung. Dort ist der Wachstumspick des Protoxylems stärker. Von der physiologischen Beanspruchung her wäre es logisch, dass bei Anzucht in Wasser zur Versorgung der Wurzelspitze mit Nährstoffen das Protophloem stärker und schneller ausdifferenziert wird, als bei Anzucht in Nährlösung, wo die wachsende Wurzelspitze bereits einen großen Teil ihres Nährstoffbedarfs über die Rhizodermis aufnehmen kann und das Phloem vorwiegend dem Eintransport von Kohlenhydraten dient (siehe hierzu auch Kap. 10).

Die Befunde der vorliegenden Arbeit sowie ihre anhand der Literatur durchgeführte Interpretation kann in folgender Hypothese zusammengefasst werden:

*Die zwei getrennt voneinander messbaren Wachstumspicks befinden sich in den Zonen der maximalen Streckung von Protophloem und Protoxylem. Die Differenzierung des Protophloems geschieht bei Nährstoff-Versorgung des Wurzel-Apikalmeristems aus dem Samen heraus schneller als bei direkter Aufnahme von Nährstoffen aus der externen Nährlösung.*

### Maximale Wuchsraten einzelner Zellen

In der vorliegenden Arbeit konnten für Wurzeln Spitzenwerte der Element-Wuchsraten (Stundenmittel) von über 60 %/h detektiert werden. Bei Mittelung über längere Zeiträume und mehrere

Individuen wurden Spitzenwerte von etwa 45 %/h (Wasser) bzw. 35 %/h (Nährlösung) bei 26 °C vier bis fünf Millimeter hinter der Wurzelspitze gemessen (Kap. 6.2.1). Bei einer maximalen Zelllänge von rund 90 µm in der Zone höchster Wachstumsaktivität (Silk et al. 1989) bedeutet dies, dass individuelle Zellen um mehr als 50 µm/h in die Länge wachsen können. Dieser Wert ist mit den Spitzengeschwindigkeiten in den Elongationszonen von Wurzeln anderer Arten sowie von sich verlängernden Wurzelhaaren durchaus vergleichbar (Tab. 9.2). Dies zeigt, dass die Zellen der Wurzel eine gewisse maximale Ausdehnungskapazität besitzen, die sich von Art zu Art nicht sehr stark unterscheidet. Die maximalen Werte von  $V_{\text{Spitze}}$  sowie die Längen der Wachstumszonen unterscheiden sich jedoch wesentlich stärker, was aus der unterschiedlichen Anzahl von Zellen resultiert, die die Wachstumszonen bei verschiedenen Arten aufbauen.

**Tab. 9.2 Wachsraten von Wachstumszonen und einzelnen Zellen**

Länge der Wachstumszone (W.zone): Beim Blatt entspricht dies der Gesamtlänge.  $V_{\text{Spitze}}$ : absolute Längen-Wachsrates der Organe; beim Blatt aus Länge der W.zone und mittlerer, relativer Längen-Wachsrates von 20 %/d errechnet. Maximale (Max.) REGR: Bei der Wurzel max. relative Längen-Element-Wachsrates; beim Blatt max. relative Flächen-Element-Wachsrates (entspricht 2\*relativer Längen-Element-Wachsrates). Max. Zelllänge: Beim Blatt mittlere Zelllänge der Epidermiszelle.  $V_{\text{Zelle}}$ : Bei Wurzel und Blatt max. absolute Längen-Element-Wachsrates.

Organ und Gattung Wurzel	Länge d. W.zone [mm]	$V_{\text{Spitze}}$ [mm/h]	Max. REGR [%/h]	Max. Zelllänge [µm]	$V_{\text{Zelle}}$ [µm/h]	Autor
<i>Zea</i>	10	<b>2,6</b>	45	90	<b>40</b>	Vorliegende Studie
<i>Phleum</i>	1,5	<b>0,2</b>	40	100	<b>40</b>	Brumfield (1942)
<i>Arabidopsis</i>	2	<b>0,4</b>	35	75	<b>25</b>	Beemster und Baskin (1998)
<b>Wurzelhaar</b>						
<i>Arabidopsis</i>					<b>60</b>	Bibikova et al. (1997)
<i>Limnobium</i>					<b>30</b>	Jones et al. (1995)
<i>Sinapis</i>					<b>100</b>	Herrmann und Felle (1995)
<b>Blatt</b>						
<i>Rizinus</i>	60	<b>0,5</b>	Basis: 4 Spitze: 1	Basis: 5 Spitze: 20	<b>0,1</b>	Roggatz (1999)
<i>Tabak</i>	100	<b>0,8</b>	Basis: 4 Spitze: 1	Basis: 10 Spitze: 40	<b>0,2</b>	Walter (1997)
<b>Pollenschlauch</b> <i>Lilium</i>					<b>600</b>	Messerli und Robinson (1997)

### 9.2.2 Blatt

In den Blättern der beiden untersuchten Arten wurden in den untersuchten Entwicklungsstadien stets ausgeprägte **Basis-Spitze-Gradienten** der Wachstumsaktivität festgestellt (Kap. 7.2.4.2). Dieser Befund stimmt mit den Resultaten der Literatur überein (Avery 1933, Poethig und Sussex 1985a, Walter und Schurr 1999). Dieses räumliche Muster resultiert aus der zeitlichen Abfolge der Gewebeanlage des Blattes im Apikalmeristem (Avery 1933, Foster 1936, Poethig und Sussex 1985b, Heckenberger et al. 1998). Apikale Bereiche des Blattes werden zuerst angelegt und ausdifferenziert; basale Bereiche sind demgegenüber in ihrer Entwicklung verzögert. Bei Tabakblättern des untersuchten Entwicklungsstadiums besteht eine zeitliche Entwicklungsdifferenz zwischen Basis und Spitze von etwa vier Tagen (Walter und Schurr 1999).

Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Basis-Spitze-Gradienten während des gesamten Tages vorhanden sind. Zu Zeiten schwach ausgeprägter Wachstumsaktivität schwächt sich dieser Gradient jedoch erheblich ab.

In **isolierten Blattscheiben** bleibt der räumliche Gradient der Wuchsratenverteilung, der zum Zeitpunkt des Ausstechens auf dem Blatt geherrscht hat, auch nach dem Ausstechen der Scheiben erhalten. Dieser Befund stimmt mit Daten der Literatur überein (Ulskov et al. 1992; Nielsen und Veierskov 1990). Der Blattbasis entnommene Blattscheiben werden deutlich größer als Scheiben der Blattspitze; intermediär gelegene Scheiben erreichen intermediäre Größen. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur die Regulation des Wachstums-Tagesganges ein lokaler Prozess ist. Auch die längerfristige zeitliche Entwicklung der Zellstreckungsprozesse (siehe Kap. 1.2), die zum Erreichen der finalen Größe von Gewebestücken des Blattes führt, scheint im Wesentlichen lokal reguliert zu werden und nicht auf den Import von Substanzen aus anderen Bereichen der Pflanze angewiesen zu sein.

#### **Kleinräumige Variationen der Element-Wuchsraten**

Bei DISP-Messungen ist auf einer kleinräumigen Skala eine sehr fleckenhafte Verteilung des Wachstums zu erkennen (Kap. 7.2.4.3). Über die Natur dieser kleinräumigen Variationen kann derzeit lediglich spekuliert werden; aus der Literatur liegt mangels geeigneter Techniken weder ein Hinweis auf die Existenz noch auf die putative Funktion derartiger Wachstumsmuster vor.

Falls diese Fluktuationen nicht durch lokale, transiente Blattaufwölbungen entstehen und real sind, könnten sie eine Rolle beim biomechanischen Abgleich von Wachstumsaktivitäten verschiedener Blattbereiche spielen (siehe hierzu auch Kap. 9.3.2). Ein denkbarer Erklärungsansatz für das Auftreten dieser Fluktuationen könnte auch das fleckenhafte Öffnen und Schliessen von Stomatafeldern sein (Cardon et al. 1994), das via Turgoränderung zu kurzfristigen Wachstumseffekten der beobachteten Art führen kann (Kap. 9.4).

## Maximale Wachsraten einzelner Zellen sowie absolute Längen-Wachsrate des gesamten Blattes im Vergleich zur Wurzel

Bei den Blättern der untersuchten Entwicklungsstadien treten bei beiden Arten an der Basis maximale relative Flächen-Element-Wachsraten von 4 %/h auf (entspricht Längen-Wachsraten von 2 %/h); an der Spitze betragen die maximalen Wachsraten 1 %/h; also etwa einen Faktor vier weniger (Kap. 7.2.4.1). Die Zellgrößen der Blattbereiche unterscheiden sich auch um etwa einen Faktor vier; allerdings in umgekehrter Relation: Die Zellen der stärker zuwachsenden Blattbasis sind kleiner als diejenigen der Blattspitze (Tab. 9.2). Daraus folgt, dass die **absolute Wachsrates der Zellen** an Basis und Spitze in etwa vergleichbar ist. Sie liegt bei Rizinus um 0,1  $\mu\text{m}/\text{h}$ ; bei Tabak aufgrund der größeren Zellen um 0,2  $\mu\text{m}/\text{h}$ . Diese Werte sind etwa um einen Faktor 200 niedriger als die maximalen Elongationsraten von Zellen der Wurzelwachstumszone sowie von Wurzelhaaren. Sie sind um etwa einen Faktor 4000 niedriger als die Spitzenwerte, die im Pflanzenreich (bei Pollenschläuchen von Lilium, siehe Tab. 9.2) erreicht werden.

Die absoluten Längen-Wachsraten der **gesamten Organe** (Tab. 9.2) sind recht gut mit denjenigen der Wurzel vergleichbar: Die im Durchschnitt 10 cm langen Tabakblätter wachsen mit einer mittleren Wachsrates von 40 %/d heran; das heißt, sie verlängern sich mit 20 %/d. Das entspricht einer absoluten Wachsrates ( $V_{\text{Spitze}}$ ) von 0,8 mm/h. Dieser Wert liegt ebenso wie der von Rizinusblättern erreichte (0,5 mm/h) im Rahmen der von Wurzeln verschiedener Arten erreichten Werte.

## 9.3 Nutationen und Krümmungsbewegungen

Rhythmische Bewegungen der wachsenden pflanzlichen Organe wurden mit Hilfe der DISP-Methode (Transversal-Oszillationen der Wurzeln) sowie mit Hilfe klassischer Techniken (Nyc-tinastien und Krümmungsbewegungen der Blätter) analysiert. Auch diese Erscheinungen stellen Wachstumsmuster dar, bzw. werden durch Wachstumsmuster hervorgerufen.

### 9.3.1 Transversal-Oszillationen der wachsenden Wurzelspitze

Sowohl bei Anzucht in Wasser als auch in Nährlösung treten oszillatorische Bewegungen der zum Wachstum in eine Ebene gezwungenen Wurzel auf. In Wasser wurden Periodenlängen von etwa einer Stunde festgestellt (Kap. 6.1.3); in Nährlösung konnten Schwingungen mit Periodenlängen von etwa 10 min festgestellt werden, die zum Teil von Oszillationen einer Periodenlänge von einer Stunde überlagert waren (Kap. 6.2.1).

Für diese Oszillationen ergeben sich aus der veröffentlichten Literatur zwei Erklärungsansätze, die nachfolgend diskutiert werden (nach Johnsson und Heathcote 1973):

- Das *Geotrope Feedback-Modell*. Eine aus der Vertikalen ausgelenkte Wurzel schwingt unter Einwirkung der Schwerkraft über die Senkrechte hinaus. Die Transversal-Oszillationen wären also eine **gravitropische** Antwort auf die Orientierung der Wurzel im Rhizotron
- Das *Interne-Oszillator-Modell*. Endogene **circumnutatorische** Bewegungen verursachen die Transversal-Oszillationen.

### **Das geotrope Feedback-Modell**

In der vorliegenden Arbeit tritt bei den untersuchten Wurzelwachstumszonen eine maximale transversale Auslenkung von 2 mm auf (Kap. 6.1.3). Die Grundplatte des Rhizotrons weist einen Inklinationwinkel von  $68^\circ$  auf, die Wurzeln sind also um  $22^\circ$  aus der Vertikalen ausgelenkt.

Bei einer vergleichbaren Auslenkung aus der Vertikalen wird in der Literatur über eine gravitropische Reaktion von gleicher Intensität bei Mais berichtet, deren Zustandekommen durch das geotrope Feedback Modell erklärt wird (Barlow et al. 1993). Da die Wurzeln im verwendeten Rhizotron-Aufbau nie zurück in die Senkrechte gelangen können, ist eine andauernde gravitropische Reaktion denkbar, die sich aufgrund der Geometrie des Aufbaus in Oszillationen senkrecht zur Wachstumsrichtung, aber in der Ebene des Rhizotrons äußern würde. Dies spricht für eine Erklärung der Transversal-Oszillationen durch das geotrope Feedback Modell.

Es ist allerdings fraglich, ob eine andauernde gravitropische Reaktion zustande kommen kann, wenn ein ‚Überschwingen‘ der senkrechten Soll-Lage der Wurzeln durch die Geometrie des Aufbaus nicht möglich ist.

Das Zustandekommen von dauerhaften oszillatorischen Bewegungen in einer Ebene, die sogar zu einer persistierenden Wellenform von ausgewachsenen Teilen der Wurzel führen, wird aus Studien an Arabidopsis berichtet (Okada und Shimura 1990, Simmons et al. 1995, Mullen et al. 1998). Diese Erscheinung ist eine Folge der Überlagerung gravitropischer, circumnutatorischer und thigmomorphogenetischer (siehe Kap. 11.1) Effekte und hängt von der Ausprägung des Inklinationwinkels ab, in den die Wurzeln während ihres Wachstums (Anzucht auf Agarplatten) gezwungen werden.

Ein weiteres Argument für die Erklärung der Transversal-Oszillationen durch Gravitropismen hängt mit der Veränderung der Oszillationsfrequenzen durch die externen Nährstoff-Verfügbarkeiten zusammen. Es ist bekannt, dass die biophysikalische Regulation von Tropismen durch differentielles Wachstum unterschiedlicher Regionen der Wachstumszone geschieht (z.B. Buff et al. 1987). Die verstärkte Expression von Genen für Ionentransporter spielt dabei eine wichtige Rolle für die Verstärkung von lateralen Wachstumseffekten. Dies ist in der Literatur kürzlich speziell für die Rolle von Kaliumkanälen bei der Regulation von Gravitropismen gezeigt worden (Phillipar et al. 1999). Eine Veränderung der Frequenz der Bewegung durch die externe Nährstoffionen-Verfügbarkeit erscheint also durchaus plausibel.

### **Das Interne Oszillator-Modell**

Circumnutationen existieren auch bei Wurzeln (z.B. Head 1965, Ney und Pilet 1981, Antonsen et al. 1995). Sie werden von gravitropischen Reaktionen zwar beeinflusst, kommen aber unabhängig davon zustande, wie Studien in Schwerelosigkeit zeigten (Hasenstein 1991, Antonsen et al. 1995). Circumnutationen können von Gravitropismen experimentell gut unterschieden werden, indem die Calyptra entfernt wird (Pilet 1971). Sie enthält die Gravitations-Sensoren der Wurzel (Statolithen); nach ihrer Entfernung treten keine gravitropischen Reaktionen mehr ein.

Gerade für Maiswurzeln sind Circumnutationen gut untersucht (z.B. Shabala und Newman 1997a). Es konnte hier das Auftreten von Oszillationen zweier verschiedener, sich überlagernder

Frequenzen gezeigt werden (7 und 90 min), deren Periodenlängen mit den in der vorliegenden Arbeit für Transversal-Oszillationen festgestellten (12 und 55 min) in etwa übereinstimmt. Die festgestellten Frequenzen sprechen also durchaus für eine Erklärung durch das interne Oszillator-Modell.

In zeitlicher Korrelation zu den in der Literatur festgestellten Circumnutationsfrequenzen für Maiswurzeln konnten Frequenzen des Austauschs von Protonen und Calcium-Ionen mit der umgebenden Nährlösung an Hand von Mikroelektroden-Fluss-Messungen detektiert werden (Shabala und Newman 1997a). Diese Messungen führten zu einem Modell, das die Wurzel-Circumnutationen durch die Ausbreitung von Wachstumswellen um den Querschnitt der Wurzel herum beschreibt (Shabala und Newman 1997b). Die Wachstumswellen werden in diesem Modell von Ionenflüssen aus der externen Nährlösung heraus begleitet. Ob die Ionenflüsse die Ursache oder eine Folge der Bewegungserscheinungen sind, wird im beschriebenen Modell nicht diskutiert. Es ist denkbar, dass eine oszillierende Wachstumsaktivität an einer Flanke der Wurzel durch die damit verbundene oszillierende Intensität der Dehnung von Membranen auf die Aktivität von Ionenkanälen einwirkt (Cosgrove und Hedrich 1991) und so pulsierende Ionenflüsse generiert. Genauso ist es jedoch denkbar, dass die zeitliche Synchronisation von Ionenkanalaktivitäten diese Wachstumserscheinungen erst hervorruft.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde während der Anzuchten in Wasser die natürlicherweise gegebene Möglichkeit des Ionenflusses aus der Nährlösung in die Wurzelwachstumszone hinein unterbunden. Da unter diesen Bedingungen das Auftreten der Oszillation mit der kürzeren Periodenlänge unterdrückt wurde und da die Korrelation zwischen Ionenflüssen und Circumnutationsfrequenzen in der Literatur dokumentiert ist, spricht auch dieser experimentelle Befund für eine Erklärung der beobachteten Transversal-Oszillationen durch das interne-Oszillator-Modell.

### **Zusammenhang von Transversal-Oszillationen und externer Nährstoff-Verfügbarkeit**

Unabhängig davon, ob die beobachteten Transversal-Oszillationen nun als Gravitropismen oder Circumnutationen oder als Überlagerung beider Bewegungsarten zu deuten sind, propagieren die neueren Untersuchungen hinsichtlich beider Modelle eine Reaktion der Frequenz auf die Veränderung der Ionenaustausch-Verhältnisse mit der Umgebung. Der in der vorliegenden Arbeit erstmals ermittelte Befund, dass die Frequenz der Transversal-Oszillationen von der externen Nährstoff-Verfügbarkeit abhängt, legt daher folgenden Schluss nahe:

*Die Frequenz der Transversal-Oszillationen könnte ein optisch detektierbares Merkmal darstellen, das mit der Aufnahmekinetik von Ionen in die Wurzelwachstumszone hinein verbunden ist.*

Falls sich diese Hypothese bestätigen würde, wäre die DISP-Vermessung der Wachstumsdynamik von Wurzeln auch bei der Analyse von Ionenaustauschprozessen und Nährstoffaufnahme-Kinetiken ein wertvolles diagnostisches Hilfsmittel.

Die Korrelation von **Ionenflüssen** an der Oberfläche der Wurzelspitze und **Wachstumsercheinungen** wird auch durch zwei andere Befunde der Literatur unterstrichen:

Bei wachsenden Wurzeln treten um die Spitze herum starke Oszillationen der **elektrischen Potentialdifferenz** auf, deren Amplitude mit der **Wachstumsaktivität** des untersuchten Organs korreliert (Buff et al. 1992). In verschiedenen Arten (*Lepidium*; *Phaseolus*) wurden dabei Oszillations-Periodenlängen von etwa 10 min gemessen (Souida et al. 1990).

Der **Elektrotropismus** von Wurzeln (Brauner und Bünning 1930) steht ebenfalls mit Ionenflüssen über die Oberfläche der Wachstumszone hinweg in Verbindung: Wurzeln wachsen üblicherweise auf negativ geladene Flächen zu (Koleoptilen auf positive). Die **Richtung des Wachstums** hängt also stets vom umgebenden elektrischen Feld ab. Dieses wird wiederum von der wachsenden Wurzel selbst beeinflusst, da die Wurzelwachstumszone aufgrund der an ihren Oberflächen stattfindenden Ionenflüsse elektrische Dipol-Eigenschaften hat (Weisenseel et al. 1979, Toko et al. 1987).

Eventuell hängen die in der vorliegenden Arbeit festgestellten, räumlich separierten Maxima der Depositionsratenverteilung von Anionen und Kationen (Kap. 6.2.2) mit dem Dipolcharakter der Wurzel zusammen. Wie jedoch bereits erwähnt wurde, kann anhand der ermittelten Daten aufgrund der Vernachlässigung zu vieler anderer Inhaltsstoffe (z.B. Proteine) nichts über die Elektroneutralität von Flüssen in der Wurzelspitze ausgesagt werden.

### 9.3.2 Nyctinastien der Blätter

Auch in den untersuchten Blättern treten Wachstumsmuster auf, die mit einer Krümmung des Organs verbunden sind. Die prominentesten und im Kontext der vorliegenden Arbeit bedeutendsten sind die Nyctinastien. Auch sie scheinen, wie der Tagesgang des Blattwachstums, einer endogenen, circadianen Rhythmik zu unterliegen (Kap. 7.8.1). Das Unterdrücken nyctinastischer Bewegungen hat bei *Rizinus* eine Wachstumsreduktion während der Nacht zur Folge (Kap. 7.3.1). Durch das Anlegen adäquater Zugkräfte kann diese Reduktion wieder ausgeglichen werden. Dieser Befund ist von entscheidender Bedeutung für die Aussagekraft der DISP-Analysen, da einerseits für das Funktionieren der Methode Bewegungen der zu untersuchenden Blätter verhindert werden müssen, andererseits aber möglichst natürliche Wachstumsmuster beobachtet werden sollen.

Die meisten in der Literatur beschriebenen nyctinastischen Blattbewegungen (siehe hierzu Satter und Galston 1981) stellen turgorgesteuerte, circadiane Bewegungen eines Flexor-Extensor-Systems dar, wie etwa die Auf- und Abklapp-Bewegungen der Blätter von *Phaseolus* (z.B. Bünning und Moser 1966). Diese Bewegungen sind jedoch nicht mit einem Organwachstum verbunden. Die Lageveränderung des Organs resultiert aus einer Drehung um einen Punkt; die dreidimensionale Form der Blattoberfläche ändert sich nicht.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Nyctinastien von Tabak und *Rizinus* erfassen im Gegensatz dazu das gesamte zuwachsende Organ (Kap. 7.2.2); während der Bewegung ändert sich die Wölbung der gesamten Blattfläche. Da die Unterbindung der Nyctinastien vor allem das

Wachstum der Blattader beeinflusst (Rizinus: Kap. 7.3.1; Tabak: Kap.7.10), ist zu vermuten, dass für das Zustandekommen dieses Phänomens die Wachstumseigenschaften der Ader sowie ihr histologischer Aufbau (Gewebespannungen; Kap. 11.1) von entscheidender Bedeutung sind.

Aus der Literatur ergibt sich, dass **die Synchronisation von Wachstum entlang der verschiedenen Seiten** für das koordinierte Wachstum eines zylindrischen Organs wie etwa der Blattader von grosser Bedeutung ist:

Bei Einzelzellen von Bohnen und Hafer wurde gezeigt, dass zelluläre Wachstumsprozesse nicht gleichmäßig ablaufen, sondern durch eine regelmäßige Abfolge von Ausdehnungs- und Ruhezuständen zustande kommen (Lockhart 1967, Cleland 1968). Diese Abfolge führt zu einer aus vielen Stufen bestehenden Zeitreihe des Wachstums von Einzelzellen. In komplexen Gewebeverbänden oder Organen besteht die Notwendigkeit, dieses sprunghafte Verhalten des Wachstums der Einzelzellen zu synchronisieren, um das Wachstumspotential des gesamten Organs möglichst effektiv auszuschöpfen (Johnsson und Heathcote 1973). Für wachsende zylindrische Organe wie Sprossachse, Hypokotyl und Wurzel wird angenommen, dass die effizienteste Form der Synchronisation die Ausbildung eines Wachstumsmusters ist, das zu Circumnutationen des betrachteten Organs führt: Ein Wachstumspuls kontinuierlicher Aktivität umläuft den Umfang des zylindrischen Organs. Dabei erfahren Zellen an **gegenüberliegenden Seiten** Wachstumspulse mit **genau gegeneinander versetzter Phasenlage**.

Falls dieses Modell auch auf das nyctinastische Wachstum von Blattadern anwendbar ist, würde das bedeuten, dass eine Fixierung in die Horizontale den Synchronisationsmechanismus um so stärker stören würde, je stärker sich die Ader krümmt. Dies deckt sich mit dem experimentell ermittelten Befund: Eine nyctinastische Krümmung der Blätter erfolgt etwa vom Tag-Nacht-Übergang bis zum Nacht-Tag-Übergang; die Wachstumsreduktion beginnt am Anfang der Nacht, erreicht ihr Maximum in der Mitte der Nacht und ist am Ende der Nacht wieder geringer ausgeprägt. Während des Tages ist keine Krümmungsbewegung und keine Wachstumsreduktion feststellbar.

Auch die **Aufhebung dieses Effekts durch das Anlegen einer externen Zugkraft** könnte mit Hilfe dieser Argumentation erklärt werden: Sofern ein gewisser Schwellwert überschritten wird, könnte es durch die externe Zugkraft zu einer **gleichphasigen Synchronisation** der Zellen gegenüberliegender Flanken kommen.

Die obige Argumentation kann in folgender Hypothese zusammengefasst werden:

*Die normalerweise während nyctinastischer Bewegungen auftretenden, phasenverschobenen Kräfte an gegenüberliegenden Organflanken dienen der Synchronisation des Wachstums. Die Synchronisation kann jedoch auch durch eine genügend große, linear einwirkende externe Zugkraft erfolgen.*

Ein analoger biomechanischer Synchronisationsmechanismus könnte für die heterogene kleinräumige Verteilung von Wuchsraten in den **Intercostalfeldern** (Kap. 7.2.4.3) verantwortlich sein.

### 9.3.3 Weitere rhythmische Krümmungsbewegungen der Blätter

Neben den Nyctinastien wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit noch zwei weitere Wachstumsmuster beobachtet, die mit diesen in Zusammenhang stehen könnten:

Der **Inklinationswinkel**, unter dem die Blätter an der Sprossachse stehen, verändern sich auf einer Zeitskala von mehreren Tagen (Kap. 7.2.2). Das Blatt wird dabei allmählich von einer vertikalen in eine horizontale Stellung gekippt. Diese Art von Bewegung wird **Epinastie** genannt und ist eine Konsequenz der stimulierten, Ethylen-induzierten Wachstumsaktivität auf der Blattoberseite (Else und Jackson 1998). Es ist nicht bekannt, ob der zu Epinastien führende Wachstumsmechanismus sich auf die Regulation von Nyctinastien auswirkt; die Amplitude der Nyctinastien nimmt jedoch ab, je stärker die mittlere Blattinklination sich der Horizontalen nähert.

**Blattbewegungen mit einer Periodenlänge von etwa 2 h** konnten unter Dauerlichtbedingungen bei *Rizinus* detektiert werden (Kap. 7.8.1). Bei Wechsellichtbedingungen waren diese Bewegungen in der Nacht als Überlagerungen der wesentlich intensiveren Nyctinastien zu erkennen; während der Lichtphase konnte lediglich eine kleine, unregelmäßige Orientierungsänderung der Blätter registriert werden.

Bei diesen Bewegungen handelt es sich um sogenannte ‚*Heliotropismen*‘ (Darwin 1880, Herbert 1992), die unter natürlichen Verhältnissen für eine circumnutatorische Bewegung der Blätter um die sich ständig verändernde Richtung des Lichteinfalls führen. Die auftretende Periodenlänge liegt im gleichen Bereich wie Periodenlängen anderer Pflanzen (z.B. *Stellaria media* 90 min, Jiang und Staude 1989).

Diese Periodenlängen stimmen darüber hinaus in etwa mit **Circumnutations-Periodenlängen** von Keimlingshypokotylen überein (z.B. Erbse: 80 min; Galston et al. 1964; Phaseolus: 100 min; Heathcote 1966). Auch die Periodenlängen von Circumnutationsbewegungen rankender Pflanzen (*Sycos* 50 min; Gradmann 1922, Caré et al. 1998) sowie von Wurzeln (Mais: 50 min; Kap. 9.3.1; 90 min; Shabala und Newman 1997a) weisen vergleichbare Werte auf. Für viele derartige Nutationsbewegungen konnte in der Literatur zudem noch eine Überlagerung durch Nutationsbewegungen kleinerer Periodenlänge; sogenannter ‚Mikronutationen‘ gezeigt werden (Heathcote 1966, Kristie und Joliffe 1986).

Alle genannten **Nutationsprozesse** verlaufen **endogen rhythmisch**; die Ausbildung von Circumnutationen des Hypocotyls gehört sogar zu den ersten endogen-rhythmischen Erscheinungen, die in der Ontogenese einer Pflanze etabliert werden (Dowson-Day und Millar 1999).

In der Literatur wird aufgrund der Einheitlichkeit der zeitlichen Dynamik dieser Bewegungsprozesse bei verschiedenen Organen in verschiedenen Pflanzen darüber spekuliert, dass die **Periodenlänge der Prozesse die Zeiteinheit der inneren Uhr der Pflanzen** widerspiegelt (Koukari et al. 1997). Sollte dies zutreffen, könnte die DISP-Methodik, bzw. eine automatisierte Bildanalyse der dreidimensionalen Blattbewegungen (z.B. mit Hilfe des Streifenlichtprojektor-Aufbaus) ein wichtiges Hilfsmittel der Chronobiologie werden.

## 9.4 Reaktionen auf dynamische Änderungen externer Bedingungen

### 9.4.1 Wurzel

Änderungen verschiedenster Umweltparameter können auf einer sehr kleinen Zeitskala Veränderungen des Wurzelwachstums induzieren (z.B. Frensch und Hsiao 1994; Peters und Felle 1999). Sehr wenig ist allerdings bisher über die zeitliche Dynamik sowie die Regulation dieser Veränderungen bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnten bei Änderungen von externen Parametern dynamische Wachstumsreaktionen quantitativ erfasst werden. So reagierte die Wurzel binnen weniger Minuten in der oben für statische Verhältnisse bereits beschriebenen Weise (Kap. 9.2.1) mit einer Änderung ihrer Wachstumsintensität auf Änderungen sowohl der **Temperatur** (Kap. 6.4) als auch der **Nährstoff-Verfügbarkeit** (Kap. 6.2.1).

Das Zustandekommen dieser dynamischen Änderungen kann durch verschiedene Mechanismen reguliert werden:

Bei Erhöhung der **Wurzeltemperatur** findet eine Steigerung von  $V_{\text{Spitze}}$  statt. Wie in der Literatur klar gezeigt wird, sinkt dabei der Turgor in der Wachstumszone ab (Pritchard 1990). Dieses Resultat ist verwirrend, da aufgrund des Lockhart-Modells (Kap. 1.3) eine Turgorsenkung mit einer Verringerung der Wachstumsaktivität verbunden sein sollte. Denkbare Regulationsmechanismen, die dennoch zu einer Steigerung der Wachstumsaktivität führen könnten, sind beispielsweise eine zunehmende Erweichung der Zellwand sowie eine Absenkung der Wirkungsschwelle der Zelldehnung (Yield threshold). Ein weiterer denkbarer Regulationsmechanismus, der auf biochemischer Ebene lokalisiert ist, folgt aus der Argumentation von Kap. 9.2.1 über die Korrelation zwischen dem apikalen Wachstumspeak und der Funktion des Protophloems. Die im Anschluss an die Temperaturerhöhung festgestellte exorbitante Steigerung der Wachstumsaktivität im apikalen Peak könnte man dahingehend interpretieren, dass eine verstärkte Phloementladung (über ein biochemisch vermitteltes Signal) wesentlich zur Steigerung der Wachstumsintensität in dieser Situation beiträgt. Aufgrund fehlender Messungen sowie Berichten der Literatur müssen diese Überlegungen jedoch rein spekulativ bleiben.

Bei erhöhter **externer Nährstoff-Verfügbarkeit** kommt es zu einer Absenkung der Wachstumsintensität. Da diese Reduktion – zumindest unter statischen Verhältnissen – mit einer Zunahme der Masse der Wurzelwachstumszone einhergeht (Kap. 6.2.3), bleibt der Nettozuwachs der Wurzel (die Biomasse-Deposition) jedoch gleich. Die Wurzel hält also ihr Wachstum auf einem konstanten Niveau; zumindest, solange sie auf ein ausreichendes Reservoir an Nährstoffen aus dem Samen zurückgreifen kann. Die Änderung des Wachstums ist in diesem Fall auf unterschiedliche Investitionen der Biomasse in Längen- bzw. Dickenwachstum zurückzuführen. Bei ungünstiger externer Nährstoff-Verfügbarkeit tritt ein verstärktes Längenwachstum ein, das es der Wurzel ermöglicht, neue und potentiell günstigere Bereiche des Substrates schneller zu erschließen. Wie eine Bestimmung der Spross-Wurzel-Verhältnisse (nur unter statischen Bedingungen möglich; Kap. 6.2.1) zeigt, wirkt die Regulation der Wachstumsänderung dabei auf den Spross ein; das Spross-Wurzel-Verhältnis steigt bei Erhöhung der Nährstoff-Verfügbarkeit an.

Der wichtigste, in der Literatur hierfür diskutierte Regulationsmechanismus wird durch eine **Akkumulation von Nitrat im Spross** vermittelt (Scheible et al. 1997a). Diese Akkumulation beeinflusst den Metabolismus vieler weiterer Substanzen, wie etwa organischer Säuren und Aminosäuren, was zu einer vielfältigen Kontrollmöglichkeit der Ausprägung von Wachstumsmustern führt. Nitrat wirkt auch regulatorisch auf die Ausbildung von Seitenwurzeln und damit auf das Spross-Wurzel-Verhältnis ein, wobei die Seitenwurzelbildung durch eine Erhöhung von Nitrat sowohl gehemmt als auch gefördert werden kann (Zhang und Forde 2000).

Die Auswirkungen einer Veränderung des **externen pH-Wertes** konnten in der vorliegenden Arbeit leider nur anhand eines statischen Experimentes untersucht werden. Dieses zeigte in einem weiten Bereich von pH-Werten keine Änderung der Wachstumsintensität der untersuchten Wurzeln (Kap. 6.3.1).

Aus Arbeiten der Literatur ist zu erwarten, dass eine pH-Änderung jedoch zumindest einen transienten Einfluss auf die Wachstumsdynamik der Wurzelspitze gehabt hätte (Schopfer 1989, Yan et al. 1998). Aufgrund der acid-growth-Theorie wäre bei tiefen externen pH-Werten eigentlich eine Erhöhung der Wachstumsaktivität zu erwarten. Die meisten publizierten Studien hierzu wurden jedoch an isolierten Gewebestücken durchgeführt (z.B. Edwards und Scott 1974, Virk und Cleland 1988). Intakte Wurzeln können den pH-Wert des Apoplasten durch verschiedenste Mechanismen, wie etwa eine Veränderung von ATPase-Aktivitäten (Yan et al. 1998) oder eine Veränderung des gesamten ionalen Milieus (Gerendas und Schurr 1999), wesentlich besser als isolierte Gewebestücke gegen das Aussenmedium abpuffern. Dadurch minimiert sich die zu erwartende kurzfristige Reaktion des Wachstums auf eine Änderung des pH-Wertes erheblich.

#### 9.4.2 Blatt

Auch beim Blatt wurde die Änderung einer Reihe von externen Parametern im Hinblick auf ihre Auswirkung auf die Wachstumsdynamik untersucht.

Die Auswirkung eines **abrupten Lichtwechsels** konnte bereits unter Standard-Anzuchtbedingungen und daher mit einer hohen Anzahl von Replikaten sowohl für Blätter von Rizinus als auch von Tabak untersucht werden (Kap. 7.2.4.1). Am Tag-Nacht-Übergang sowie am Nacht-Tag-Übergang traten dabei **kurzfristige Oszillationen der Wachstumsamplitude** ( $< 1$  h) auf. Bei Abdunkelung konnte ein rascher Anstieg der Wuchsrates des gesamten Blattes, gefolgt von einem nahezu exponentiellen Abklingen bis unterhalb der zuvor bestehenden Wuchsrates beobachtet werden; in der Folge stieg die Wuchsrates wieder sigmoidal auf den ursprünglichen Wert an. Beim Einschalten des Lichtes konnten gegensinnige Erscheinungen beobachtet werden. Die exponentiellen Flanken des Vorgangs konnten recht gut angefitet werden, wobei Abklingzeiten von etwa 20 min für den Wachstumspeak bei Abdunkelung errechnet wurden. Ein exponentieller Fit wurde gewählt, da bei Einzelzellen nachgewiesen ist, dass sie nach Auslenkung aus ihrem Wachstums-Gleichgewichtszustand diesen mit exponentieller Kinetik wieder anstreben (Cosgrove 1981). Auch bei den untersuchten Wachstumserscheinungen beschrieb ein exponentielles Modell den Sachverhalt sehr gut.

Vergleichbare kurzfristige Oszillationen der Wachstumsamplitude werden auch in der Literatur berichtet (z.B. Heckenberger 1997, Schnyder und Nelson 1988, Shackel et al. 1987, Christ 1978b). Die beiden wahrscheinlichsten Ursachen für diese Erscheinungen sind:

- a) Änderung der **Druckverhältnisse** im Blatt, bedingt durch das Schliessen bzw. Öffnen der Stomata.
- b) Änderung der **pH-Verhältnisse** im Apoplasten (Mühling et al. 1995). Da das Wirkungsmaximum von Expansin bei pH 4,5 liegt, muss jede pH-Änderung im Apoplasten, der üblicherweise einen pH von etwa 5,5 hat, einen Einfluss auf die Expansibilität und damit auf die registrierte Wachstumsrate haben.

Aus der Literatur ist bekannt, dass bei Abdunkelung eine Erhöhung des **Turgors** im Blatt eintritt, die zu einer transienten Steigerung der Blatt-Expansionsrate führt (Shackel et al. 1987). Nachfolgend wird der Turgor auf einem höheren Wert gehalten; die Blatt-Expansionsrate sinkt jedoch rasch wieder auf den Ausgangswert ab. Auch Änderungen der Luftfeuchte wirken sich in kurzfristigen Peaks der Expansion aus. In der entsprechenden Studie wird keine Abklingzeit des Peaks angegeben; den Abbildungen kann jedoch ein Wert von etwa 10 min entnommen werden.

Bei abrupten Lichtwechseln treten in Blättern Änderungen des **apoplastischen pH-Wertes** auf (Mühling et al. 1995). Beim Ausschalten von Licht sinkt der pH in *Vicia faba* zunächst für etwa 10 min ab (um bis zu 0,6 Einheiten von pH 5,7 auf pH 5,1); dann steigt er mit einer wesentlich geringeren Rate wieder an. Bei Licht-Einschaltprozessen ergibt sich das umgekehrte Bild. Aufgrund der pH-Abhängigkeit der Expansin-Aktivität wäre bei einer Abdunkelung zunächst mit einer Erhöhung der Zellwanderweicheung während der anfänglichen pH-Absenkung und damit einer gesteigerten Wachstumsrate zu rechnen. Im Anschluss würde sich der allmählich wieder ansteigende pH hemmend auf die Expansinaktivität und damit auch auf die Wachstumsrate auswirken.

Die zeitliche Ausprägung dieser pH-Variationen könnte sich also über die Wirkung von Expansin tatsächlich in dem beobachteten Wachstumsmuster auswirken.

Nicht nur pH-Werte, sondern auch Membranpotentiale zeigen eine rasche transiente Antwort auf Ein- und Ausschaltvorgänge von Licht, die durch die Wirkung verschiedener Ionenkanäle vermittelt wird (Elzenga et al. 1995, Shabala und Newman 1999).

Die Tatsache, dass nicht in jedem durchgeführten Experiment, sondern nur bei etwa 80 Prozent aller untersuchten Fälle derartige zeitliche Oszillationen festgestellt wurden, legt den Schluss nahe, dass die Erscheinungen vermutlich nicht hydraulisch durch das Schliessen bzw. Öffnen der Stomata hervorgerufen werden. Dieses tritt mit hoher Wahrscheinlichkeit in jedem derartigen Experiment ein. Da die untersuchten Blätter stets auch im Minimum ihres Wachstums-Tagesganges noch eine nennenswerte Wachstumsaktivität aufwiesen, hätte jede Steigerung des Turgors sich gemäß der Lockhart-Gleichung auch in einer Steigerung der Wachstumsrate niederschlagen müssen.

Eine apoplastidäre pH-Änderung ist als wahrscheinlichere Ursache anzusehen. Sie ist, wie im vorigen Abschnitt beschrieben wurde, von verschiedensten Faktoren abhängig. Darüber hinaus ist die am Tag-Nacht-Übergang vorliegende Expression des Expansin-Gens so gering (Kap. 7.2.6.1), dass eine pH-Änderung durchaus oft nur zu geringen Änderungen im Wachstum führen könnte.

Kurzfristige Wachstumsspeaks mit Abklingzeiten von etwa 15 min konnten in der vorliegenden Arbeit auch nach Erhöhung des **Wurzeldrucks** festgestellt werden. Diese transiente Reaktion (Schmundt et al. 1998) ist eine elastische Volumenveränderung (Zhu und Boyer 1992), die mit Sicherheit durch Änderung der **Turgorverhältnisse** hervorgerufen wird und darf daher eigentlich nicht als Wachstumseffekt klassifiziert werden.

Vergleichbare kurzfristige Wachstumseffekte mit Abklingzeiten von 10 bis 30 min treten auch bei anderen massiven Störungen der externen Wachstumsbedingungen auf; wie z.B. beim Sauerstoffentzug in Keimlingshypokotylen von Lupinen (Penny et al. 1974).

Dies zeigt, dass die eigentlich interessante Tatsache nicht die Änderung der Wuchsrates ist (die oft ohnehin nur einen elastischen Volumeneffekt darstellt), sondern die Abklingzeit des Phänomens. Die Abklingzeit gibt ein Maß dafür an, wie die pflanzliche Zellwand auf die externe Störung reagieren kann. Bei kurzen Abklingzeiten besteht im Apoplasten ein hohes Potential zur Re-Etablierung der Ausgangssituation; lange Abklingzeiten zeigen eine verminderte Kompensationsfähigkeit an. Daher kann folgende Hypothese aufgestellt werden:

*Die Fähigkeit zur Re-Etablierung von Wachstumszuständen ist eine Zellwandeigenschaft, die durch Abklingzeiten von kurzfristigen Wachstumsspeaks gemessen werden kann.*

In der Literatur wird diskutiert, ob die **Signalperzeption** für derartige, kurzfristige Wachstumsspeaks nicht in den wachsenden Blättern, sondern in den source-Blättern geschieht (Christ 1978b). Nach den Befunden der vorliegenden Arbeit ist dies zumindest für *Rizinus* nicht möglich, da hier auch nach Entfernen der source-Blätter derartige Peaks gefunden werden (Kap. 7.11).

Bei kurzfristigen Änderungen der externen Lichtbedingungen wird in **isolierten Blattscheiben** eine längere Abklingzeit beobachtet (40 min) als in der kompletten Pflanze (Kap. 7.12). Dies deutet darauf hin, dass die Reaktionsfähigkeit der pflanzlichen Zellwand eine Eigenschaft darstellt, die auf intakte Sink-Source-Beziehungen innerhalb der Pflanze angewiesen ist. Es könnte jedoch auch sein, dass die veränderten Verhältnisse der Wasserversorgung bzw. der osmotischen Regulation in den isolierten Blattscheiben zu einer erhöhten Trägheit der Reaktion führen.

Bei Änderung anderer externer Parameter werden **Wachstumsreaktionen einer geringeren zeitlichen Dynamik** festgestellt.

So tritt bei **Veränderung der Temperaturverhältnisse** eine Verlagerung des Wachstumsmaximums um mehrere Stunden gegenüber den Verhältnissen unter Standard-Anzuchtbedingungen auf (Kap. 7.5). Die Wurzel zeigt hierbei wesentlich dynamischere Wachstumsänderungen als das Blatt, dessen Wachstumsreaktion stark von der differentiellen Verteilung der Temperatur an Spross und Wurzel abhängt. Dieser Befund wurde bereits ausführlich diskutiert (Kap. 9.1.3).

Bei **Trockenstress** zeigt sich eine allmähliche Minderung der Wachstumsaktivität (Kap. 7.6), die zu keinem Zeitpunkt eine besonders ausgeprägte Reaktion aufweist: Die Phasenlage des Tagesganges wird nicht verändert. Dies stimmt mit Befunden der Literatur überein (Heckenberger 1996, Schurr et al. 2000). Aus der Literatur ist ferner bekannt, dass das Blatt intensiver auf eine Trockenstress-Situation reagiert als die Wurzel (Sharp et al. 1988, Hsiao und Xu 2000). Diese zeigt in statischen Experimenten eine gegenüber dem Blatt nur gering verminderte Wachstumsrate, was sich in der Absenkung des Spross-Wurzel-Verhältnisses niederschlägt.

Auch bei einer **Änderung des Nährstoff-Angebotes** zeigt sich im Blatt (Kap. 7.7) eine wesentlich langsamere Reaktion als in der Wurzel. Bei einer Verminderung des Nährstoff-Angebotes sinkt die Wachstumsrate über Tage hinweg allmählich ab, wobei die Phasenlage des Tagesganges nicht beeinflusst wird. Im Anschluss an eine Nährstoff-Addition kommt es zunächst zum Absinken der Wachstumsrate. Nach etwa drei Stunden beginnt diese dann wieder zu steigen und erreicht etwa 12 h nach Nährstoff-Zugabe ein Maximum. Die Phasenlage des Wachstumstagesganges wird dabei um 180 Grad verschoben. Der zeitlich limitierende Faktor, der eine Re-Etablierung der Wachstumsrate durch die an der Wurzel aufgenommenen Nährstoffe verzögert, kann dabei nicht der Fernstreckentransport des Xylems sein (etwa 1 m/h; Nultsch 1996), sondern muss im Metabolismus der Pflanze oder im intra- bzw. interzellulären Transport zu suchen sein.

## **10 Inhaltsstoff-Verteilungen und Wachstumsmuster**

In der vorliegenden Arbeit wurden in einer ausserordentlich vielgestaltigen Art und Weise Inhaltsstoffverteilungen in verschiedenen wachsenden Organen unter verschiedensten Aspekten untersucht, um dem komplex-integrativen Charakter der Zusammenhänge zwischen Inhaltsstoffen und Wachstum gerecht werden zu können. In der Literatur erfolgt meist nur die Analyse einzelner der hier vorgestellten Aspekte. Dies führt zwar einerseits zu größerer Klarheit der Aussage hinsichtlich der untersuchten Fragestellung, vergrößert aber andererseits die Gefahr der Fehlinterpretation von Ergebnissen, da Pflanzen aufgrund ihrer Organisationsweise (Kap. 1.3) über stark vernetzte biochemische Regulationsmechanismen des Wachstums verfügen.

Bei Maiswurzeln wurden in der vorliegenden Arbeit Analysen der Inhaltsstoff-Verteilungen im Tagesgang sowie in Millimeter-Segmenten der Wachstumszone durchgeführt. Den Verhältnissen unter Standardbedingungen der Anzucht (Kap. 6.1.4) konnten die Verhältnisse bei Variation zweier externer Parameter entgegengestellt werden: Der Nährstoff-Verfügbarkeit (Kap. 6.2.2 bis 6.2.4) sowie des externen pH (Kap. 6.3.2).

Bei Tabakblättern erfolgte eine Analyse der räumlichen und zeitlichen Verteilungsmuster nach Ader und Intercostalfeld getrennt sowohl unter 12 h hell / 12 h dunkel – Bedingungen als auch bei Anzucht in Dauerlicht (Kap. 7.2.5.1 bis 7.2.5.7 und Kap. 7.8.2). Ferner wurden Inhaltsstoffanalysen bei Blättern mit verändertem Inklinationwinkel durchgeführt (Kap. 7.10.2). Inhaltsstoffanalysen der Rizinusblätter wurden bei Pflanzen aus Standardanzuchtbedingungen (Kap. 7.2.5.4 bis 7.2.5.7) sowie unter Einfluss von biomechanischem Stress (Kap. 7.3.2) durchgeführt.

Die Diskussion der untersuchten Inhaltsstoff-Verteilungen beginnt mit den Analysen der prominentesten Muster: der Tagesgänge sowie der räumlichen Verteilungen. Anschliessend wird auf die Änderung der Inhaltsstoff-Verteilungen in der Wurzel bei Variation zweier externer Faktoren eingegangen: der Nährstoff-Verfügbarkeit sowie des pH-Wertes. Schliesslich erfolgt eine Diskussion der Veränderung von Inhaltsstoff-Verteilungen des Blattes durch eine Variation der Lichtverhältnisse sowie der biomechanischen Belastung der Blätter durch Anlegen von externen Zugkräften.

### **10.1 Tagesgänge in Wurzeln und Blättern**

In diesem Kapitel werden die unter den jeweiligen Standard-Anzuchtbedingungen für Blätter und Wurzeln erhaltenen Resultate diskutiert.

#### **10.1.1 Wurzel**

Tagesgänge der Inhaltsstoff-Konzentrationen sind in Wurzeln ebenso wenig zu erkennen wie ein Tagesgang im Wachstum (Kap. 6.1.4). Dementsprechend treten auch keine Tagesgänge der Depositionsraten auf. Die detektierten tageszeitlichen Variationen der Konzentration sind bei Wurzeln aus Anzuchten in Wasser etwas stärker ausgeprägt als bei Wurzeln aus Anzuchten erhöhter Nährstoff-Verfügbarkeit.

Dies könnte dahingehend interpretiert werden, dass bei Aufnahme der Nährstoffe von aussen eine größere **Homöostase der Konzentrationsverhältnisse** vorliegt als bei einer ausschliesslichen Nährstoff-Mobilisation aus dem Endosperm. Dies bedeutet jedoch nicht, dass es keine **Tagesgänge im Stoffumsatz** der Wurzelwachstumszone gibt. Aus der Literatur wird beispielsweise über deutliche Tagesgänge der Respirationsrate (Hansen 1980), der Nitrataufnahme sowie des Assimilat-Eintransports (Hansen 1977) berichtet. Die Peaks der Respirationsrate koinzidieren oft mit denjenigen der Nitrataufnahme; die Eintransport-Peaks der Assimilate zeigen eine Phasenverschiebung von einigen Stunden hierzu. Da sich tageszeitliche Variationen des Eintransports in die Wurzelwachstumszone nicht in tageszeitlichen Variationen der Konzentration niederschlagen, muss entweder

- a) der Metabolismus der Wurzelwachstumszone für eine sehr gute Pufferung der Inhaltsstoff-Konzentrationen des Gewebes sorgen oder
- b) die Exportrate entsprechender Metabolite zeitlich gut mit der Importrate der Nährstoffe und Assimilate abgestimmt sein.

Argument a) wird durch Befunde der Literatur bestätigt: Die Expression von Invertase-Genen kann innerhalb weniger Stunden durch die respiratorische Aktivität der Wurzelwachstumszone erhöht werden (Zeng et al. 1999, Koch et al. 2000). Da einem erhöhten Eintransport von Assimilaten (v.a. Saccharose) aber eine erhöhte Respirationsrate voraussetzt, die zu einer rechtzeitigen Induktion der Expression von Saccharose spaltenden Enzymen führt, sollte sich der Peak im Assimilateintransport nicht in einer Erhöhung der Konzentration der eintransportierten Saccharose auswirken. Auf welche Weise es zu einer Aufrechterhaltung der Konzentration von Glucose und Fructose kommt, ist unklar. Aus Befunden der vorliegenden Arbeit kann allerdings geschlossen werden, dass ein starker Export aus der Wurzelwachstumszone in das anschließende Gewebe hinein existiert. Vor allem für Glucose und Fructose treten erhebliche Differenzflussraten aus der Wurzelwachstumszone in das anschliessende Gewebe hinein auf (Kap. 6.2.4). Deren zeitliche Koordination (siehe Argument b) konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht aufgeklärt werden.

### 10.1.2 Stoffflüsse zwischen Wurzel und Blatt

Auch die tageszeitlich variable Phloem- (z.B. Winter et al. 1992) und Xylemsaft-Zusammensetzung (z.B. Schurr und Schulze 1995) bzw. deren diurnal variierende Ionen-Flussraten (z.B. Schurr und Schulze 1995) weisen auf tageszeitlich variable Austauschprozesse von Inhaltsstoffen zwischen Wurzel und Spross hin.

Von besonderer Bedeutung könnte hierbei Nitrat sein (siehe Kap. 9.1.3). Zwar wurden in der vorliegenden Arbeit Konzentrationsbestimmungen von Nitrat in Blatt und Wurzel vorgenommen; zum Ferntransport von Nitrat konnten jedoch keine Untersuchungen angestellt werden. Aus der Literatur ergibt sich hierfür leider ein höchst verwirrendes und widersprüchliches Bild, obwohl Nitrat zu den am besten untersuchten und am abundantesten vorkommenden Stoffen gehört, die in der Pflanze transportiert werden:

Die Aufnahme von Nitrat ist diurnal reguliert und findet vor allem während des Tages statt (Delhon et al. 1995a,b). Als einen Schritt der Regulation dieser Kinetik betrachtet man ein Phloem-vermitteltes Signal aus dem Spross. Nitrat wird in den Blättern verstärkt am Tag reduziert, wenn-gleich es auch in der Nacht durch die Erhöhung von Glucose-Konzentrationen zu einer Stimula-tion der Nitrat-Reduktion kommen kann (Delhon et al. 1996a). Es könnte jedoch auch sein, dass in der Nacht der verminderte Phloemtransport und die damit verbundene geringere Eintransportrate von Photosynthesprodukten in die Wurzel für eine geringere Aufnahme von Nitrat sorgen (Delhon et al. 1996b). Die Aufnahme von Nitrat aus der Rhizosphäre wird ferner durch verschiedene, im Phloem transportierte, Aminosäuren inhibiert (Muller und Touraine 1992). Untersuchungen an Rizinus (Herdel et al. 2001) zeigen zudem, dass der Nitrattransport in den Spross wesentlich gleichmäßiger erfolgt als die Nitrataufnahme und dass auch kurzfristige Änderungen der Nährstoff-Verfügbarkeit innerhalb von Stunden abgepuffert werden.

Die Quintessenz der genannten Studien ist, dass die Nitrataufnahme durch verschiedene Mechanismen dergestalt geregelt werden kann, dass die Ansprüche der zuwachsenden Pflanze befriedigt werden. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass der Tagesgang des Blattwachstums umgekehrt durch die Kinetik des Eintransports von Nitrat reguliert wird.

### 10.1.3 Blatt

Im wachsenden Blatt sind im Gegensatz zu den Verhältnissen in der Wurzel **deutliche Tagesgänge der Konzentrationen** vieler Inhaltsstoffe zu finden. Wie gezeigt werden konnte, sind diese nicht ausschliesslich durch Verdünnungseffekte des diurnal zuwachsenden Blattes bei konstantem Eintransport von Stoffen erklärbar (Kap. 7.2.5.5). Ein weiteres interessantes Charakteristikum dieser Tagesgänge ist neben ihrer hohen Amplitude die unterschiedliche Phasenlage des Tagesganges verschiedener Inhaltsstoffe. Dadurch sind die Konzentrationsverhältnisse des Blattes von einer zeitlichen Homöostase, wie sie im Fall der Wurzel vorliegt, weit entfernt.

Ein sehr deutlicher Tagesgang tritt beispielsweise in Tabakblättern für **Glucose** auf. Der Glucosegehalt erreicht einige Stunden vor dem Wachstumsmaximum einen erhöhten Wert und zeigt dabei vor allem an der Blattbasis in der Ader eine hohe Konzentration (analoges gilt für **Fructose**). Diese Analogie der räumlichen und der zeitlich phasenverschobenen Verteilungen könnte ein Indiz für eine Beteiligung von Glucose am Zustandekommen des Tagesganges des Wachstums sein. Es ist denkbar, dass das Wachstumsmaximum erst ablaufen kann, wenn ein genügend großer Pool an frei zugänglichen Kohlenhydraten bereitsteht; sei es, um als Substrat für den Einbau in die Zellwand zu dienen oder um Energie für den Aufbau neuer Zellwandmaterialien bereitzustellen.

Für die zeitliche Entwicklung der Hexosekonzentrationen konnten in der Literatur zwar Tagesgänge nachgewiesen werden; es wurde bislang jedoch davon ausgegangen, dass diese nicht mit den Tagesgang des Wachstums korreliert sind, da die Maxima zu verschiedenen Zeitpunkten auftreten (z.B. Kemp und Blacklow 1980). Die Möglichkeit einer Phasenverschiebung wurde nicht in Erwägung gezogen.

Auch für **Stärke** und **Saccharose** sind aus der Literatur vergleichbare Tagesgänge wie die in der vorliegenden Arbeit registrierten bekannt (z.B. Matt et al. 1998). Der Metabolismus von Stärke ist diurnal reguliert (Geiger et al. 2000); in entsprechenden Versuchen wurden auch unter Dauerlichtbedingungen Tagesgang-Variationen der Stärke-Synthese (bei zeitlich konstanter Photosyntheseleistung der Pflanze) festgestellt. An Arabidopsis-Mutanten wurde dabei als Regulationsmechanismus für diesen Tagesgang der Transport von Kohlenhydraten über die Chloroplasten-Membran hinweg sowie die Aktivität von Endoamylase ausgemacht. Eine Schlüsselrolle der metabolischen Signalkaskade, besonders der Saccharosesynthese, wird dabei Fructose-2,6-bisphosphat zugesprochen (Huber 1986, Stitt 1987).

Mit Hilfe transgener Kartoffelpflanzen konnte demonstriert werden, dass eine Änderung im Tagesgang der Kohlenstoff-Allokation im Sink- und Source-Gewebe der Pflanzen in einer Änderung des diurnalen Wachstumsmusters resultiert (Kehr et al. 1998).

Für **Citrat** besteht ein gut ausgeprägter Tagesgang mit einem Peak zum Zeitpunkt der maximalen Wachstumsaktivität. In der Literatur wird die Rolle von Citrat in wachsenden Geweben darin gesehen, für einen raschen Ausgleich der Ladungsbalance zu sorgen (Martinoia und Rentsch 1994).

Die **Glutamin**konzentration weist bei Tabak einen antizyklischen Verlauf zum Tagesgang des Wachstums auf. Bei Rizinus sind die Konzentrationen von Glutamin sehr variabel.

Glutamin stellt die Haupttransportform der Aminosäuren dar. Seine Konzentration wird, wie diejenige der Glutaminsäure, stark durch die Interaktion des Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus bei der Aminosäuresynthese beeinflusst (Huppe und Turpin 1994). Das Verhältnis von Glutamin und Glutamat ist ein Indikator der Assimilationsverhältnisse von Stickstoff (siehe Kap. 10.3). Im Rahmen der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte kein Tagesgang dieses Verhältnisses festgestellt werden (Kap. 7.2.5.8).

Auch Inhaltsstoffe, für deren Konzentration **kein Tagesgang** nachgewiesen werden konnte, könnten durch ihre Flussraten bzw. ihre Rolle im Metabolismus den Tagesgang des Wachstums oder der Biomassesynthese des Blattes beeinflussen. Beispielsweise ist für **Nitrat** nachgewiesen, dass dessen Akkumulation den Stärkemetabolismus in höheren Pflanzen reprimiert sowie den Metabolismus organischer Säuren induziert (Scheible et al. 1997b). Da darüber hinaus die Expression von Nitratreduktase der Kontrolle durch einen endogenen Rhythmus unterworfen ist (Deng et al. 1990), könnte beim Abbau von angeliefertem Nitrat im Blatt der Schlüssel zur Regulation der diurnalen Biosynthese von organischem Material liegen.

### **Betrachtungen zum Unterschied zwischen Wurzel und Blatt bezüglich der diurnalen Homöostase von Inhaltsstoffkonzentrationen**

Für die Konzentrationsverhältnisse des Blattes besteht eine geringere zeitliche Homöostase als für diejenigen der Wurzel. Es stellt sich die Frage, was der Hintergrund dieses Unterschiedes zwischen Wurzel und Blatt sein könnte.

Hierüber liegen in der Literatur keine erklärenden Untersuchungen vor. Die raschere **zeitliche Variation der Umweltbedingungen**, denen das Blatt im Vergleich zur Wurzel unter natürlichen Bedingungen ausgesetzt ist, spielt bei der Ausbildung dieses Unterschiedes jedoch sicher eine Rolle. Es ist denkbar, dass die Dynamik der Variation externer Parameter im Verlauf der Evolution des Blattes zu einer größeren Toleranz gegenüber Veränderungen der Inhaltsstoff-Konzentrationen geführt hat. Diese Toleranz könnte die Ursache der Ausbildung eines tageszeitlich stark oszillierenden Systems von Konzentrationsverteilungen sein. In der Wurzel könnte sich bedingt durch die Konstanz der natürlicherweise herrschenden Umweltbedingungen dagegen ein wesentlich homöostatischeres System entwickelt haben.

Ein weiterer denkbarer Erklärungsansatz für die unterschiedliche Ausprägung von Tagesgängen der Inhaltsstoff-Konzentrationen baut auf den **unterschiedlichen Zeitskalen der zellulären Entwicklungsprozesse** der beiden Organe auf: Die Dauer der Zellstreckungsphase ist in der Wurzel um mehr als den Faktor zehn kürzer als im Blatt (Kap. 1.2). In Korrelation hierzu treten in der Wurzel wesentlich höhere absolute Wachsraten der Zellen sowie höhere relative Wachsraten des Gewebes auf als im Blatt (vergleiche Tab. 9.2). Der hohen Dynamik der Entwicklung während der Zellstreckungsphase der Wurzelzellen könnte es eventuell zuzuschreiben sein, dass dort eine größere Homöostase bezüglich der Inhaltsstoff-Konzentrationen eingestellt wird, als in den sich wesentlich langsamer entwickelnden Zellen des Blattes. Eine weitere Komponente der Wachstumsmuster von Blatt und Wurzel, die sich um einen Faktor von 10 bis 20 unterscheidet, ist die Ausprägung von Synchronisationsmustern: In der Wurzel sind hauptsächlich Circumnutationen einer Periodenlänge von 1 bis 2 h zu beobachten, während beim Blatt nyctinastische Bewegungen einer Periodenlänge von 24 h die prominenteste zyklische Bewegungserscheinung darstellen. Falls diese Bewegungserscheinungen tatsächlich eine optisch erkennbare Ausprägung der zellulären Wachstumsdynamik darstellen (Kap.9.3), wäre das Pendant der tagesrhythmischen Variation von Inhaltsstoff-Konzentrationen im Blatt bei der Wurzel eine Variation mit der Periodenlänge von Circumnutationsbewegungen.

Beide genannten Erklärungsansätze könnten natürlich auch wiederum miteinander verwoben sein.

Zusammenfassend kann zu den Tagesgängen in Blatt und Wurzel gesagt werden:

*Ebenso wie bei den untersuchten Wachstumsmustern zeigen sich auch bei den Tagesgängen der Konzentrationen vieler Inhaltsstoffe in der Wurzel keine signifikanten Variationen. Im Blatt treten dagegen deutliche Tagesgänge auf. Dies könnte mit der unterschiedlichen zeitlichen Dynamik der Zellstreckungsprozesse oder mit der natürlicherweise auftretenden Variabilität der Aussenbedingungen korreliert sein.*

## 10.2 Räumliche Verteilung von Inhaltsstoffen in Wurzel und Blatt

### 10.2.1 Wurzel

In der Wurzel sind für die Konzentrationen der **Kohlenhydrate sehr deutliche Gradienten** ausgebildet. Die Konzentrationsprofile von Hexosen und Saccharose sind denjenigen von bereits in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen sehr ähnlich (Sharp et al. 1990). Die Konzentrationen von Glucose und Fructose sind dabei im Meristem geringer als in der Elongationszone; die Konzentration von Saccharose verläuft nahezu spiegelbildlich. Die Quotienten von Saccharose zu Hexosen fallen demnach von der Wurzelspitze an ab.

Dies stimmt mit Messungen der **Invertase-Aktivität** aus der Literatur überein (z.B. Toko et al. 1987): Die Aktivität von Invertase ist im Meristem am geringsten und steigt bis zum Ende der Elongationszone an. Daher werden im Meristem die höchsten Saccharose:Hexose-Quotienten erwartet. Ferner wird auch bei der räumlichen Verteilung der Invertaseaktivität von der Existenz zweier Peaks in der Zone maximaler Wurzelwachstumsaktivität berichtet, die mit der Lage der in der vorliegenden Arbeit detektierten Wachstumspeaks gut korrelieren (pers. Mitteilung K. Koch, Gainesville, USA). Diese Befunde deuten auf eine hohe Bedeutung der Kohlenhydrate, bzw. der Enzyme des Kohlenhydrat-Metabolismus für die Ausprägung von Wachstumsmustern hin.

Auch für **Aminosäuren, Kationen und Anionen** ergeben sich zum großen Teil deutliche Gradienten innerhalb der Wurzelwachstumszone. In keinem Fall wird jedoch eine Verteilung der Konzentrationen beobachtet, die derjenigen der Wuchsraten entspricht, also ein Maximum einige Millimeter hinter der Wurzelspitze hat.

Wegen der besonderen Bedeutung der Substanzen dieser Stoffklassen bei Veränderung der externen Nährstoff-Verfügbarkeit sowie des externen pH-Wertes wird in den nachfolgenden Abschnitten gesondert auf diese Verteilungen eingegangen.

### 10.2.2 Blatt

Für Glucose, Fructose und Malat wurden in der Blattader von Tabak Basis-Spitze-Gradienten festgestellt (Kap. 7.2.5.2); also Verteilungen, die denjenigen der Wachstumsaktivität entsprechen. Für Stärke und Saccharose, Sulfat sowie nahezu alle Aminosäuren (Ausnahme: Glutamin und GABA) wurden inverse Gradienten mit höheren Werten an der Blattspitze registriert. In den Intercostalbereichen ergaben sich keine deutlichen Gradienten der Konzentrationsverteilung, was durch Befunde vorangegangener Arbeiten bestätigt wird (Heckenberger 1996, Walter 1997).

Auch Sink-source-kontrollierende Enzyme, wie Saccharose-Synthase und Saccharose-Phosphat-Synthase zeigen im Intercostalfeld bezüglich ihrer Aktivität keinen Basis-Spitze-Gradienten (Schurr et al. 2000). Die Konzentration von Fructose-2,6-bisphosphat – als einem wichtigen Metaboliten des Kohlenhydrat-Stoffwechsels - korreliert dagegen auch im Intercostalfeld mit der Wachstumsverteilung (Nielsen und Veierskov 1990).

**Zusammenfassend kann für die räumlichen Inhaltsstoffgradienten in Blatt und Wurzel sowie ihre Verknüpfung mit Gradienten der Wuchsraten gesagt werden:**

Es gibt keinen Inhaltsstoff, dessen Konzentration sowohl in der Wurzel von Mais als auch im Blatt von Tabak mit der Verteilung der Wuchsraten korreliert ist. In der Wurzel zeigt kein einziger der untersuchten Inhaltsstoffe eine der Verteilung der Wachstumsaktivität vergleichbare Konzentrationsverteilung. Bezüglich der Verteilung der Depositionsraten ergeben sich jedoch für eine Reihe von Inhaltsstoffen Korrelationen mit der REGR-Verteilung. Zu diesen Substanzen gehören unter anderem Glucose und Fructose. Im Blatt zeigen lediglich diese beiden Substanzen (vorwiegend in der Blattader) einen deutlich ausgeprägten Basis-Spitze-Gradienten sowohl der Konzentrationen als auch der Depositionsraten.

*Diese Befunde deuten auf die wichtige Rolle von Glucose und Fructose für die Ausprägung von räumlichen Wachstumsmustern hin.*

Die Synthese von Kohlenhydraten (sowie Proteinen) spielt für das Wachstum stets eine herausragende Rolle, da sie in der Regel den Hauptanteil der Trockengewichtssubstanz eines Organs darstellen (Williams und Rijven 1965). Wichtig ist hierbei vor allem die Synthese von Cellulose, dem häufigsten organischen Makromolekül der Biosphäre, aus Glucose-Einheiten (Delmer 1999).

### **10.3 Einfluss externer Nährstoff-Verfügbarkeit auf Wurzeln**

Die Inhaltsstoffzusammensetzung wachsenden Wurzelgewebes variiert auch bei Pflanzen aus Anzuchten verschiedener Nährstoff-Verfügbarkeit kaum (Kap. 6.2.2). Die Gehalte von Zuckern und die Gehalte der meisten Aminosäuren sind nicht signifikant verschieden. Selbst die Gehalte der meisten untersuchten Nährelemente (Phosphat, Sulfat, Kalium, Calcium, Magnesium sowie Natrium) unterscheiden sich nicht in Wurzeln der beiden Behandlungen. Die Wurzeln von Keimlingen des untersuchten Entwicklungszustandes scheinen bezüglich dieser Stoffe aufgrund der Mobilisierbarkeit aus dem Endosperm bzw. aufgrund der nur gering beeinflussten Photosyntheseleistung in Wasseranzucht nicht in einen Mangelzustand zu geraten.

Deutliche Unterschiede ergeben sich jedoch bei Konzentrationen von Nitrat, Ammonium, Citrat, Malat und Chlorid sowie bei den Aminosäuren Glutamin und Glutamat.

#### **Räumliche Verteilung von Aminosäuren**

Die Konzentration von **Glutamin** unterscheidet sich deutlich in den Meristemen der in Wasser bzw. Nährlösung angezogenen Wurzeln. Der Glutamingehalt der Wurzeln aus Wasseranzucht ist fast doppelt so hoch wie derjenige aus Pflanzen in Nährlösungsanzucht. Bei Glutamat ergibt sich ein umgekehrtes Bild: Hier wird in Nährlösungsanzucht ein höherer Wert im Meristem gefun-

den. In der Elongationszone konvergieren die Konzentrationen der Aminosäuren aus den beiden Anzuchten, sodass am Ende der Wachstumszone wieder vergleichbare Gehalte vorliegen.

Die Konzentrationsverhältnisse der beiden Aminosäuren im Meristem können dahingehend interpretiert werden, dass dort bei hoher externer Nährstoffverfügbarkeit eine Assimilation von Stickstoff stattfindet, während im Meristem bei geringer Nährstoff-Verfügbarkeit keine Assimilation stattfindet, sondern lediglich ein Eintransport von bereits synthetisierten Stickstoffverbindungen (Huppe und Turpin 1994): Bei geringer oder fehlender Assimilation von Stickstoff in einem Gewebe (Wasser-Anzucht) verläuft die Aminierung von Glutamat durch Glutaminsynthetase (GS) langsam; die Konzentration von Glutamat ist dadurch hoch; die Konzentration von Glutamin ist gering. Wenn Stickstoff in Form von Ammonium verfügbar wird, steigt die Aktivität des Enzympaares GS und GOGAT (Glutamin-2-Oxo-Glutarat-Amino-Transferase) an. Die Konzentration des Substrates Glutamat sinkt dadurch ab; die Konzentration des Produktes Glutamin steigt an; die charakteristischen Verhältnisse der Wurzeln aus Nährlösungsanzucht sind erreicht.

Die Reaktion von Glutamin auf eine Veränderung der externen Nährstoff-Verfügbarkeit kann wie folgt zusammengefasst werden:

*Die Veränderung der externen Nährstoff-Verfügbarkeit führt zu einer drastischen Änderung der Konzentration von Glutamin im apikalen Bereich der Wachstumszone. Die beobachteten Wachstumsreaktionen könnten dadurch beeinflusst sein.*

## **Kationen**

Die Verteilung von Kalium, Magnesium und Calcium fiel von der Wurzelspitze an ab. Diese Beobachtung stimmt mit den Resultaten aller anderen publizierten Untersuchungen hierzu überein (z.B. Scott et al. 1967, Jeschke und Stelter 1976, Silk et al. 1986, Zhong und Läuchli 1994). Die Aufnahme und Translokation von Magnesium und Calcium ist dabei in einer analogen Weise verteilt (Ferguson und Clarkson 1976). Ähnliche Kationenverteilungen mit Maxima in meristematischen Regionen werden auch in Blättern monokotyler Pflanzen gefunden (Meiri et al. 1992, Bernstein et al. 1995, Hu und Schmidhalter 1998). Die Konzentration von Calcium ist generell in schnell wachsenden Regionen niedriger als in Meristemen, kann jedoch in stark vakuolisierten Geweben wie z.B. in älteren Blättern durch Akkumulation in der Vakuole wieder stark ansteigen (Fricke et al. 1994).

### *Einordnung der detektierten Konzentrationen*

Der apikale Bereich der Wurzelwachstumszone ist fast ausschließlich aus meristematischen und daher gering vakuolisierten Zellen aufgebaut. Die Konzentrationen, die in dieser Region für Kalium gefunden werden, entsprechen den für das Cytoplasma höherer Pflanzen erwarteten Werten (Marschner 1995). Nur ein geringer Prozentsatz von Kalium befindet sich im Apoplasten (Mühling 1998).

Im Gegensatz dazu übersteigen die Konzentrationen von Magnesium und Calcium, die in der vorliegenden Arbeit gemessen wurden, die erwarteten cytosolischen Konzentrationen (Marschner 1995) um einen Faktor von zwei (Magnesium) bzw. 1000 (Calcium). Das könnte durch die Lokalisation der gemessenen Fraktionen von Magnesium und Calcium im Apoplasten bedingt sein. In Wurzeln ist ein beträchtlicher Anteil von apoplastidärem Calcium an die Zellwand gebunden (Sentenac und Grignon 1981). Die Konzentration von freiem Calcium, das durch Ionen-selektive Elektroden in der Zellwand gemessen werden kann, ist gering (Björkman und Cleland 1991).

### **Organische Anionen**

Citrat- und Malatgehalte sind in Anzucht unter erhöhter externer Nährstoff-Verfügbarkeit niedriger als bei Anzucht der Pflanzen in Wasser.

Die unterschiedlichen Malatkonzentrationen erklären sich durch die Rolle von Malat bei der Regulation der Ladungsbalance und der Ionenaufnahme unter natürlichen Wachstumsbedingungen: Malat kann dort in den Boden exudiert werden, um die Verfügbarkeit von Phosphat zu erhöhen (Martinoia und Rentsch 1994). Es ist zu erwarten, dass eine derartige Exudation und die damit verbundene Malatproduktion auch unter Phosphat-Mangelbedingungen dieser Arbeit (bei Anzucht in Wasser) aufgetreten ist. Ebenso kann Malat nach Bedarf in der Wurzel synthetisiert und abgebaut werden, um Ladungsüberschüsse, die durch die nicht ausgeglichene Aufnahme von Anionen und Kationen entstehen, auszugleichen (Martinoia und Rentsch 1994). Auch die Nitrataufnahme wird durch Malatabgabe stimuliert (Touraine et al. 1992).

Für Citrat werden ähnliche Mechanismen aus Studien an Pflanzen, die speziell an Phosphat-Mangelzustände angepasst sind, berichtet (proteoid roots, Neumann und Römheld 1999): Auch Citrat kann von der Wurzel in das Substrat hinein exudiert werden, um dort die Phosphat-Verfügbarkeit zu erhöhen. Falls dies geschieht, werden in der Wurzel - wie in der vorliegenden Studie - erhöhte Konzentrationen von Citrat vorgefunden. Die Synthese geschieht dabei in der Wurzel selbst und nicht im Blatt, wie früher angenommen wurde (z.B. Hoffland et al. 1992).

### **Nitrat und Ammonium**

Die Gehalte von Nitrat und Ammonium sind bei gesteigerter externer Nährstoff-Verfügbarkeit signifikant erhöht; Nitratgehalte der Wurzeln aus Anzucht in Wasser liegen unterhalb der Messgrenze.

In der Literatur wurde gezeigt, dass Nitrat und Ammonium über die gesamte Länge der Wachstumszone - und darüber hinaus - aufgenommen werden (Colmer und Bloom 1998). Die Höhe der Aufnahmerate der einen Stickstoff-Verbindung hängt unter anderem davon ab, ob die andere Verbindung auch verfügbar ist. In Konkurrenz-Experimenten zeigte sich, dass in der Wurzelwachstumszone Ammonium bevorzugt aufgenommen wird, wenn sowohl Ammonium als auch Nitrat extern angeboten werden.

## Depositionsratenverteilungen

Wie gezeigt werden konnte (Kap. 6.2.2), sind die Depositionsratenverteilungen aller untersuchten Inhaltsstoffe durch die Veränderung der externen Nährstoff-Verfügbarkeit praktisch nicht beeinflusst. Dasselbe gilt für die integrale Deposition von Kationen, Anionen und Aminosäuren (Kap. 6.2.3). Auch die Verteilung der Wuchsraten (nicht aber die Amplitude) wird von der externen Nährstoff-Verfügbarkeit nicht beeinflusst. Da die Wuchsratenverteilung im Fall der linear organisierten Wurzelwachstumszone die Verteilung von Zellen unterschiedlichen Entwicklungszustandes angibt, scheint daher ein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad einer Zelle und den Depositionsraten zu bestehen. Diese Korrelation kann wie folgt ausgedrückt werden:

*Depositionsraten sind charakteristisch für bestimmte  
Wachstumszustände von Zellen oder Geweben und werden von  
externen Einflüssen nur geringfügig moduliert.*

## 10.4 Einfluss des externen pH auf Wurzeln

Bei unterschiedlichen Werten dieser externen Einflussgröße wurden die Verteilungen von Kalium, Magnesium und Calcium untersucht (Kap. 6.3.2).

Die Verteilungen dieser Kationen unterschieden sich qualitativ nicht von den im vorigen Kapitel beschriebenen; die Konzentrationen fielen vom Apikalmeristem aus ab. Auch die Form der Depositionsratenverteilungen entspricht den Verhältnissen unter Standardbedingungen. Der externe pH-Wert wirkte sich allerdings auf die absolute Höhe der Werte von **Calcium und Magnesium** aus:

Der Gehalt von Calcium war um so höher, je niedriger der externe pH war. Magnesium-Gehalte zeigten einen qualitativ vergleichbaren, allerdings schwächeren Effekt als Calcium-Konzentrationen. Die **Kalium**-Gehalte erwiesen sich als vom externen pH unabhängig.

Dieser Unterschied in der Antwort von Kalium auf der einen Seite und Calcium sowie Magnesium auf der anderen Seite auf die Variation des externen pH kann am plausibelsten durch die unterschiedliche *Verteilung der Ionen zwischen Cytoplasma und Apoplast* erklärt werden (Kap. 10.3). Es kann angenommen werden, dass homöostatische Mechanismen die cytosolische Kalium-Konzentration regulieren. Eine ganze Reihe von Genen, die Kalium-Transporter codieren, welche die Kalium-Aufnahme hierbei regulieren könnten, ist in den vergangenen Jahren entdeckt worden (z.B. Rubio et al. 1995, Hedrich und Dittich 1996).

Die Calcium- und Magnesium-Konzentrationen der Zellwand sind dagegen erheblichen Variationen unterworfen, die mit dem externen pH-Wert korreliert sind. Calcium und Magnesium können während des Versuches eventuell aus dem Substrat aufgenommen worden sein, da dieses nicht ganz frei von Nährstoffen war und ein tiefer pH-Wert zu einer erhöhten Mobilisierung von pflanzenverfügbarem Calcium und Magnesium in der Bodenlösung führt (Marschner 1998). Dennoch bleibt die Frage, ob es eine physiologische Erklärung für die erhöhte Akkumulation

von Calcium bei tiefen externen pH-Werten gibt und falls ja, wie sie reguliert ist. Um dies zu verstehen, muss näher auf den **Aufbau der Zellwand** eingegangen werden.

Calcium liegt in der Zellwand hauptsächlich an das *Pektin-Netzwerk* gebunden vor; der höchste Gehalt von Pektinen findet sich dabei in jungen Zellwänden. Innerhalb des Pektin-Netzwerks sind Uronsäuren die vorherrschenden Bindungsstellen für Calcium (Jarvis 1982). Es ist dort relativ lose gebunden, wie Isotopen-Austauscherexperimente zeigen (Clarkson 1984, Cramer et al. 1987). Uronsäuren liegen mit der größten Häufigkeit im Meristem der Wurzel vor und nehmen im Verlauf der Zellentwicklung ab (Silk et al. 1984). Das Konzentrationsprofil divalenter Kationen (wie Calcium oder Magnesium) entlang der Wurzelwachstumszone ist also sowohl durch die 'Verdünnung' des Pektin-Netzwerkes als auch durch dessen chemische Zusammensetzung erklärbar.

Falls bei einer Absenkung des externen pH auch der *apoplastidäre pH* absinken würde, müsste es im Apoplasten zu einer Mobilisierung von Calcium und Magnesium mit einer verstärkten Freisetzung von den Uronsäure-Gruppen kommen (Sentenac und Grignon 1991). Dies hätte ein Absinken der Konzentrationen zur Folge. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit allerdings ein Anstieg beobachtet werden kann, ist ein weiteres Indiz dafür, dass der apoplastidäre pH gut gegen den externen pH gepuffert ist (siehe hierzu Felle 1998).

Die Frage, wieso ein Anstieg der Konzentration von Calcium (im weiteren: auch Magnesium) bei verringerten externen pH-Werten gemessen wird, kann auf Basis der vorliegenden Messungen sowie der publizierten Literatur nicht eindeutig beantwortet werden. Denkbar sind unter anderem folgende Lösungsmöglichkeiten (siehe hierzu auch Walter et al. 2000):

- Es gibt einen Mechanismus, der zu einer Erhöhung der freien Uronsäure-Bindungsstellen führt
- Die Konzentration von freiem Calcium im apoplastidären Raum ist erhöht; als Gegenionen könnten z.B. bei der Respiration entstehende Carbonate dienen
- Calcium wird verstärkt als Calcit oder Oxalat in der Zellwand ausgefällt
- Erhebliche Mengen von Calcium werden im Endoplasmatischen Retikulum oder den Mitochondrien der jungen Zellen gespeichert, die einen sehr hohen Bedarf an Calcium haben (Trewavas 1999)

## 10.5 Änderung der Lichtverhältnisse an Tabakblättern

### Dauerlicht

Einige Inhaltsstoffe zeigen bei Anzucht von Tabak unter Dauerlichtbedingungen veränderte Verteilungen in den Blättern. Die wesentlichen Änderungen gegenüber den Anzuchten unter Standardbedingungen sind hierbei (Kap. 7.8.2):

Die **Kohlenhydratgehalte** steigen um einen Faktor drei bis vier an. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die Erhöhung der Photosyntheseleistung aufgrund der erhöhten Lichtdauer zurückzuführen. Eine vergleichbare Relation besteht zwischen der Lichtintensität und den Konzentrationen von Kohlenhydraten, so lange sich die Lichtintensität in einem physiologisch sinnvollen Rahmen bewegt (Kemp 1981).

Glucose und Fructose zeigen ein zeitlich etwas verschobenes, nicht mehr besonders deutlich ausgeprägtes Maximum. Dies korreliert mit den Befunden der Wachsrates (Kap. 7.8.1) und kann als weiteres Indiz für die Korrelation von Hexosen- und Wachstumsverteilung aufgefasst werden.

Die **Tagesgänge der Aminosäuren** sind nicht mehr klar zu erkennen; auch Basis-Spitze-Gradienten in der Mittelrippe sind kaum noch vorhanden; die Höhe der Aminosäurekonzentrationen ist weniger beeinflusst als diejenige der Kohlenhydrate. Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass zwischen Aminosäuren und Wachstumsmustern eine weniger enge Korrelation besteht als zwischen Kohlenhydraten und Wachstumsmustern.

**Citrat** ist unter Dauerlichtbedingungen nicht mehr nachweisbar. Der osmotische Effekt der Erhöhung der Kohlenhydratkonzentrationen könnte hierdurch eventuell ausgeglichen werden.

### Änderung des Inklinationswinkels von Tabakblättern sowie der Lichtintensität

Auch bei Änderung des Blattinklinationswinkels trat eine Änderung der Lichtverhältnisse ein (Kap. 7.10.2). Die dem Licht exponierte Fläche war um so kleiner, je größer der gewählte Blattinklinationswinkel war. Bezüglich der Kohlenhydratgehalte konnte im untersuchten Blatt eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Lichtintensität und den Konzentrationen festgestellt werden. Dieser Befund deckt sich mit dem Befund bei veränderten Lichtintensitäten der Laborbeleuchtung (Kap. 7.9).

Bei selektiver Verringerung der Lichtintensität am Untersuchungsblatt traten im Inklinationswinkel-Experiment jedoch Aufwellungen der Blätter auf, die bei homogener Verringerung der Lichtintensität für die gesamte Pflanze nicht zu erkennen waren.

Die Gehalte der Hexosen in den morphologisch auffälligen Blättern sowie in den Source-Blättern dieser Pflanzen lagen unter  $2 \mu\text{mol/g FG}$ . In der Literatur wird diese Konzentration als ein Schwellwert angegeben, ab dem die Wuchsrates von untersuchten Maisblättern erheblich beeinträchtigt wurde (Kemp 1981). Es ist denkbar, dass die starke Reduktion des Mittelrippen-Zuwachses durch zu niedrige Werte löslicher Kohlenhydrate begründet war, die sich bevorzugt auf die Wachstumsaktivität der Rippe ausgewirkt haben:

*Das Absinken der Hexosekonzentration unter eine gewisse Grenze kann Wachstums-limitationen verursachen, die sich zunächst auf die Blattader auswirken.*

Eine transiente Unterschreitung dieses Wertes scheint die Blätter dagegen nicht zu schädigen, könnte aber für die Phasenlage des Wachstums-Tagesganges von Bedeutung sein: Im Verlauf des Tagesganges wurden bei den Pflanzen der vorliegenden Arbeit auch unter Standard-Anzuchtbedingungen (selbst an der Basis der Mittelrippe) Hexosensummen von  $2 \mu\text{mol/g FG}$  oft unterschritten. Es ist denkbar, dass zu gewissen Tageszeiten und an gewissen Stellen des Blattes ein Hexosen-Mangelzustand auftritt, der zu einer sofortigen oder zeitversetzten Abnahme der Wachstumsaktivität führen kann, die bei nachfolgend wieder erhöhter Verfügbarkeit von Hexosen ebenfalls wieder ansteigt.

## 10.6 Einfluss von Zug an Rizinusblättern

Bei Rizinus konnte in älteren, noch wachsenden Blättern beobachtet werden, dass der Tagesgang der Stärkekonzentrationen durch das Anlegen von Zugkräften beeinflusst ist: Je höher die angewendete Kraft ist, desto weniger stark ausgeprägt verläuft der Tagesgang der vorgefundenen Stärke-Konzentrationen. Setzt man voraus, dass der Abbau des Stärkereservoirs über Nacht zum Teil der Energiebereitstellung des Blattes dient, so könnte es sein, dass bei den nahezu ausgewachsenen Blättern, die hauptsächlich auf ihr eigenes Stärke-Reservoir zurückgreifen, ein grosser Teil dieser Energie durch die externe mechanische Dehnungsenergie ersetzt werden kann. Hierbei würde dann interessanterweise keine Herunterregulierung der Stärke stattfinden.

# 11 Regulationsmechanismen von Wachstumsmustern

Nachdem in den vorhergehenden zwei Kapiteln spezielle Wachstumsmuster bzw. Inhaltsstoffverteilungen besprochen wurden, die in der vorliegenden Arbeit analysiert werden konnten, beschäftigt sich dieses abschließende Kapitel der Diskussion mit allgemeinen Regulationsmechanismen von Wachstumsmustern. Dabei wird die Rolle von Mechanismen verschiedener Organisationsebenen der Pflanze in Bezug zu den vorgestellten Ergebnissen diskutiert. Begonnen wird dabei mit der Ebene der Biomechanik (Kap. 11.1), anschließend werden biophysikalische Effekte besprochen (Kap. 11.2), die von der Lockhart-Gleichung eingeschlossen werden. Schließlich wird auf Mechanismen der biochemischen (Kap. 11.3) und der molekularbiologischen Ebene (Kap.11.4) eingegangen.

## 11.1 Biomechanik

Das Wachstum von Organen kann nur auf Basis seiner biomechanischen Eigenschaften verstanden werden. Da Organe stets aus Geweben verschiedener Materialeigenschaften zusammengesetzt sind, kommt es beim Wachstum stets auch zu Effekten, die aus der **Interaktion histologisch verschiedener Komponenten** resultieren.

Die Unterschiede in elastischen Eigenschaften, Verwindungssteifigkeit und Festigkeit der Gewebe eines wachsenden Organs führen zu Spannungen innerhalb dieses Organes (Green 1980, Green 1992, Moulia 2000). Diese Spannungen können selbst wiederum Signale innerhalb wachsender Gewebe darstellen (Green 1992, Stein et al. 1997). So ist zum Beispiel die verstärkte Expression von TCH-Genen (touch-genes), die in Folge mechanischer Einflüsse angeschaltet werden, in wachsenden Geweben als Antwort auf gewebeinterne Spannungen zu verstehen (Braam et al. 1997). Kommt es unter Einwirkung biomechanischer Kräfte zur Ausprägung einer veränderten Morphologie der Pflanze, so spricht man von einer ‚*Thigmomorphogenese*‘ (Jaffe 1973).

Eine Krafteinwirkung kann von der Pflanze jedoch auch durch die Dehnung von Membranen perzipiert werden, die in der Aktivierung von dehnungsgesteuerten Ionenkanäle resultiert. Derartige Kanäle sind z.B. für Chlor, Kalium sowie Calcium nachgewiesen (Cosgrove und Hedrich 1991). Die Orientierung, mit der ein pflanzlicher Wachstumsprozess auf eine externe Belastung oder eine Gewebespannung reagiert, wird im nächsten Schritt durch die gerichtete Anordnung kortikaler Mikrotubuli (Wymer et al. 1996) festgelegt. Diese steuern wiederum den gerichteten Aufbau von Cellulose-Strukturen (Delmer 1999), die ihrerseits die Richtung des Wachstums senkrecht zu ihrer Längsorientierung festlegen (Green 1994).

Diese Wirkungskette ist wahrscheinlich auch die biomechanische Grundlage der Synchronisation von Wachstum verschiedener Flanken eines zylindrischen Organs, das Nutationsbewegungen vollführt. Derartige Phänomene wurden in der vorliegenden Arbeit anhand von Nyctinastien und Heliotropismen von Blättern sowie Circumnutationen von Wurzeln untersucht.

Diese Wirkungskette ist aber nicht nur auf endogene oder rhythmische Prozesse beschränkt, in denen ein Wachstumspuls um ein zylindrisches Organ umläuft, sondern lässt sich auch auf Prozesse linearer Geometrie anwenden, wie beispielsweise das Wachstum von Bäumen unter Windeinfluss (Telewski und Pruyun 1998). Diese wachsen verstärkt in die Richtung des vorherr-

schenden Windes. Dabei wird zusätzlich eine negative Dosis-Wirkungsbeziehung bezüglich des Längenwachstums und der Windstärke festgestellt: Bäume verschiedener Arten wachsen um so schlechter (erfahren einen um so stärkeren thigmomorphogenetischen Effekt), je höher die Kraft des Windes ist, dem sie integriert über eine gewisse Zeit ausgesetzt sind. Dieses Ergebnis weist gewisse Analogien zu der Wachstumsreduktion der untersuchten Rizinusblätter bei Fixierung in die Horizontale auf: Wenn dies ohne adäquate Zugkraft geschieht, resultiert die Krafteinwirkung, die die Bewegungen in der Senkrechten verhindert in einer Verminderung des Blattflächenwachstums in der Waagrechten.

Abschliessend sei zu diesem Themenkomplex noch angemerkt, dass es bei der Untersuchung des Zusammenspiels von Geweben verschiedener Materialeigenschaften leicht zu Fehlinterpretationen kommen kann, da es unmöglich ist, die Materialeigenschaften von natürlicherweise verbundenen Geweben separat voneinander zu messen.

Dies kann am Beispiel der Interaktion von Epidermis und Zentralgewebe gezeigt werden: Für zylindrische Gewebe wird seit langem die möglicherweise wachstumskontrollierende Rolle der Epidermis diskutiert (z.B. Kutschera 1992). Diese Einschätzung wird meist mit dem Verhalten von abgetrennten und in der Längsrichtung zweigeteilten Hypokotylsegmenten begründet, die sich nach aussen krümmen, was angeblich belegt, dass das innere Gewebe unter stärkerem Druck steht als das äussere. Wie jüngst gezeigt werden konnte, beruht die Interpretation der Resultate dieses Experimentes wahrscheinlich auf falschen Annahmen. Bislang wurde nicht berücksichtigt, dass es beim Isolieren der Gewebestücke zu Änderungen der Wasserpotentialverhältnisse der verschiedenen beteiligten Gewebe kommt, die natürlicherweise andere Werte aufweisen (Peters und Tomos 2000). Erst durch den Eingriff in das System etablieren sich hier also die Eigenschaften, die eigentlich am ungestörten System gemessen werden sollten.

Biomechanische Regulationsprozesse sind bislang noch sehr schlecht verstanden, sollten aber in zukünftigen Untersuchungen intensiv bearbeitet werden. Die raum-zeitliche Analyse auf Basis der DISP-Methodik könnte hierfür von großem Nutzen sein.

## 11.2 Biophysik

Die biophysikalische Kontrolle pflanzlicher Wachstumsprozesse kann auf zellulärer Ebene durch die Lockhart-Gleichung beschrieben werden (siehe Kap. 1.2): Wachstum tritt ein, wenn ein Schwellwert des Turgors erreicht wird und die Zellwand daraufhin expandiert. Dabei sind sowohl die Höhe des Schwellwerts, als auch der Turgor, als auch die Expansibilität der Zellwand regulierbare Größen. Ob für die Ausbildung von dynamischen Wachstumsprozessen Veränderungen des Turgors oder der Zellwand-Expansibilität eine wichtigere Rolle spielen, ist nicht klar. Vermutlich kann diese Frage nicht allgemeingültig beantwortet werden, da beide Prozesse stets interagieren und da bei unterschiedlichen pflanzlichen Zellen, Geweben oder Organen unterschiedliche Lösungen der Regulation realisiert sind. Für die in der vorliegenden Arbeit betrachteten Prozesse an Wachstumszonen intakter Organe wird in der aktuellen Literatur eine Kontrolle durch Zellwandeigenschaften favorisiert (Passioura et al. 1992, Cosgrove 1999). Eine wichtige Rolle des Turgors erscheint unwahrscheinlich.

### **Kritik am Konzept der biophysikalischen Regulation des Blattwachstums-Tagesganges durch den Turgor**

Die biophysikalische Kontrolle von diurnalen Wachstumserscheinungen wurde in der Vergangenheit von vielen Autoren hauptsächlich dem Turgor zugeschrieben (z.B. Davies und Van Volkenburgh 1983). Dabei wurde in der Argumentation oft auf Befunde an Einzelzellen, vor allem der Alge *Chara*, zurückgegriffen (z.B. Proseus et al. 1999). Zwar können viele Details von Wachstumskinetiken aus dem Expansionsverhalten von Einzelzellen abgeleitet werden; die Regulation des Wachstums eines komplexen Gewebes wird dadurch aber wohl kaum beschrieben werden können, wie folgende Argumente zeigen:

- In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass der Turgor einer Pflanze relativ konstant gehalten wird. So tritt zum Beispiel entlang der Wachstumszone einer Wurzel an jeder Stelle nahezu derselbe Turgor auf, während die Wuchsraten höchst unterschiedlich sind (Tomos und Pritchard 1994).
- Der Turgor ist innerhalb einer einzelnen Zelle an jeder Stelle gleich; auch wenn die Zelle in einen komplexen Zellverband eingebettet ist. Innerhalb einer im Zellverband befindlichen Zelle können aber sehr wohl unterschiedliche Wuchsraten an unterschiedlichen Positionen der Zelle festgestellt werden. Besonders deutlich lässt sich dies bei mikroskopischen Aufnahmen an Wurzeln demonstrieren (Brumfield 1942; auch pers. Mitteilung G. Beemster). Da der Turgordruck einer Zelle keine räumlich differenzierte Regulation des Wachstums bewirken kann, müssen Wachstumsdifferenzen an verschiedenen Positionen entweder in der Zellwandstruktur oder im Gewebeverband verursacht werden.
- Ein zentrales Argument gegen die hauptsächlichliche Kontrolle des Blattwachstums-Tagesganges durch Turgorvariationen ist das Weiterlaufen des Tagesrhythmus im Dauerlicht. In der Literatur wird die Meinung vertreten, dass Arten, die ein Wachstumsmaximum während der Nacht zeigen, ihre Aktivitätsverteilung durch eine Erhöhung des Turgors in der Nacht infolge des Schliessens der Stomata regeln (z.B. Taylor und Davies 1985, Bunce 1977, Boyer 1968). In den Dauerlicht-Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich sowohl Transpiration (und damit wahrscheinlich auch der Turgor) als auch Assimilation sofort auf konstante Werte einstellen, wenn von Lichtwechsel- zu Dauerlichtbedingungen übergegangen wird.

Diese Argumentation soll jedoch nicht nahelegen, dass der Turgor in keiner Weise für die Regulation von Wachstumseffekten verantwortlich gemacht werden kann. Dies wird schon durch die Messungen der kurzfristigen Wachstumsoszillationen (Kap. 7.4) belegt. In der Literatur ist zweifelsfrei belegt, dass während schneller Änderungen des Turgors z.B. infolge veränderter Wasserverfügbarkeit auch direkte Effekte auf die Ausdehnung von Blättern (Pardossi et al. 1994) und Wurzeln (Frensch et al. 1994) beobachtet werden.

Auf die regulierende Rolle der Zellwand-Expansibilität für den Tagesgang des Wachstums wird in Kap. 11.4 im Zusammenhang mit den Messungen der Expression des Expansin-Gens *NtExp1* eingegangen.

### 11.3 Biochemie

Wachstum kann nur aufrecht erhalten werden, wenn die Volumenvergrößerung eines Organs mit der Neusynthese von organischer Biomasse einhergeht. Ob die Substanzen, die dabei primär als Substrate des Wachstums dienen (Kohlenhydrate, Aminosäuren, Nährsalze) auch regulatorische Funktion für das Wachstum übernehmen können, ist eine in der aktuellen Literatur intensiv diskutierte Frage. Wie in Kap. 9 und 10 bereits verschiedentlich erwähnt wurde, wird vor allem Nitrat bei der Regulation von Wachstum eine hohe Bedeutung beigemessen. Zum Teil werden diesem Inhaltsstoff in der Literatur sogar die Eigenschaften eines Wachstumshormons zugesprochen (Trewavas 1983).

Die putativ regulierende Funktion verschiedener in der vorliegenden Arbeit untersuchter Inhaltsstoffe wurde in Kap. 9 und 10 bereits für die speziellen Wachstumsmuster ausführlich diskutiert. Dabei wurden für Glucose (auch Fructose) und Glutamin eine Reihe von Korrelationen mit Wachstumsmustern festgestellt, die auf eine eventuelle regulatorische Funktion dieser Substanzen hindeuten. Auch in der Literatur wird für verschiedene Pflanzenarten über eine Korrelation zwischen den Gehalten von Aminosäuren und löslichen Zuckern mit den Blattwuchsraten berichtet (Buyse et al. 1996; Buyse und Merckx 1995). Darüber hinaus konnte durch Versuchsansätze mit transgenen Pflanzen gezeigt werden, dass eine Änderung im Tagesgang der Kohlenstoff-Allokation zu einer Änderung des diurnalen Wachstumsmusters von Pflanzen führen kann (Kehr et al. 1998).

Es wäre daher günstig, in zukünftigen Studien verstärkt Untersuchungen genetisch veränderter Pflanzen durchzuführen, um schlüssigere Aussagen über Regulationsketten zu gewinnen, als dies mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Wildtyp-Pflanzen möglich war.

### 11.4 Molekularbiologie

Auf molekularbiologischer Ebene wurde im Kontext der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Expression des Expansin-Gens NtExp1 untersucht, da dieses Enzym die Zellwand-Expansibilität maßgeblich beeinflusst und die Zellwandexpansibilität den aussichtsreichsten Kandidaten der biophysikalischen Regulation des Wachstums-Tagesganges darstellt. Diese Untersuchungen sollten in zukünftigen Arbeiten durch Messungen von Aktivitäten und Expansin-Mengen ergänzt werden. Zusätzlich sollen auch andere molekulare Parameter in die Analysen mit einbezogen werden.

Die durchgeführten Northern-Analysen von NtExp1 zeigen einen Tagesgang der Expression, der demjenigen des Blattwachstums sehr ähnlich ist (Kap. 7.2.6). Dies weist darauf hin, dass der Tagesgang im Blattwachstum mit der Expression dieses Gens sowie der Expansibilität der Zellwand korreliert ist:

*Die Expression von Expansin ist eine wichtige regulatorische  
Komponente des Blattwachstums-Tagesganges*

Um eine geschlossene Argumentation hinsichtlich der Regulation des Wachstums-Tagesganges durch die Expression eines Gens aufzubauen, fehlen jedoch noch viele Bindeglieder. Beispielsweise muss der ER-vermittelte Export des Genprodukts an seinen Wirkungsort bezüglich seiner Intensität und Dynamik ebenso noch untersucht werden wie die Abundanz und die Kompartimentierung des zugehörigen Proteins. Zu dieser Thematik wurden bisher in keiner anderen Arbeitsgruppe Untersuchungen angestellt (pers. Mitteilung D. Cosgrove).

Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass Pflanzen, bei denen eine Überexpression von Expansin und damit eine konstant verminderte Expansibilität erreicht werden konnte, über längere Zeit kein eindeutig verstärktes Wachstum zeigten (Cho und Cosgrove 2000). Eine erhöhte Produktion von Expansin kann also lediglich über eine gewisse Zeit hinweg (z.B. über einige Stunden während des Maximums des Tagesganges im Blattwachstum) ein wirksamer Mechanismus der Steigerung der Wachsrates sein.

### **Wie kann der Widerspruch zwischen der zeitlichen und räumlichen Expressionsverteilung von Expansin erklärt werden?**

Die zeitliche Verteilung der Expression zeigt eine positive Korrelation mit den Wachsrates: Zu Zeiten, an denen das Blatt stark wächst, wird eine besonders große Menge des Genproduktes exprimiert. Diese Aussage trifft auf die räumliche Verteilung der Expression nicht zu: Weder wird in Blattstockwerken von hoher Wachsrates eine höhere Expression gefunden als in Blättern ausdifferenzierterer Blattstockwerke, noch wird in der Blattbasis eine stärkere Expression detektiert als in der schwächer zuwachsenden Blattspitze.

**Ein denkbarer Erklärungsansatz** hierfür könnte sein, dass bei der zeitlichen Verteilung der Expression des untersuchten Expansin-Gens ein und dasselbe Gewebe betrachtet wird; bei der räumlichen Verteilung werden dagegen in ihrer Entwicklungsstufe verschiedene Gewebe betrachtet. Diese könnten im Verlauf ihrer Entwicklung ihre ‚Suszeptibilität‘ (Wu et al. 1996) für die Zellwand-erweichende Wirkung von Expansin verändert haben.

Bei Studien an Wurzeln wurde festgestellt, dass auch die Suszeptibilität einer Zellwand für Expansin reguliert sein kann (Wu et al. 1996; Wu und Cosgrove 2000). Die Suszeptibilität für Expansin könnte daher ein entscheidender Faktor für die Regulation der Beendigung von Wachstumsvorgängen des Blattes sein; sei es im Tagesgang oder auf einer größeren zeitlichen Skala. Seit längerem wird in der Literatur diskutiert, ob der Verlust der Suszeptibilität für säureinduzierte Zellwandlockerung der Grund für die Einstellung von Wachstumsvorgängen ist (Van Volkenburgh et al. 1985). Als Mechanismus der säureinduzierten Zellwandlockerung wird heute die Wirkung von Expansinen vorgeschlagen. Sollte die Suszeptibilität für expansinvermittelte Dehnungsvorgänge im Verlauf der Blattentwicklung sinken, könnte ein Absinken der Wachstumsaktivität dadurch eingedämmt werden, dass die Expression von Expansin über einen gewissen Zeitraum hinweg von der Pflanze eher gesteigert als abgesenkt wird.

Falls ein derartiger Mechanismus existiert, könnte er erklären, wieso in der vorliegenden Arbeit in Basis und Spitze trotz ihrer Entwicklungsdifferenz vergleichbare Expression registriert wurde. Ebenso könnte begründet werden, dass in noch zuwachsenden, älteren Blättern tieferer Stock-

werke eine höhere Expansin-Expression vorgefunden wird als in jüngeren Blättern höherer Stockwerke mit höheren Wuchsraten. Daraus ergibt sich folgende Hypothese:

*In Blättern sinkt die Suszeptibilität der Zellwand für Expansin im Verlauf der Entwicklung ab.*

Abschliessend sei noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen, dass

- a) eine Vielzahl weiterer Expansin-Gene existiert, die unterschiedliche Rollen in verschiedenen Geweben und Entwicklungszuständen der Zelle spielen (Cosgrove 2000) und dass
- b) Expansin bei weitem nicht die einzige Komponente der Regulationsmechanismen der Zellwand-Expansibilität darstellt. Neben der seit längerer Zeit untersuchten Wirkung von Xyloglucan-Endo-Transglycosylasen, die das Xyloglucan-Netzwerk der Zellwand beeinflussen (Pritchard et al. 1993, Xu et al. 1995, Campbell und Braam 2000), wird in jüngerer Zeit auch die Bedeutung wachstumshemmender Mechanismus hervorgehoben. Beispielsweise konnte jüngst gezeigt werden, dass der Einbau von XXFGol, einem Xyloclucyan-Derivat, in die pflanzliche Zellwand (Warneck et al. 1998) inhibierend auf deren Erweichbarkeit wirkt. Auch die regulatorische Wirkung von Peroxidasen (Chen und Schopfer 1999) zur Regulation des säureinduzierten Zellwachstums wird diskutiert.



## 12 Zusammenfassung

**Wachstum** – die irreversible Volumenzunahme eines Organs oder Gewebes – ist ein raum-zeitlich höchst dynamischer Prozess, der für Pflanzen von vielgestaltiger Bedeutung ist.

**Wachstumsmuster** der untersuchten Wurzeln und Blätter konnten mit einer erstmals erreichten Genauigkeit auf einer Zeitskala von Minuten bzw. einer Ortsskala von unter einem Millimeter automatisiert gewonnen und interpretiert werden. Dies gelang durch den Einsatz einer innovativen Bildverarbeitungsmethode (*DISP-Methode*), die im Verlauf dieser Arbeit in den botanischen Praxisbetrieb überführt wurde. Die Messungen führten auf verschiedenen pflanzenregulatorischen Ebenen zu grundlegend neuen Erkenntnissen.

Bei **Wurzeln** von Mais konnte ein zweigipfliges Maximum der Wachstumsverteilung detektiert werden, dessen Entstehung möglicherweise auf die Staffelung der raum-zeitlichen Differenzierung von Geweben zurückzuführen ist. Ein konstanter diurnaler Verlauf des Wachstums zeigte sich für die Aktivität der integriert betrachteten Wachstumszone. Circumnutatorische Wachstumsbewegungen wurden registriert, deren Periodenlängen von der externen Nährstoff-Verfügbarkeit abhingen. Für die untersuchten Inhaltsstoffe wurden keine Tagesgänge der Konzentrationsverteilungen festgestellt. Bei veränderter externer Nährstoff-Verfügbarkeit zeigte sich ein unterschiedlicher Glutamingehalt im Apikalmeristem sowie eine veränderte Wuchsratenverteilung innerhalb der Wachstumszone. Die überwiegende Zahl der Inhaltsstoffe wurde jedoch weder in Konzentration noch Deposition stark von der externen Nährstoff-Verfügbarkeit beeinflusst. In Umgebungen unterschiedlichen pH-Wertes zeigten sich dagegen veränderte Gehalte von Calcium und Magnesium (bei unveränderter Wuchsratenverteilung). Bei Temperaturerhöhung konnte eine umgehende Steigerung der Wuchsrate vor allem im Aktivitätszentrum der Wachstumsverteilung beobachtet werden.

Bei **Blättern** von Tabak und Rizinus konnte im Gegensatz zu den Wurzeln ein Tagesgang der Wachstumsaktivität mit einem Maximum am Nacht-Tag-Übergang nachgewiesen werden. Dieses Wachstumsmuster stellt wahrscheinlich einen circadianen Rhythmus dar, der selbst in isolierten Blattscheiben im Dauerlicht weiterläuft. Das Maximum des Tagesganges kann durch differentielle Temperierung von Spross und Wurzel verlagert werden. Eng mit der zeitlichen Aktivitätsverteilung des Wachstums war die Expression eines  $\alpha$ -Expansin-Gens (*NtExp1*) korreliert. Die Erweichbarkeit der Zellwand scheint daher von entscheidender Bedeutung für die Regulation des Tagesganges zu sein. Kurzfristige Wachstumserscheinungen einer Dauer von wenigen Minuten, die die Fähigkeit der Zellwand zur Re-Etablierung eines Wachstumszustandes charakterisieren, treten beim Wechsel von Licht und Dunkelheit auf und können auf Turgoränderungen zurückgeführt werden. Festgestellte nutatorische und nyctinastische Bewegungen des Blattes sind Ausdruck differentieller Wachstumsaktivität, die wahrscheinlich der Synchronisation zellulären Wachstums an unterschiedlichen Flanken der Blattader dient. Die hierbei auftretenden Kräfte können durch externe Kräfte ersetzt werden. Im Blatt kommt es zu starken Tagesgängen vieler Inhaltsstoffkonzentrationen. Vor allem Glucose und Fructose könnten Einfluss auf die Triggerung von Wachstumsprozessen haben sowie darüber hinaus von Bedeutung für das balancierte Wachstum von Ader und Intercostalfeld sein.



## 13 Ausblick

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnte eine grosse Anzahl von Hypothesen formuliert werden, die es in den kommenden Jahren in Versuchsansätzen zu überprüfen gilt. Vorzugsweise ist dabei eine **gleichzeitige Messung von Wachstumsaktivitäten und anderen Parametern der Pflanze** anzustreben. Die Resultate der vorliegenden Arbeit lassen folgende Untersuchungen als besonders interessant erscheinen:

Die lokalisierte Aufnahme von Ionen aus der Nährlösung in die Wurzel hinein kann mit Hilfe von ionenspezifischen Mikroelektroden überprüft und mit den durch die DISP-Methodik vermessenen Wachstumsmustern der Transversal-Oszillationen korreliert werden.

Anatomische Studien zur Zelldifferenzierung in der Wurzel sind unabdingbar, um die Rolle der Differenzierung von Phloem und Xylem für die Ausprägung des Wachstumsmaximums in der Wurzel zu untersuchen. Hierfür wären sicher auch Analysen verschiedener molekularbiologisch-biochemischer Einflussgrößen, wie etwa der Invertase-Aktivität, gewinnbringend.

Ein wichtiger Versuchsansatz ist die Reporteranalyse mit Hilfe von bildverarbeitenden Methoden. Die Expression von GFP kann in vivo durch optische Signale quantifiziert werden. Daher wird es bald möglich sein, auch molekularbiologische Prozesse mit Hilfe von Bildanalysetechniken am lebenden Objekt studieren zu können. Transiente Expressionsmuster von GFP-gekoppelten Proteinen (z.B. Chytilova et al. 1999) gleichzeitig zur Vermessung von Wuchsraten zu studieren, würde einen immensen Erkenntnisgewinn für verschiedenste Fragestellungen bedeuten, sei es im Hinblick auf regulatorische Prozesse der Zellteilung oder des pflanzlichen Metabolismus.

Die Auswirkungen der tageszeitlichen Variation von Kohlenhydraten auf das Wachstum könnten mit Hilfe von transgenen Pflanzen, in denen z.B. die Stärkesynthese unterdrückt ist, besser studiert werden.

Weitere Untersuchungen der Expansin-Regulation bezüglich der intrazellulären Kompartimentierung, der Aktivität am Wirkungsort (in der Zellwand), sowie unterschiedlicher Isoformen müssen durchgeführt werden, um Klarheit über die Rolle der Zellwand für die Ausprägung von Wachstumsrhythmen zu erlangen.

Biomechanische Analysen von Blättern und deren Gewebeeigenschaften sind dringend notwendig, um zu einem besseren Verständnis von Wachstumsmustern zu kommen. Über die Biomechanik von Pflanzen ist bislang nur sehr wenig bekannt. Hier könnte ein erster Versuchsansatz die Registrierung der Dynamik der Mittelrippenkrümmung von Blättern sein, nachdem (zu verschiedenen Zeitpunkten des Tages) die angrenzenden Intercostalfelder entfernt wurden. Dadurch könnte ein Tagesgang der Gewebespannung erhalten werden.

Um den Einfluss des Turgors auf Wachstumseffekte zu klären, wäre es notwendig, während laufender DISP-Messungen den Turgor mit einer Zelldrucksonde parallel zu analysieren.

Die Rolle der Variation der stomatären Leitfähigkeit für die Regulation von Wachstum könnte erfasst werden, indem DISP-Messungen mit thermografischen Bildanalysen gekoppelt werden, die eine flächig aufgelöste Messung der Wasserverdunstung auf dem Blatt erlauben.

Die Rolle verschiedenster Wachstumselicitoren, wie etwa Phytohormonen, könnte mit Hilfe des Blattscheibensystems getestet und quantitativ untersucht werden. Dieses System birgt aufgrund seiner reduktionistischen Natur allgemein ein sehr grosses Analysepotential in sich.

Messungen des Transports im Fernleitungssystem könnten mit Wuchsanalysen verknüpft werden, um mehr über die Interaktion von Spross und Wurzel zu erfahren.

Das gesamte Potential der Variabilität von Wachstumsmustern könnte unter dem Einfluss hochgradig variierender externer Parametern erfasst werden. Hierfür wäre eine Reihe von denkbaren Experimenten im Freiland sinnvoll.

Umgekehrt ist die statistisch fundierte Erfassung intraspezifischer und interspezifischer Variabilitäten, speziell im Bereich der Inhaltsstoffmessungen, eine absolute Notwendigkeit, um bezüglich feiner aufgelöster Messungen zu signifikanten Aussagen zu kommen.

Für die Untersuchung vieler der angesprochenen Punkte wäre eine **weitere methodische Verbesserung der DISP-Analysetechnik** wünschenswert. Diesbezüglich wären vor allem die folgenden Punkte zu nennen:

Eine Steigerung des Durchsatzes von Pflanzen, die während einer Aufnahme untersucht werden können, wäre besonders gewinnbringend. Es ist denkbar, dass Verschiebetischaufbauten eine gleichzeitige Vermessung mehrerer Dutzend Pflanzen (Blätter, Blattscheiben oder Wurzeln) mit einer Kamera erlauben. Für ein kontrolliertes Verschieben der Kameraposition steht genügend Zeit zwischen den einzelnen Aufnahmen zur Verfügung; die eigentliche Messzeit ist gering; zwischen zwei Messungen können mehrere Minuten liegen.

Im Hinblick auf kleinräumigere Analysen wäre es besonders nützlich, das Schicksal von Einzelzellen im Gewebeverband zu studieren. Hierfür wäre lediglich eine durch die Bewegung von Grauwertmustern des Blattes getriggerte Verschiebung der Kameraposition notwendig, wie sie im Wurzelbeobachtungsaufbau bereits während der vorliegenden Arbeit realisiert werden konnte. Mit Hilfe dieser Technik könnte es dann auch gelingen, die unterschiedliche zeitliche Dynamik der cytologischen Entwicklung während der Zellstreckung von Blatt- und Wurzelzellen zu analysieren.

Zwei weitere methodische Verbesserungen, die nicht weit entfernt liegen, sind die Online-Analyse der Bildsequenzen, mit deren Hilfe auch fleckenhaft verteilten Größen in aussagekräftiger Art und Weise beprobt werden könnten, sowie die Vermessung unfixierter, frei wachsender Organe, beispielsweise mit Hilfe der Streifenlichtprojektor-Methode.

Wenn die angesprochenen Entwicklungen Realität werden, könnte die Analyse von Wachstumsmustern für die Pflanzenphysiologie einen sehr hohen Stellenwert einnehmen.

Aufgrund des offenen Bauplans der Pflanzen zeigen sich viele ihrer Regulationskaskaden durch Wachstumsmuster an ihrer Oberfläche. Diese zu entziffern ist einerseits aufgrund der Komplexität und Vernetztheit der pflanzlichen Wirkungsweise eine ungeheuer schwierige Herausforderung, andererseits aber auch ein spannendes Gebiet, in dem es viele offene Fragen gibt, die darauf warten, beantwortet zu werden.

## 14 Literatur

- Acevedo E., Fereres E., Hsiao T.C. & Henderson D.W. (1979)** Diurnal growth trends, water potential and osmotic adjustment of maize and *Sorghum* leaves in the field. *Plant Physiology*, **64**, 476-480.
- Antonsen F., Johnsson A., Perbal G. & Driss-Ecole D. (1995)** Oscillatory growth movements of roots in weightlessness. *Physiologia Plantarum* **95**, 596-603.
- Antosiewicz D.M., Polisensky D.H., & Braam J. (1995)** Cellular localization of the Ca<sup>2+</sup> binding TCH3 protein of *Arabidopsis*. *Plant Journal* **8**, 623-636.
- Arney S. E. (1954)** Studies of growth and development in the genus *Fragaria*; III. The growth of leaves and shoot; *Annals of Botany* **18**; 349-365.
- Askenasy E. (1880)** Über eine neue Methode, um die Vertheilung der Wachstumsintensität in wachsenden Theilen zu bestimmen. *Verh. Naturh.-medic. Ver. Heidelberg* **2**, 70-153.
- Avery G.S. (1933)** Structure and development of tobacco leaves. *American Journal of Botany* **20**, 565-592.
- Barlow P.W., Parker J.S., Butler R. & Brain P. (1993)** Gravitropism of primary roots of *Zea mays* L. at different displacement angles. *Annals of Botany* **71**, 383-388.
- Barlow P.W., Rathfelder E.L. (1985)** Distribution and redistribution of extension growth along vertical and horizontal gravireacting maize roots. *Plant Physiology* **165**, 134-141.
- Barron J.L. & Liptay A. (1997)** Measuring 3-D plant growth using optical flow. *Bioimaging* **5**, 82-86.
- Bazzanella A., Lochmann H., Mainka A. & Bächmann K. (1997)** Determination of inorganic anions, carboxylic acids and amino acids in plant matrices by capillary electrophoresis. *Chromatographia* **45**, 59-62.
- Beemster G.T.S. & Baskin T.I. (1998)** Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **116**, 1515-1526.
- Beemster G.T.S. & Masle J. (1996)** Effects of soil resistance to root penetration on leaf expansion in wheat (*Triticum aestivum* L.): composition, number and size of epidermal cells in mature blades. *Journal of Experimental Botany* **47**, 1651-1662.
- Beemster G.T.S., Masle J., Williamson R.E. & Farquhar G.D. (1996)** Effects of soil resistance to root penetration on leaf expansion in wheat (*Triticum aestivum* L.): Kinematic analysis of leaf elongation. *Journal of Experimental Botany* **47**, 1663-1678.
- Bengough A.G. & MacKenzie C.J. (1994)** Simultaneous measurement of root force and elongation for seedling pea roots. *Journal of Experimental Botany* **45**, 95-102.
- Bernstein N., Silk W. K., Läuchli A. (1995)** Growth and development of *sorghum* leaves under conditions of NaCl stress: a possible role of some mineral elements in growth inhibition. *Planta* **196**, 699-705.
- Bibikova T.N., Zhigilei A., Gilroy S. (1997)** Root hair growth in *Arabidopsis thaliana* is directed by calcium and an endogenous polarity. *Planta* **203**, 495-505.

- Bigün J. & Granlund G.H. (1987)** Optimal orientation detection of linear symmetry. *Proceedings of the First International Conference on Computer Vision, ICCV*, London, UK, June 8-11, 1987.
- Björkman T., Cleland R.E. (1991)** The role of extracellular free-calcium gradients in gravitropic signalling in maize roots. *Planta* **185**, 379-384.
- Boyer J.S. (1968)** Relationship of water potential to growth of leaves. *Plant Physiology*, **43**, 1056-1062.
- Boyer J.S. (1985)** Water transport. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **36**, 473-516.
- Braam J., Sistrunk M.L., Polisensky D.H., Xu W., Purugganan M.M., Antosiewicz D.M., Campbell P. & Johnson K.A. (1997)** Plant responses to environmental stress: Regulation and functions of the *Arabidopsis* TCH genes. *Planta* **203**, 35-41.
- Brauner L. & Bünning E. (1930)** Geoelektrischer Effekt und Elektrotropismus. *Berichte der deutschen Botanischen Gesellschaft* **52**, 470-476.
- Brumfield R.T. (1942)** Cell growth and division in living root meristems. *American Journal of Botany* **29**, 533-543.
- Buff E., Baake M., & Sievers A. (1987)** An empirical function for the description of root growth. *Plant Physiology* **83**, 685-690.
- Bunce, J.A. (1977)** Leaf elongation in relation to leaf water potential in soybean. *Journal of Experimental Botany* **28**, 156-161.
- Bünning E. & Moser I. (1966)** Response-Kurven bei der circadianen Rhythmik von *Phaseolus*. *Planta* **69**, 101-110.
- Bünning E. (1948)** *Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze*. Springer, Berlin
- Buyse J. & Merckx R. (1995)** Diurnal variations in growth rate and growth substrate levels of spinach (*Spinacea oleracea* L.) under nitrogen-limiting conditions. *Plant, Cell and Environment* **18**, 1419-1425.
- Buyse J., Van den Broeck H. & Merckx R. (1996)** The effect of different levels of N limitation on sugars, amino acids, growth and biomass partitioning in broadbean (*Vicia faba* L.). *Annals of Botany* **78**, 39-44.
- Campbell P. & Braam J. (2000)** Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. *Trends in Plant Sciences* **4**, 361-366.
- Cardon Z.G., Mott K.A. & Berry J.A. (1994)** Dynamics of patchy stomatal movements and their contribution to steady-state and oscillating stomatal conductance calculated using gas-exchange techniques. *Plant, Cell and Environment* **17**, 995-1007.
- Caré A.F., Nefed'ev L., Bonnet B., Millet B. & Badot P.M. (1998)** Cell elongation and revolving movement in *Phaseolus vulgaris* L. twining shoots. *Plant and Cell Physiology* **39**, 914-921.

- Cashmore A.R. (1998)** The cryptochrome family of blue/UV-A photoreceptors. *Journal of Plant Research* **111**, 267-270.
- Chen S.X. & Schopfer P. (1999)** Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry* **260**, 726-735.
- Cho H.T. & Cosgrove D.J. (2000)** Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Science* **97**, 9783-9788.
- Christ R.A. (1978a)** The elongation rate of wheat leaves. I. The elongation rates during night and day. *Journal of Experimental Botany* **29**, 603-610.
- Christ R.A. (1978b)** The elongation rate of wheat leaves. II. Effect of sudden light change on the elongation rate. *Journal of Experimental Botany* **29**, 603-618.
- Chytilova E., Macas J., & Galbraith D.W. (1999)** Green fluorescent protein targeted to the nucleus, a transgenic phenotype useful for studies in plant biology. *Annals of Botany* **83**, 645-654.
- Clarkson D.T. (1984)** Calcium transport between tissues and its distribution in the plant. *Plant, Cell and Environment* **7**, 449-456.
- Clarkson D.T. (1985)** Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Annual Review of Plant Physiology* **36**, 77-115.
- Colmer T.D., Bloom A.J. (1998)** A comparison of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  net fluxes along roots of rice and maize. *Plant, Cell and Environment* **21**, 240-246.
- Cosgrove D.J. & Hedrich R. (1991)** Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* **186**, 143-153.
- Cosgrove D.J. (1981)** Analysis of the dynamic and steady-state responses of growth rate and turgor pressure to changes in cell parameters. *Plant Physiology* **68**, 1439-1446.
- Cosgrove D.J. (1986)** Biophysical control of plant cell growth. *Annual Review of Plant Physiology* **37**, 377-405.
- Cosgrove D.J. (1998)** Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiology* **118**, 333-339.
- Cosgrove D.J. (1999)** Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 391-417.
- Cosgrove D.J. (2000)** New genes and new biological roles for expansins. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 73-78.
- Coutand C., Julien J., Moulia B., Mauget J. & Guitard D. (2000)** A biomechanical analysis of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation. II. Local strain sensing and spatial integration of the signal. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1825-1842.

- Cramer G.R., Epstein E. & Läuchli A. (1988)** Kinetics of root elongation of maize in response to short-term exposure to sodium chloride and elevated calcium. *Journal of Experimental Botany* **39**, 1513-1522.
- Darwin C. (1880)** *The power of movements in plants*. Murray, London (Wiederveröffentlichung 1966. DaCapo Press, New York)
- Davies W.J. & Van Volkenburgh E. (1983)** The influence of water deficit on the factors controlling the daily pattern of growth of *Phaseolus trifoliate*s. *Journal of Experimental Botany* **34**, 987-999.
- Davies W.J. & Zhang J. (1991)** Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 55-76.
- Delhon P., Gojon A., Tillard P. & Passama L. (1995a)** Diurnal regulation of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake in soybean plants. I. Changes in NO<sub>3</sub><sup>-</sup> influx, efflux, and N utilization in the plant during the day/night cycle. *Journal of Experimental Botany* **46**, 1585-1594.
- Delhon P., Gojon A., Tillard P. & Passama L. (1995b)** Diurnal regulation of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake in soybean plants. II. Relationship with accumulation of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and asparagin in the roots. *Journal of Experimental Botany* **46**, 1595-1602.
- Delhon P., Gojon A., Tillard P. & Passama L. (1996a)** Diurnal regulation of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake in soybean plants. III. Implication of Dijkshorn-Ben Zioni model in relation with the diurnal changes in NO<sub>3</sub><sup>-</sup> assimilation. *Journal of Experimental Botany* **47**, 885-892.
- Delhon P., Gojon A., Tillard P. & Passama L. (1996b)** Diurnal regulation of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake in soybean plants. IV. Dependence on current photosynthesis and sugar availability to the roots. *Journal of Experimental Botany* **47**, 893-900.
- Delmer D.P. (1999)** Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 245-276.
- Deng M.D., Moureaux T., Leydecker M.T. & Caboche M. (1990)** Nitrate-reductase expression is under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves. *Planta* **180**, 257-261.
- Dewar R.C. (1993)** A root-shoot partitioning model based on carbon-nitrogen-water interactions and Münch phloem flow. *Functional Ecology* **7**, 356-368.
- Dose W. (1914)** Beiträge zur Anatomie der Kotyledonen und Primärblätter. Inaugural-Dissertation. Göttingen
- Dowson-Day M.J. & Millar A.J. (1999)** Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **17**, 63-71.
- Durand J.L., Onillon B., Schnyder H. & Rademacher I. (1995)** Drought effects on cellular and spatial parameters of leaf growth in tall fescue. *Journal of Experimental Botany* **46**, 1147-1155.
- Durand R. & Bellon N. (1994)** The Influence of the growth media and mineral nutrition on corn root hydrogen / bicarbonate releases and rhizosphere pH. *Journal of Plant Nutrition* **17**, 817-838.

- Edwards K.L., Scott T.K. (1974)** Rapid growth response of corn root segments: effects of pH on elongation. *Planta* **119**, 27-37.
- Else M.A. & Jackson M.B. (1998)** Transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in the transpiration stream of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in relation to foliar ethylene production and petiole epinasty. *Australian Journal of Plant Physiology* **25**, 453-458.
- Elzenga T.M., Prins H.B.A. & Van Volkenburgh E. (1995)** Light-induced membrane potential changes of epidermal and mesophyll cells in growing leaves of *Pisum sativa*. *Planta* **197**, 127-134.
- Erickson R. O. & Michelini F. J. (1957)** The Plastochron Index. *American Journal of Botany* **44**, 297-305.
- Erickson R.O. (1976)** Modeling of plant growth. *Annual Review of Plant Physiology* **27**, 407-434.
- Erikson R.O. & Sax K.W. (1956)** Experimental growth rate of primary root of *Zea mays*. *Proceedings of the American Philosophical Society* **100**, 487-498.
- Farrar J.F. (1993)** Sink strength: what is it and how do we measure it? *Plant, Cell and Environment* **16**, 1015-1018.
- Farrar J.F., Minchin P.E.H. & Thorpe M.R. (1995)** Carbon import into barley roots: Effects of sugars and relation to cell expansion. *Journal of Experimental Botany* **46**, 1859-1865.
- Felle H.H. (1988)** Cytoplasmic free calcium in *Riccia fluitans* L. and *Zea mays* L.: interaction of Ca<sup>2+</sup> and pH ? *Planta* **176**, 248-255.
- Felle H.H. (1998)** The apoplastic pH of *Zea mays* root cortex as measured with pH-sensitive microelectrodes: aspects of regulation. *Journal of Experimental Botany* **49**, 987-995.
- Ferguson I.B. & Clarkson D.T. (1976)** Simultaneous uptake and translocation of magnesium and calcium in barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Planta* **128**, 267-269.
- Fleming A.J., McQueen-Mason S., Mandel T. & Kuhlemeier C. (1997)** Induction of leaf primordia by the cell wall protein expansin. *Science* **276**, 1415-1418.
- Fortin M.C., Poff K.L. (1991)** Characterization of thermotropism in primary roots of maize: Dependence on temperature and temperature gradient, and interaction with gravitropism. *Planta* **184**, 410-414.
- Foster A.S. (1936)** Leaf Differentiation in Angiosperms. *The Botanical Review* **2**, 349-372.
- Frensch J. & Hsiao T.C. (1994)** Transient responses of cell turgor and growth of maize roots as affected by changes in water potential. *Plant Physiology* **104**, 247-254.
- Frensch J., Hsiao T.C. & Steudle E. (1996)** Water and solute transport along developing maize roots. *Planta* **198**, 348-355.
- Fricke W., Leigh R.A. & Tomos A.D. (1994)** Epidermal solute concentrations and osmolality in barley leaves studied at the single-cell level – changes along the leaf blade, during leaf aging and NaCl stress. *Planta* **192**, 317-323.

- Galston A.W., Tuttle A.A. & Penny P.J. (1964)** A kinetic study of growth movements and photomorphogenesis in etiolated pea seedlings. *American Journal of Botany* **51**, 853-858.
- Gandar P.W. & Hall A.J. (1988)** Estimating position-time relationships in steady-state, one-dimensional growth zones. *Planta* **175**, 121-129.
- Gandar P.W. & Rasmussen H. (1991)** Growth pattern and movement of epidermal cells within leaves of *Asphodelus tenuifolius* Cav. *Annals of Botany* **68**, 307-315.
- Gausman H.W. & Allen W.A. (1973)** Optical parameters of leaves of 30 plant species. *Plant Physiology* **52**, 57-62.
- Geiger D.R., Servaites J.C. & Fuchs M.A. (2000)** Role of starch in carbon translocation and partitioning at the plant level. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**, 571-582.
- 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.
- Gerthsen (1986)** *Physik* (Hrsg. Gerthsen, Kneser, Vogel). Springer-Verlag Heidelberg, 15. Auflage
- Goodwin R.H. & Stepka W. (1945)** Growth and differentiation in the root tip of *Phleum pratense*. *American Journal of Botany* **32**, 36-46.
- Gordon D.C., Hettiaratchi D.R.P., Bengough A.G. & Young I.M. (1992)** Non-destructive analysis of root growth in porous media. *Plant, Cell and Environment* **15**, 123-128.
- Gradmann H. (1922)** Die Fünfphasenbewegung der Ranken. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik* **61**, 169-204.
- Granier C. & Tardieu F. (1998)** Spatial and temporal analysis of expansion and cell cycle in sunflower leaves. *Plant Physiology* **116**, 991-1001.
- Green P.B. (1980)** Organogenesis - a biophysical viewpoint. *Annual Review of Plant Physiology* **31**, 51-82.
- Green P.B. (1992)** Pattern formation in shoots: a likely role for minimal energy configurations of the tunica. *International Journal of Plant Sciences* **153**, 59-75.
- Green P.B. (1994)** Connecting gene and hormone action to form, pattern and organogenesis: biophysical transductions. *Journal of Experimental Botany* **45**, 1775-1788.
- Green P.B. (1997)** Expansin and morphology: A role for biophysics. *Trends in Plant Sciences* **2**, 365-366.
- Hannam R.V. (1968)** Leaf growth and development in the young tobacco plant. *Australian Journal of Biological Sciences* **21**, 855-870.
- Hansen G.K. (1977)** Adaption to photosynthesis and diurnal oscillation of root respiration rates for *Lolium multiflorum*. *Physiologia Plantarum* **39**, 275-279.
- Hansen G.K. (1980)** Diurnal variation of root respiration rates and nitrate uptake as influenced by nitrogen supply. *Physiologia Plantarum* **48**, 421-427.

- Hasenstein K.H. (1991)** Measurement of circumnutation in maize roots. *Microgravity Science and Technology* **4**, 262-266.
- Haußecker H. & Spies H. (1999)** Motion. In: *Handbook of computer Vision and Applications* (Hrsg. B. Jähne, H. Haußecker und P. Geißler), Academic Press, San Diego, CA, USA, 310-369.
- Hay J.O., Moulia B., Lane B., Freeling M. & Silk W.K. (2000)** Biomechanical analysis of the Rolled (Rld) leaf phenotype of maize. *American Journal of Botany* **87**, 625-633.
- Head G.C. (1965)** Studies of diurnal changes in cherry root growth and nutational movements of apple root tips by time-lapse cinematography. *Annals of Botany* **29**, 219-224.
- Heathcote D.G. (1966)** A new type of rhythmic plant movement: Micronutation. *Journal of Experimental Botany* **17**, 690-695.
- Heckenberger U. (1996)** Auswirkung von Trockenstress auf morphologische und physiologische Prozesse während der Blattentwicklung von *Ricinus communis*. Inaugural-Dissertation. Heidelberg
- Heckenberger U., Roggatz U., & Schurr U. (1998)** Effect of drought stress on cytological status of *Ricinus communis*. *Journal of Experimental Botany* **49**, 181-189.
- Hecks E., Hejnowicz Z. & Sievers A. (1992)** Spontaneous oscillations of extracellular electrical potentials measured on *Lepidium sativum* L. roots. *Plant, Cell and Environment* **15**, 115-121.
- Hedrich R. & Dittrich P. (1996)** Plant K<sup>+</sup> channels: similarity and diversity. *Botanica Acta* **109**, 94-101.
- Hejnowicz, Z. & Karczewski, J (1993)** Modelling of the meristematic growth of root apices in a natural co-ordinate system. *American Journal of Botany* **80**, 309-315.
- Herbert T.J. (1992)** Geometry of heliotropic and nyctinastic leaf movements. *American Journal of Botany* **79**, 547-550.
- Herdel K., Schmidt P., Feil R., Mohr A. & Schurr U. (2001)** Dynamics of concentrations and nutrient fluxes in the xylem of *Ricinus communis* – diurnal course, impact of nutrient availability and nutrient uptake. *Journal of Experimental Botany*, im Druck.
- Herrmann A. & Felle H. (1995)** Tip growth in root hair cells of *Sinapis alba* L.: significance of internal and external Ca<sup>2+</sup> and pH. *New Phytologist* **129**, 523-533.
- Hoffland E., Van den Boogaard R., Nelemans J. & Findegg G. (1992)** Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved plants. *New Phytologist* **122**, 675-680.
- Hsiao T.C. & Xu L.K. (2000)** Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1595-1616.
- Hu Y. & Schmidhalter U. (1998)** Spatial distributions and net deposition rates of mineral elements in the elongating wheat leaf under saline soil conditions. *Planta* **204**, 212-219.
- Huber S.C. (1986)** Fructose 2,6-bisphosphate as a regulatory metabolite in plants. *Annual Review of Plant Physiology* **37**, 233-246.

- Hunt J. (1982)** Dilute hydrochloric acid extraction of plant material for routine cation analysis. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **13**, 49-55.
- Huppe H.C. & Turpin D.H. (1994)** Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**, 577-607.
- Iijima M., Oribe Y., Horibe Y. & Kono Y. (1998)** Time lapse analysis of root elongation rates of rice and sorghum during the day and night. *Annals of Botany* **81**, 603-607.
- Im K.H., Cosgrove D.J. & Jones A.M. (2000)** Subcellular localization of expansin mRNA in xylem cells. *Plant Physiology* **123**, 463-470.
- Ingestad T. (1982)** Relative addition rate and external concentration; Driving variables used in plant nutrition research. *Plant, Cell and Environment* **5**, 443-453.
- Jaffe M.J. (1973)** Thigmomorphogenesis: the response of plant growth and development to mechanical stimulation. *Planta* **114**, 143-157.
- Jarvis M.C. (1982)** The proportion of calcium-bound pectin in plant cell walls. *Planta* **154**, 344-346.
- Jeschke W.D., Stelter W. (1976)** Measurement of the longitudinal ion profiles in single roots of *Hordeum* and *Atriplex* by use of flameless atomic absorption spectroscopy. *Planta* **128**, 107-112.
- Jiang Z. & Staude W. (1989)** An interferometric method for plant growth measurements. *Journal of Experimental Botany* **40**, 1169-1173.
- Johnsson A. & Heathcote D. (1973)** Experimental evidence and models on circumnutations. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **70**, 371-405.
- Jones D.L., Shaff J.E. & Kochian L.V. (1995)** Role of calcium and other ions in directing root hair tip growth in *Linum catharticum*. *Planta* **197**, 672-680.
- Jones M.G.K., Outlaw W.H., Lowry O.H. (1977)** Enzymatic assay of  $10^{-7}$  to  $10^{-14}$  moles of sucrose in plant tissues. *Plant Physiology* **60**, 379-383.
- Jouve L., Gaspar T., Kevers C., Greppin H. & Agosti R.D. (1999)** Involvement of indole-3-acetic acid in the circadian growth of the first internode of *Arabidopsis*. *Planta* **209**, 136-142.
- Jouve L., Greppin H., & Agosti R.D. (1998)** *Arabidopsis thaliana* floral stem elongation: Evidence for an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**, 469-472.
- Kehr J., Hustiak F., Walz C., Willmitzer L. & Fisahn J. (1998)** Transgenic plants changed in carbon allocation pattern display a shift in diurnal growth pattern. *The Plant Journal* **16**, 497-503.
- Keller E. & Cosgrove D.J. (1995)** Expansins in growing tomato leaves. *The Plant Journal* **8**, 795-802.
- Kemp D.R. (1981)** The growth rate of wheat leaves in relation to the extension zone sugar concentration manipulated by shading. *Journal of Experimental Botany* **32**, 141-150.
- Kende H. & Zeevaart J.A.D. (1997)** The five classical plant hormones. *The Plant Cell* **9**, 1197-1210.

- Kny L. (1902)** Ueber den Einfluss von Zug und Druck auf die Richtung der Scheidewände in sich theilenden Pflanzenzellen. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik* **37**, 55-98.
- Koch K.E., Zeng Y., Wu Y. & Avigne W.T. (2000)** Multiple paths of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. *Journal of Experimental Botany* **51**, 417-427.
- Kondo T. & Ishiura M. (1999)** The circadian clocks of plants and cyanobacteria. *Trends in Plant Sciences* **4**, 171-176.
- Koukkari W.L., Bingham C., Hobbs J.D. & Duke S.H. (1997)** In search of a biological hour. *Journal of Plant Physiology* **151**, 352-357.
- Kristie D.M. & Jolliffe P.A. (1986)** High-resolution studies of growth oscillations during stem elongation. *Canadian Journal of Botany* **64**, 2399-2405.
- Kutschera U. (1992)** The role of the epidermis in the control of elongation growth in stems and coleoptiles. *Botanica Acta* **105**, 246-252.
- Lang B. & Kaiser W.M. (1994)** Solute content and energy status of roots of barley plants cultivated at different pH on nitrate- and ammonium-nitrogen. *New Phytologist* **128**, 451-459.
- Larcher W. (1994)** *Ökophysiologie der Pflanzen*. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart. Fünfte Auflage
- Lecharyn A., Schwall M. & Wagner E. (1985)** Stem extension rate in light-grown plants. *Plant Physiology* **79**, 625-629.
- Leister D., Varotto C., Pesaresi P., Niwergall A. & Salamini F. (1999)** Large-scale evaluation of plant growth in *Arabidopsis thaliana* in non-invasive image analysis. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**, 671-678.
- Link B.M. & Cosgrove D.J. (1998)** Acid growth response and  $\alpha$ -expansins in suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. cv. BY2. *Plant Physiology* **118**, 907-916.
- Lockhart J.A. (1965)** An analysis of irreversible plant cell elongation. *Journal of Theoretical Biology* **8**, 264-275.
- Long C.A. (1994)** Leonardo da Vinci's rule and fractal complexity in dichotomous trees. *Journal of Theoretical Biology* **167**, 107-113.
- Lovelock J. (1982)** *Gaia: A new look at life on earth*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Lüning K. (1994)** Circadian growth rhythm in juvenile sporophytes of *Laminariales* (Phaeophyta). *Journal of Phycology* **30**, 193-199.
- Lüning K., Titlyanov E.A., & Titlyanova T.V. (1997)** Diurnal and circadian periodicity of mitosis and growth in marine macroalgae: III. The red alga *Porphyra umbilicalis*. *European Journal of Phycology* **32**, 167-173.
- Magnani F. & Grace J. (2000)** Plants as self-organising systems. In: *Leaf Development and Canopy Growth* (Hrsg. B.Marshall & J.Roberts), Sheffield Academic Press, Sheffield. 36-58.

- Magnani F., Mencuccini M. & Grace, J. (1999)** Age-related decline in stand productivity: the role of structural acclimation under hydraulic constraints. *Plant, Cell and Environment* **23**, 251-263.
- Mäkelä A. & Sievänen R.P. (1987)** Comparison of two shoot-root partitioning models with respect to substrate utilization and functional balance. *Annals of Botany* **59**, 129-140.
- Maksymowych R (1973)** *Analysis of leaf development*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Margolis H., Oren R., Whitehead D. & Kaufmann M.R. (1995)** Leaf area dynamics of conifer forests. In: *Ecophysiology of Coniferous Forests* (eds. W.K. Smith & T.M. Hinckley), Academic Press, San Diego, USA, 181-223.
- Marschner H. (1995)** *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, Harcourt, Brace, and Co., London.
- Martinoia E. & Rentsch D. (1994)** Malate compartmentation – responses to a complex metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**, 447-467.
- Masle J., Farquhar G.D. & Gifford R.M. (1990)** Growth and carbon economy of wheat seedlings as affected by soil resistance to penetration and ambient partial pressure of carbon dioxide. *Australian Journal of Plant Physiology* **17**, 465-487.
- Matt P., Schurr U., Klein D., Krapp A. & Stitt M. (1998)** Growth of tobacco in short-day conditions leads to high starch, low sugars, altered diurnal changes in the Nia transcript and low nitrate reductase activity and inhibition of amino acid synthesis. *Planta* **207**, 27-41.
- McDonald A.J.S. & Davies W.J. (1996)** Keeping in touch: responses of the whole plant to deficits in water and nitrogen supply. *Advances in Botanical Research* **22**, 229-300.
- McDonald A.J.S., Stadenberg I. & Sands R. (1992)** Diurnal variation in extension growth of leaves of *Salix viminalis*. *Tree Physiology* **11**, 123-132.
- McQueen-Mason S. & Cosgrove D.J. (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 D.M. & Cosgrove (1992)** Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. *Plant Cell* **4**, 1425-1433.
- Meiri, A., Silk, W. & Läuchli, A. (1992)** Growth and deposition of inorganic nutrient elements in developing leaves of *Zea mays* L.. *Plant Physiology* **99**, 972-978.
- Messerli M. & Robinson K.R. (1997)** Tip localized Ca<sup>2+</sup> pulses are coincident with peak pulsatile growth rates in pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *Journal of Cell Science* **110**, 1269-1278.
- Minchin P.E.H., Thorpe M.R. & Farrar J.F. (1993)** A simple mechanistic model of phloem transport which explains sink priority. *Journal of Experimental Botany* **44**, 947-955.
- Moore R.C., Flecker D. & Cosgrove D.J. (1995)** Expansin action on cells with tip growth and diffuse growth. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* 21A, 457 (Abstract J5-312)

- Morris A. K. & Silk W. K. (1992)** Use of a flexible logistic function to describe axial growth of plants. *Bulletin of Mathematical Biology* **54**, 1069-1081.
- Morris D.A. & Arthur E.D. (1984)** An association between acid invertase activity and cell growth during leaf expansion in *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany* **35**, 1369-1379.
- Moulija B. (2000)** Leaves as shell structures: double curvature, auto-stresses, and minimal mechanical energy constraints on leaf rolling in grasses. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**, 19-30.
- Mühling K.H. & 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 K.H. (1998)** Charakterisierung der Ionenverhältnisse im Apoplasten von Blättern mit Hilfe der bildverarbeitenden ratiometrischen Fluoreszenz-Mikroskopie. Inaugural-Dissertation. Kiel.
- Mühling K.H., Plieth C., Hansen U.P. & Sattelmacher B. (1995)** Apoplastic pH of intact leaves of *Vicia faba* as influenced by light. *Journal of Experimental Botany* **46**, 377-382.
- Mullen J.L., Turk E., Johnson K., Wolverson C., Ishikawa H., Simmons C., Söll D. & Evans M.L. (1998)** Root-growth behaviour of the *Arabidopsis* mutant rgr1. *Plant Physiology* **118**, 1139-1145.
- Muller B. & Touraine B. (1992)** Inhibition of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. *Journal of Experimental Botany* **43**, 617-623.
- Neily W.G., Hicklenton P.R., & Kristie D.N. (1997)** Temperature and developmental stage influence diurnal rhythms of stem elongation in snapdragon and zinnia. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **122**, 778-783.
- Neumann G. & Roemheld V. (1999)** Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* **211**, 121-130.
- Ney D. & Pilet P.E. (1981)** Nutation of growing and georeacting roots. *Plant, Cell and Environment* **4**, 339-343.
- Nicol F. & Höfte H. (1998)** Plant cell expansion: scaling the wall. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 12-17.
- Nielsen T.H., & Ulvskov P. (1992)** Cytokinins and leaf development in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). II. Sink metabolism in relation to cytokinin-promoted leaf expansion. *Planta* **188**, 78-84.
- Nielsen T.H., & Veierskov B. (1990)** Regulation of carbon partitioning in source and sink leaf parts in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Plant Physiology* **93**, 637-641.
- Nultsch W. (1996)** Botanik. Thieme-Verlag Stuttgart.
- Okada K. & Shimura Y. (1990)** Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* **250**, 274-276.
- Pahlavanian A.M. & Silk W.K. (1988)** Effect of temperature on spatial and temporal aspects of growth in the primary maize root. *Plant Physiology* **87**, 529-532.

- Pardossi A., Pritchard J., & Tomos A.D. (1994)** Leaf illumination and root cooling inhibit bean leaf expansion by decreasing turgor pressure. *Journal of Experimental Botany* **45**, 415-422.
- Passioura J.B. & Fry S.C. (1992)** Turgor and cell expansion: beyond the Lockhart equation. *Australian Journal of Plant Physiology* **19**, 565-576.
- Passioura J.B. & Gardner P.A. (1990)** Control of leaf expansion in wheat seedlings growing in drying soil. *Australian Journal of Plant Physiology* **17**, 149-157.
- Penny D., Penny P. & Marshall D.C. (1974)** High resolution measurement of plant growth. *Canadian Journal of Botany* **52**, 959-969.
- Peters W.S. & Felle H. (1999)** The correlation of profiles of surface pH and elongation growth in maize roots. *Plant Physiology* **121**, 905-912.
- Peters W.S. & Tomos A.D. (2000)** The mechanic state of „inner tissue“ in the growing zone of sunflower hypocotyls and the regulation of its growth rate following excision. *Plant Physiology* **123**, 605-612.
- Phillipar K., Fuchs I., Luethen H., Hoth S., Bauer C.S., Haga K., Thiel G., Ljung K., Sandberg G., Boettger M., Becker D. & Hedrich R. (1999)** Auxin-induced K<sup>+</sup> channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proceedings of the National Academy of Science* **96**, 12186-12191.
- Pilet P.E., Versel J.M. & Mayor G. (1983)** Growth distribution and surface pH patterns along maize roots. *Planta* **158**, 398-402.
- Poethig R.S. & Sussex I.M. (1985a)** The developmental morphology and growth dynamics of tobacco leaf. *Planta* **165**, 158-169.
- Poethig R.S. & Sussex I.M. (1985b)** The cellular parameters of leaf development in tobacco: a clonal analysis. *Planta*, **165**, 170-184.
- Prat R., André J.P., Mutaftschiev S. & Catesson A.M. (1997)** Three-dimensional study of the intercellular gas space in *Vigna radiata* hypocotyl. *Protoplasma* **196**, 69-77.
- Prigogine I. & Stengers I. (1985)** *Order out of chaos*. Flamingo, London, UK.
- Pritchard J., Barlow P.W., Adam J.S. & Tomos A.D. (1990)** Biophysics of the inhibition of the growth of maize roots by lowered temperature. *Plant Physiology* **93**, 222-230.
- Pritchard J., Hetherington P.R., Fry S.C. & Tomos A.D. (1993)** Xyloglucan endotransglycosylase activity, microfibril orientation and the profiles of cell wall properties along growing regions of maize roots. *Journal of Experimental Botany* **44**, 1281-1289.
- Proseus T.E., Ortega J.K.E., & Boyer J.S. (1999)** Separating growth from elastic deformation during cell enlargement. *Plant Physiology* **119**, 775-784.
- Rayle D.L. & Cleland R.E. (1992)** The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* **99**, 1271-1274.

- Redfield A.C. (1958)** The biological control of the chemical factors in the environment. *American Scientist* **46**, 1-18.
- Reinhardt D., Wittwer F., Mandel T. & Kuhlemeier C. (1998)** Localized upregulation of a new expansin gene predicts the site of leaf formation in the tomato meristem. *Plant Cell* **10**, 1427-1437.
- Richards O. W. & Kavanagh A. J. (1943)** The analysis of the relative growth gradients and changing form of growing organisms: Illustrated by the tobacco leaf. *The American Naturalist* **77**, 385-399.
- Richter J.P. (1989)** *The notebooks of Leonardo da Vinci (1452-1519), compiled and edited from the original manuscripts*. Dover. New York. USA.
- Roggatz U., McDonald A.J.S., Stadenberg I. & Schurr U. (1999)** Effect of nitrogen deprivation on cell division and expansion of *Ricinus communis* L.. *Plant, Cell and Environment* **22**, 81-90.
- Ruiz Fernandez S. & Wagner E. (1994)** A new method of measurement and analysis of stem extension growth rate to demonstrate complete synchronisation of *Chenopodium rubrum* plants by environmental conditions. *Journal of Plant Physiology* **144**, 362-369.
- Sacks M.M., Silk W.K. & Burman P. (1997)** Effect of water stress on cortical cell division rates within the apical meristem of primary roots of maize. *Plant Physiology* **114**, 519-527.
- Satter R.L. & Galston A.W. (1981)** Mechanisms of control of leaf movements. *Annual Review of Plant Physiology* **32**, 83-110.
- Satter R.L., Schrempf M., Chaudhri J. & Galston A.W. (1977)** Phytochrome and circadian clocks in *Samanea*. *Plant Physiology* **59**, 231-235.
- Saurer W. & Possingham J. V. (1970)** Studies on the growth of spinach leaves (*Spinacea oleracea*). *Journal of Experimental Botany* **21**, 151-158.
- Scheible W.R., Gonzales-Fontes A., Lauerer M., Müller-Röber B., Caboche M. & Stitt M. (1997b)** Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell* **9**, 783-798.
- Scheible W.R., Lauerer M., Schulze E.D., Caboche M. & Stitt M. (1997a)** Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant Journal* **11**, 671-691.
- Schmundt D. (1999)** Development of an optical flow based system for the precise measurement of plant growth. Inaugural-Dissertation. Heidelberg.
- Schmundt D., Stitt M., Jähne 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.
- Schnyder H. & Nelson C.J. (1988)** Diurnal growth of tall fescue leaf blades. *Plant Physiology* **86**, 1070-1076.
- 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.

- Schulze E.D. (1982)** Plant life forms and their carbon, water and nutrient relations. In: *Encyclopedia of Plant Physiology Vol. 12B* (Hrsg. O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 616-667.
- Schulze E.D., Kelliher F.M., Korner C., Lloyd J. & Leuning R. (1994)** Relationships among maximum stomatal conductance, ecosystem surface conductance, carbon assimilation rate and plant nitrogen nutrition: a global ecology scaling exercise. *Annual Review of Ecology and Systematics* **25**, 629-660.
- Schurr U. & Gollan T. (1990)** Composition of xylem sap of plants experiencing root water stress – a descriptive study. In: *Monography 21*, Bristol: British Society of Plant Growth Regulation, 201-214.
- Schurr U. & Schulze E.D. (1995)** The concentration of xylem sap constituents in root exudate and in sap from intact, transpiring castor bean plants (*Ricinus communis* L.). *Plant, Cell and Environment* **18**, 409-420.
- Schurr U. (1997)** Growth physiology and measurement of growth. In: *Progress in Botany*. (Hrsg. Behnke, H.D., Lüttge, U., Esser, K., Kadereit, J.W. und Runge, M.). Springer Verlag, Berlin., **59**, 355-373.
- 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.
- Schuster J. & Engelmann W. (1997)** Circumnutations of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Biological Rhythm Research* **28**, 422-440.
- Scott B.I.H., Gulline H., Pallaghy C.K. (1967)** The electrochemical state of cells of the broad bean roots. I. Investigation of the elongating roots of young seedlings. *Australian Journal of Biological Sciences* **21**, 185-200.
- Seneweera S.P., Basra A.S., Barlow E.W. & Conroy J.P. (1995)** Diurnal regulation of leaf blade elongation in rice by CO<sub>2</sub>. *Plant Physiology* **108**, 1471-1477.
- Sentenac H. & Grignon C. (1981)** A model for predicting ionic equilibrium in cell walls. *Plant Physiology* **68**, 415-419.
- Shabala S. & Newman I.A. (1999)** Light-induced changes in hydrogen, calcium, potassium and chloride ion fluxes and concentrations from the mesophyll and epidermal tissues of bean leaves. *Plant Physiology* **119**, 1115-1124.
- Shabala S.N. & Newman I.A. (1997a)** Proton and Calcium flux oscillations in the elongation region correlate with root nutation. *Physiologia Plantarum* **100**, 917-926.
- Shabala S.N. & Newman I.A. (1997b)** Root nutation modelled by two ion flux-linked growth waves around the root. *Physiologia Plantarum* **101**, 770-776.
- Shackel K.A., Matthews M.A. & Morrison J.C. (1987)** Dynamic relation between expansion and cellular turgor in growing grape (*Vitis vinifera* L.) leaves. *Plant Physiology* **84**, 1166-1171.

- Sharp R.E., Hsiao T.C. & Silk W.K. (1990)** Growth of maize primary root at low water potentials. II. Role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment. *Plant Physiology* **93**, 1337-1346.
- Sharp R.E., Silk W.K. & Hsiao T.C. (1988)** Growth of the maize primary root at low water potentials. I. spatial distribution of expansive growth. *Plant Physiology* **87**, 50-57.
- Shinozaki K., Yoda K., Hozumi K. & Kira T. (1964)** A quantitative analysis of plant form: the pipe model theory. I. Basic analyses. *Japanese Journal of Ecology* **14**, 133-139.
- Silk W.K. (1984)** Quantitative descriptions of development. *Annual Review of Plant Physiology* **35**, 479-518.
- Silk W.K. (1989)** Growth rate patterns which maintain a helical tissue tube. *Journal of Theoretical Biology* **138**, 311-327.
- Silk W.K. (1992)** Steady form from changing cells. *International Journal of Plant Sciences* **153**, 49-58.
- Silk W.K., Hsiao T.C., Diedenhofen U. & Matson C. (1986)** Spatial distributions of potassium, solutes and their deposition rates in the growth zone of the primary corn root. *Plant Physiology* **82**, 853-858.
- Silk W.K., Lord E.M. & Eckard K.J. (1989)** Growth patterns inferred from anatomical records. *Plant Physiology* **90**, 708-713.
- Silk W.K., Walker R.C. & Labavitch J. (1984)** Uronide deposition rates in the primary root of *Zea mays*. *Plant Physiology* **74**, 721-726.
- Simmons K., Soll D. & Migliaccio F. (1995)** Circumnutation and gravitropism cause root waving in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **282**, 143-150.
- Sinclair W. & Trewavas A.J. (1997)** Calcium in gravitropism: A re-examination. *Planta* **203**, 85-90.
- Slack F.D. (1997)** Plastids and gravitropic sensing. *Planta* **203**, 63-68.
- Smith H. (1995)** Physiological and ecological function within the phytochrome family. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**, 289-315.
- Souda M., Toko K., Hayashi K., Fujiyoshi T., Ezaki S. & Yamafuji K. (1990)** Relationship between growth and electric oscillations in bean roots. *Plant Physiology* **93**, 532-536.
- Spollen W.G. & Sharp R.E. (1991)** Spatial distribution of turgor and root growth at low water potentials. *Plant Physiology* **96**, 438-443.
- Stein A.A., Rutz M., & Zieschang H. (1997)** Mechanical forces and signal transduction in growth and bending of plant roots. In: *Dynamics of Cell and Tissue Motion* (Hrsg. W.Alt, A.Deutsch, & G.Dunn). Birkhäuser Verlag. 255-265.
- Stitt M., Gerhardt R., Wilke I. & Heldt H.W. (1987)** The contribution of Fructose 2,6-bisphosphate to the regulation of sucrose-synthesis during photosynthesis. *Physiologia Plantarum* **69**, 377-386.

- Strasburger (1998)** *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen* (Hrsg. Sitte P., Ziegler H., Ehrendorfer F., Bresinsky A.). Verlag Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm
- Tachibana S. (1988)** Cytokinin concentration in roots and root xylem exudate of cucumber and figleaf gourd as affected by root temperature. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **56**, 417-425.
- Telewski F.W. & Pruyn M.L. (1998)** Thigmomorphogenesis: a dose response to flexing in *Ulmus americana* seedlings. *Tree Physiology* **18**, 65-68.
- Toko K., Iiyama S., Tanaka C., Hayashi K., Yamafuji K. & Yamafuji K. (1987)** Relation of growth process to spatial patterns of electric potential and enzyme activity in bean roots. *Biophysical Chemistry* **27**, 39-58.
- Tomos A.D. & Pritchard J. (1994)** Biophysical and biochemical control of cell expansion in roots and leaves. *Journal of Experimental Botany* **45**, 1721-1731.
- Touraine B., Muller B. & Grignon C. (1992)** Effect of phloem-translocated malate on  $\text{NO}_3^-$  uptake by roots of intact soybean plants. *Plant Physiology* **99**, 1118-1123.
- Trewavas A.J. & Malhó R. (1997)** Signal perception and transduction: the origin of the phenotype. *Plant Cell* **9**, 1181-1195.
- Trewavas A.J. (1983)** Nitrate as a plant hormone. In: *British Plant Growth Regulator Group Monograph 9* (Hrsg.: M.B. Jackson). Oxford, UK. 97-110.
- Ulvskov P., Nielsen T.H., Seiden P. & Marcussen J. (1992)** Cytokinins and leaf development in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). I. Spatial distribution of endogenous cytokinins in relation to leaf growth. *Planta* **188**, 70-77.
- van Volkenburgh E. & Davies W.J. (1983)** Inhibition of light-stimulated leaf expansion by abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* **34**, 835-845.
- van Volkenburgh E., Schmidt M.G. & Cleland R.E. (1985)** Loss of capacity for acid-induced wall loosening as a principle cause of the cessation of cell enlargement in light-grown bean leaves. *Planta* **163**, 500-505.
- Virk S.S. & Cleland R.E. (1988)** Calcium and the mechanical properties of soybean cell walls: possible role of calcium and protons in cell-wall loosening. *Planta* **176**, 60-67.
- Vogelmann T.C. (1993)** Plant tissue optics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**, 231-251.
- Vogelmann T.C., Nishio J.N. & Smith W.K. (1996)** Leaves and light capture: light propagation and gradients of carbon fixation within leaves. *Trends in Plant Sciences* **1**, 65-70.
- von Caemmerer S. & Farquhar G.D. (1981)** Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**, 376-387.
- Sachs J. (1887)** *Vorlesung über Pflanzen-Physiologie*. Leipzig: Wilhelm Engelmann.

- Walter A. & Schurr U. (1999)** The modular character of growth in *Nicotiana tabacum* plants under steady state nutrition. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1169-1177.
- Walter A. & Schurr U. (2000)** Spatial variability of leaf development, growth and function. In: *Leaf Development and Canopy Growth* (Hrsg. B. Marshall & J. Roberts). Sheffield Academic Press. Sheffield. 96-118.
- Walter A. (1997)** Quantitative Analyse des Wachstums von *Nicotiana tabacum* unter besonderer Berücksichtigung des Sink-Source-Verhaltens. Diplomarbeit. Heidelberg.
- Walter A., Silk W.K., & 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..
- Warneck H.M., Fulton D.C., Seitz H.U. & Fry S.C. (1998)** Transport, degradation and cell wall-integration of XXFGol, a growth-regulating nonasaccharide of xyloglucan, in pea stems. *Planta* **204**, 78-85.
- Watts W.R. (1974)** Leaf extension in *Zea mays*. *Journal of Experimental Botany* **25**, 1085-1096.
- Weisenseel M.H., Dorn A. & Jaffe L.F. (1979)** Natural H<sup>+</sup> currents traverse growing roots and root hairs of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiology* **64**, 512-518.
- Williams R.F. & Rijven A.H.G.C. (1965)** The physiology of growth in the wheat plant. *Australian Journal of Biological Science* **18**, 721-743.
- Wilson G.L. & Ludlow M.M. (1967)** Bean leaf expansion in relation to temperature. *Journal of Experimental Botany* **18**, 309-321.
- Wilson G.L. (1966)** Studies on the expansion of the leaf surface. *Journal of Experimental Botany* **17**, 440-451.
- Winter H., Lohaus G. & Heldt H.W. (1992)** Phloem transport of amino acids in relation to their cytosolic levels in barley leaves. *Plant Physiology* **99**, 996-1004.
- Wu Y. & Cosgrove D.J. (2000)** Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1543-1553.
- Wu Y., Sharp R.E., Durachko D.M. & Cosgrove D.J. (1996)** Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiology* **111**, 765-772.
- Wymer C.L., Wymer S.A., Cosgrove D.J. & Cyr R.J. (1996)** Plant cell growth response to external forces and the response requires intact microtubules. *Plant Physiology* **110**, 425-430.
- Xu W., Purugganan M.M., Polisensky D.H., Antosiewicz D.M., Fry S.C. & Braam J. (1995)** *Arabidopsis* TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Cell* **7**, 1555-1567.

- Yan F., Feuerle R., Schäfer S., Fortmeier H. & Schubert S. (1998)** Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH. *Plant Physiology* **117**, 311-319.
- Yeggapan T.M. & Paton D.M. (1982)** Water stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). II. Effects on leaf cells and leaf area. *Annals of Botany* **49**, 63-68.
- Yoshida S. & Eguchi H. (1991)** Root temperature effects on hydraulic characteristics of roots in hydroponics. *IFAC Mathematical and Control Applications in Agriculture and Horticulture* 153-158.
- Zeng Y., Wu Y., Avigne W.T. & Koch K.E. (1999)** Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential and seed survival. *Plant Physiology* **121**, 599-608.
- Zhang H. & Forde B.G. (2000)** Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany* **51**, 51-59.
- Zhong H. & Läuchli A. (1994)** Spatial distribution of solutes, K, Na, Ca and their deposition rates in the growth zone of primary cotton roots: Effects of NaCl and CaCl<sub>2</sub>. *Planta* **194**, 34-41.
- Zhu G.L. & Boyer J.S. (1992)** Enlargement in Chara studied with a turgor clamp: Growth rate is not determined by turgor. *Plant Physiology* **100**, 2071-2080.

## Ein Bild sagt mehr als viele Worte...

...aber ein paar möchte ich dann doch noch loswerden: Mein herzlicher Dank gilt PD Dr. Uli Schurr für die Überlassung des Themas, für Betreuung, Ideen, Motivation und für alles, was er mir in der Welt der 'Scientific Community' vorgestellt und ermöglicht hat.

Prof. Mark Stitt und Prof. Bernd Jähne danke ich für ihre große Unterstützung, für ihr stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und für viele fruchtbare Diskussionen. Prof. Wendy Silk möchte ich für die tolle Zeit in Davis und für alle Anregungen und Unterstützungen danken, die sie mir gegeben hat. Ganz besonders möchte ich auch Regina und Stefan für ihre freundschaftliche Hilfe in allen Belangen dieser Arbeit, für viel Spaß und für manchen Tritt in den Hintern danken.

Ausser Regina gibt es noch ein paar Leute, die zwar schwieriger auf Zelluloid zu bannen sind als eine Herde wild gewordener Rizinuspflanzen, denen ich aber dennoch danken möchte: Dazu gehören Prof. Dan Cosgrove, Rita und Yves (für alles Molekulare); Dominik, Hagen, Hanno und Ralf (für wie die Bilder laufen lernten) sowie alle Mitarbeiter des Botanischen Instituts und der Bildverarbeitungs-Forschergruppe (für die schöne Zeit im idyllischen Heidelberg am Neckar).

Und zu guter Letzt geht noch ein ganz herzlicher Dank (für insgesamt so ziemlich alles) an meine Freunde, an meine Familie, an meine liebe Frau Susanne und ein Schmatz an Hanna (für die Danksagungen bis jetzt nur etwas zum zerknüllen und einspeicheln sind).

