

# INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Stefan Terjung, geb. Wilms  
1. Staatsexamen (Lehramt Gymnasium)

aus Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung:



**Artübergreifende Bestimmung von  
Parametern des Primärwurzelwachstums  
durch raum-zeitlich hochaufgelöste Bildsequenzanalyse  
unter besonderer Berücksichtigung  
der Variation der externen Nährstoffverfügbarkeit**

Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Rausch

Prof. Dr. Ulrich Schurr



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
3.1	MORPHOLOGIE UND WACHSTUM DER WURZELSPITZE .....	7
3.1.1	Allgemeine Form von Wachstumsprofilen der Wurzelspitze .....	8
3.2	EINFLUSS INTERNER UND EXTERNER FAKTOREN AUF DIE ZELLSTRECKUNG .....	9
3.2.1	Beeinflussung des Turgordrucks .....	9
3.2.2	Beeinflussung der Zellwand-Dehnbarkeit .....	10
3.2.2.1	Ansäuerung der Zellwand (Acid Growth <sup>2</sup> -Hypothese) .....	11
3.2.2.2	Einfluss des Calcium-Gehaltes des Apoplasten .....	11
3.2.2.3	Aktive enzymatische Regulation .....	11
3.3	EINFLUSS INTERNER UND EXTERNER FAKTOREN AUF DIE ZELLTEILUNG .....	12
3.4	MODELLE ZUR INTERAKTION VON ZELLSTRECKUNG UND ZELLTEILUNG .....	13
3.5	ÜBERBLICK ÜBER VERFÜGBARE METHODEN ZUR WURZELWACHSTUMSANALYSE .....	14
3.5.1	Analyseverfahren zur Erstellung von Wachstumsprofilen .....	14
3.5.2	Externe Markierungen versus intrinsische Strukturen .....	15
3.6	KRÜMMUNGSBEWEGUNGEN UND WACHSTUMSANALYSE .....	17
3.7	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT .....	19
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
4.1	PFLANZENANZUCHT .....	21
4.2	NÄHRSTOFFVERSORGUNG DER PFLANZEN .....	24
4.3	WACHSTUMSBESTIMMUNG MIT KONVENTIONELLEN METHODEN .....	26
4.4	CYCLIN-AKTIVITÄTSBESTIMMUNG MIT DEM CLSM .....	26
4.4.1	Analyse der Cyclin-Aktivität zu Einzelzeitpunkten .....	28
4.4.2	Timelapse-Aufnahmen der CycB1;1-GFP-Aktivität .....	28
4.4.3	Semi-automatische Detektion der GFP-enthaltenden Zellen .....	29
4.4.4	Visualisierung der dreidimensional segmentierten und getrackten Spots .....	30
4.5	WACHSTUMSANALYSE DURCH DIGITALE BILDSEQUENZVERARBEITUNG .....	31
4.5.1	Messprinzip .....	32
4.5.2	Aufbauten zur Bildsequenzaufnahme .....	33
4.5.2.1	Durchfluss-Rhizotron .....	34
4.5.2.2	Mikrorhizotron .....	36
4.5.3	Aufnahme der Bildsequenz .....	37
4.5.4	Auswertung der Bilddaten .....	38
4.5.4.1	Begutachtung der Bildsequenz .....	38
4.5.4.2	Vermessen des Wurzeldurchmessers .....	38
4.5.4.3	Vorverarbeitung der Bildsequenz (Filtern) .....	38
4.5.4.4	Strukturtensor-Auswertung .....	39
4.5.4.5	Transformation in das Wurzelkoordinatensystem .....	42
4.5.4.6	Einlesen der ausgewerteten Daten in Excel durch ein VBA-Makro .....	43
4.5.4.7	Ermittlung von Mittelwerten .....	45
4.5.4.8	Farbkodierte Darstellung der Ergebnisse .....	46
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
5.1	ZELLSTRECKUNG UNTER KONSTANTEN BEDINGUNGEN .....	48
5.1.1	Mais .....	48
5.1.1.1	Kultivierung in bidestilliertem Wasser .....	48
5.1.1.2	Kultivierung in 5 mM .....	50
5.1.1.3	Kultivierung in 10 mM .....	52
5.1.1.4	Vergleich der Wachstumsparameter .....	55

5.1.2	Arabidopsis .....	62
5.1.2.1	CycB1;1-GFP Pflanzen.....	63
5.1.2.2	Pflanzen des C24-Ecotypes.....	63
5.1.2.3	Vergleich verschiedener Wachstumsparameter.....	64
5.1.3	Tabak .....	72
5.1.3.1	Konstante Nährlösungskonzentration.....	72
5.1.3.2	Vergleich der Wachstumsparameter in Abhängigkeit von $V_{Spitze}$ .....	73
5.1.4	Kartoffel .....	76
5.1.5	Artübergreifender Vergleich der Wachstumsparameter.....	81
5.2	EINFLUSS VARIERTER UMWELTBEDINGUNGEN AUF DIE ZELLSTRECKUNG .....	88
5.2.1	Mais .....	88
5.2.1.1	Bidest → 5 mM.....	88
5.2.1.2	Bidest → 10 mM.....	90
5.2.1.3	Bidest → 20 mM.....	91
5.2.1.4	5 mM → 10 mM .....	95
5.2.1.5	bidest → Mannose.....	96
5.2.1.6	bidest → PEG6000 .....	97
5.2.1.7	bidest → 10 mM Nährlösung + PEG6000 .....	98
5.2.1.8	bidest → stickstoffreduzierte Nährlösung .....	99
5.3	ZELLTEILUNGSDYNAMIK UNTER KONSTANTEN BEDINGUNGEN.....	103
5.3.1	Arabidopsis – konstante Nährlösungskonzentration .....	103
5.4	ZELLTEILUNGSDYNAMIK BEI VARIATION VON AUßENBEDINGUNGEN.....	108
5.4.1	Arabidopsis - Nährlösungsvariation .....	108
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>109</b>
6.1	VERGLEICHENDE BETRACHTUNG VON WACHSTUMSANALYSETECHNIKEN .....	110
6.1.1	DISP-Methode.....	111
6.1.1.1	Auflösungsvermögen der DISP-Methode.....	111
6.1.1.2	Andere Methoden zur Kartierung von Wachstumsprofilen.....	111
6.1.1.3	Potenzial zur weiteren Optimierung der DISP-Methode.....	112
6.1.2	Ansätze zur Analyse der Meristemaktivität.....	113
6.1.2.1	Bestimmung der Zellteilungsaktivität.....	114
6.1.2.2	Ermittlung der Meristemlänge.....	115
6.2	ANALYSE DER ZELLSTRECKUNGSDYNAMIK .....	116
6.2.1	Einfluss der Nährstoffverfügbarkeit auf das ‚steady state‘ Wachstum .....	116
6.2.1.1	Auswirkung der Nährstoffkonzentration auf die Wachstumsleistung.....	118
6.2.1.2	Nährstoffabhängigkeit der REGR-Verteilung.....	120
6.2.2	Invarianten der Zellstreckungsregulation.....	122
6.2.2.1	Skalierung der Wachstumsparameter mit $V_{Spitze}$ .....	122
6.2.2.2	Skalierung des Wurzelwachstums mit dem Durchmesser.....	125
6.2.3	Einfluss diurnaler Rhythmen auf das Wurzelwachstum .....	126
6.2.4	Einfluss veränderter Genaktivität auf das Wurzelwachstum .....	127
6.2.5	Dynamische Anpassung an variierte Umweltbedingungen.....	128
6.3	EINFLUSS DER ZELLTEILUNGSAKTIVITÄT AUF DAS WURZELWACHSTUM.....	132
6.3.1	Zellteilungsaktivität bei konstanten Außenbedingungen .....	132
6.3.2	Zellteilungsaktivität bei Variation der Außenbedingungen .....	134
6.4	REGULATION VON WACHSTUMSPROZESSEN IN WURZELSPITZEN.....	135
<b>7</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>141</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>143</b>
<b>9</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>145</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>ALMF</b>	Advanced Light Microscopy Facility; Mikroskopische Serviceeinrichtung am Europäischen Molekularbiologischen Laboratorium, Heidelberg
<b>AOBS</b>	Accousto optical tunable beam splitter (akustisch-optisch verstellbarer Strahlteiler)
<b>AOTF</b>	Accousto optical tunable filter (akustisch optisch verstellbarer Filter)
<b>ATP</b>	Adenosin-Triphosphat
<b>bidest</b>	Bidestilliertes Wasser
<b>CCD</b>	Charge Coupled Device (Mikrochip zur Acquisition von Bildern in elektronischen Kameras)
<b>CLSM</b>	Confocal laser scanning microscope (konfokales Laser Scanning Mikroskop)
<b>CycB1;1</b>	Cyclin B1;1, dessen Dynamik mit einem Reporter-gen-Konstrukt untersucht werden konnte
<b>DISP</b>	Digital Image Sequence Processing (digitale Bildsequenz-Analyse)
<b>DIC</b>	Differential interference contrast, spezielles Kontrastverfahren in der Lichtmikroskopie
<b>EMBL</b>	Europäisches Molekularbiologisches Laboratorium, Heidelberg
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein), ein in der Qualle <i>Aequoria victoria</i> entdecktes Protein, das bei Anregung mit blauem Licht grün fluoresziert
<b>HHG</b>	Higher Harmonics Generation (mikroskopische Technik, die die Beobachtung von geeigneten Strukturen ohne externe Färbung möglich macht)
<b>IR</b>	Infrarotlicht
<b>LUT</b>	look up table (Zuordnung von Farben zu bestimmten Grauwerten, z.B. für Farbkodierte Overlay-Bilder oder bei CLSM-Aufnahmen verwendet)
<b>LVDT</b>	Linear Variable Differential Transducer, Messgerät zur elektrischen Erfassung von geringen Längenveränderungen
<b>MI</b>	Mitotischer Index, Zahl der Zellen, die sich in Mitosestadien befinden, relativ zur Gesamtzellzahl
<b>mRNA</b>	Messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
<b>NIR</b>	Nahes Infrarotlicht
<b>PEG</b>	Polyethylenglycol, die Abkürzung PEG wird meist durch die Angabe der durchschnittlichen Molmasse wie z.B. PEG6000 ergänzt
<b>PAR</b>	Photosynthetic active radiation (Photosynthetisch aktive Strahlung)

#### IV Abkürzungsverzeichnis

---

<b>R<sup>2</sup></b>	Bestimmtheitsmaß, das die Güte von Fitfunktionen angibt (Wert zwischen 0 und 1; 1 entspricht dem Optimum)
<b>REGR</b>	Relative Elemental Growth Rate (relative elementare Wachstumsrate)
<b>REGR<sub>max</sub></b>	Maximale REGR
<b>SD</b>	Standard deviation (Standardabweichung)
<b>TPLSM</b>	Two-photon laser scanning microscopy (2 Photonen Laser Scanning Mikroskopie)
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>V<sub>Spitze</sub></b>	Absolute Wachsrate der Wurzel, entspricht der Elongationsgeschwindigkeit der Wurzelspitze
<b>WS</b>	Abk. für ‚Workspace‘ (Programmskript in der Bildverarbeitungsinterpretersprache Heurisko)

## 1 Abstract

A thorough **analysis of primary root growth parameters** of seedlings of four different species (*Arabidopsis*, *Nicotiana*, *Solanum*, and *Zea*) were carried out in this thesis. The combination of spatial and temporal growth measurement resolution was brought to a new level of precision by employing innovative image processing methods ('DISP-method'). To use this method on very small roots (diameter of *Arabidopsis*, *Nicotiana*, and *Solanum* < 0.3 mm) a special 'Microrhizotron'-setup was constructed to visualize the vertically growing roots which enabled image acquisition with the necessary temporal and spatial resolution. Within the framework of **interdisciplinary cooperation** computer-controlled tracking of the root tip over several days was established. Furthermore the image sequence processing algorithms have been optimized for root growth analysis. Applying the improved DISP-method led to a multitude of new insights on root growth.

**Invariants of growth:** Comparative analysis of the growth parameters of the four analysed species revealed similar relation of four parameters to the root tip velocity ( $V_{\text{Tip}}$ ): Relative elemental growth rate maximum ( $\text{REGR}_{\text{max}}$ ), Distance of the  $\text{REGR}_{\text{max}}$  from the root tip, Full width half maximum of the REGR, and Length of the growth zone. Moreover, these growth parameters and  $V_{\text{Tip}}$  are linearly correlated with the root diameter. No diurnal course of  $V_{\text{Tip}}$  and  $\text{REGR}_{\text{max}}$  was present in all examined species.

Experiments on maize roots under constant as well as rapidly changed environmental conditions revealed the **dependency of the REGR profile on the external nutrient supply**. Moreover, the growth capacity of the primary root is influenced by the concentration of the surrounding nutrient solution. The higher the nutrient concentration, the faster growth capacity declines. For the first time the dynamic response of primary roots to rapid variation of the nutrient availability was studied with high spatial and temporal resolution. Adaptation to the changed conditions is achieved nearly exclusively by the variation of  $\text{REGR}_{\text{max}}$  and  $V_{\text{Tip}}$ . Changes in the investigated growth parameters depend only to a minor extent on differences in osmolarity but mainly on nutrient concentration variation – both concerning the initial nutrient concentration and the absolute change. These results suggest a correlation of the growth adaptation with the nutrient uptake.

Using a transgenic *Arabidopsis*-line expressing a labile cyclin-gfp fusion protein, the **dynamics of the G2/M-transition** of the cell cycle were imaged *in vivo* without external application of fluorescent dyes. A linear dependency of the cell division activity as well as of meristem length on  $V_{\text{Tip}}$  has been determined with this method.



## 2 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das **Primärwurzelwachstum vier verschiedener Arten** (*Arabidopsis*, *Nicotiana*, *Solanum* und *Zea*) genau analysiert. Dabei konnte eine sehr **hohe räumliche und zeitliche Auflösung** erzielt werden, die bisher in dieser Kombination nicht erreicht wurde. Dies wurde durch die Anwendung einer innovativen Bildsequenzanalyse (DISP-Methode) möglich. Um die genannte Methode auf sehr kleinen Wurzeln (Durchmesser  $< 0,3$  mm) anwenden zu können, wurde ein ‚**Mikrorhizotron**‘-Aufbau konstruiert, mit dem die notwendige raum-zeitliche Auflösung erreicht wurde. In **interdisziplinärer Zusammenarbeit** wurde die Verfolgung der Wurzelspitze im Bildbereich zur kontinuierlichen Wurzelbeobachtung über mehrere Tage entwickelt und Optimierungen im Bereich des Auswertungsverfahrens eingeführt. Durch die Anwendung der weiterentwickelten DISP-Methode konnte eine Vielzahl neuer Erkenntnisse gewonnen werden.

**Invarianten des Wachstums:** Die vergleichende Analyse der Wachstumsmuster hat ergeben, dass das Maximum der relativen elementaren Wachsrates ( $REGR_{max}$ ), der Abstand der  $REGR_{max}$  von der Wurzelspitze, die REGR-Halbwertsbreite und die Länge der Wachstumszone sich bei den vier untersuchten Arten auf die gleiche Weise proportional zur Geschwindigkeit der Spitze ( $V_{Spitze}$ ) verhalten. Es konnte auch gezeigt werden, dass die oben genannten Wachstumsparameter sowie  $V_{Spitze}$  in linearer Weise vom Wurzeldurchmesser abhängen. Die untersuchten Arten weisen keinen diurnalen Rhythmus des Wurzelwachstums auf.

An Maiswurzeln konnte bei Versuchen unter **konstanten sowie rasch veränderten Umgebungsbedingungen** gezeigt werden, dass die Symmetrie der relativen Wachsratenverteilung vom externen Nährstoffangebot abhängt. Auch die Wachstumsleistung der Primärwurzel Spitze wird durch die umgebende Nährstoffkonzentration beeinflusst. Je höher die Konzentration ist, desto schneller nimmt die Wachstumsleistung ab. Erstmals konnte die dynamische Reaktion der Primärwurzeln auf rasche Variation der Nährstoffverfügbarkeit mit hoher raum-zeitlicher Auflösung untersucht werden. Bei der dynamischen Reaktion der Wurzel auf die veränderten Bedingungen werden fast ausschließlich  $REGR_{max}$  und  $V_{Spitze}$  variiert. Das Ausmaß der Wachstumsveränderung ist geringer abhängig von der veränderten Osmolarität als von der Nährstoffkonzentration— sowohl von der Ausgangskonzentration als auch von der absoluten Veränderung. Dies legt einen Zusammenhang der Wachstumsreaktion mit der Nährstoffaufnahme nahe.

Durch den Einsatz einer stabil transformierten *Arabidopsis*-Linie mit einem labilen Reportergen-Konstrukt konnte die **Dynamik des G2/M-Übergangs** (und damit der Zellteilungsaktivität) *in vivo* ohne externe Behandlung untersucht werden. Für die Zellteilungsaktivität und Meristemlänge wurde mit dieser Methode eine lineare Abhängigkeit von der Spitzengeschwindigkeit der Wurzel festgestellt.



### 3 Einleitung

Wachstum ist eine Grundbedingung für das Leben und daher schon seit langem von wissenschaftlichem Interesse. Im Kontext dieser Arbeit wird ‚Wachstum‘ als irreversible Volumenzunahme von pflanzlichen Zellen verstanden, die in einer Veränderung von Gestalt und Größe der Pflanze resultiert. Neue ‚Elemente‘ werden durch Zellteilung gebildet, die in die Volumenzunahme durch Zellstreckung übergehen.

Seit der Begründung der modernen Botanik im 19. Jahrhundert wird auch Wurzelwachstum intensiv untersucht (Darwin 1880, Sachs 1887). Die lineare Organisation der Wurzelwachstumszone (Kapitel 3.1) sowie die einfache und reproduzierbare Handhabung von Keimlingswurzeln machen Wurzeln zu attraktiven Forschungsobjekten bei der Untersuchung von Pflanzenwachstum. Wurzeln sind zudem essentiell für das gesamte Pflanzenwachstum, da sie Wasser und Nährstoffe aus dem Boden aufnehmen und die Pflanzen im Boden verankern.

Die generelle Form des Wachstumsprofils von Wurzelspitzen ist schon lange bekannt (Kap. 3.1.1), die Analyse mit konventionellen Techniken (Übersicht in Kap. 3.5) ist aber, trotz räumlich bzw. zeitlich geringer Auflösung, sehr arbeitsaufwändig. Daher wurden bisher keine systematischen Vergleiche zwischen verschiedenen Arten bzw. Genotypen mit einheitlichen Datensätzen durchgeführt (Kap. 5.1). Auch dynamische Anpassungen des raum-zeitlichen Wachstumsmusters auf rasch veränderte Umweltbedingungen (in der Natur z.B. bei Regen nach längerer Trockenheit oder Düngung) konnten mit bisher etablierten Verfahren nicht untersucht werden (Kap. 5.2).

Die Regulation bzw. Anpassung des Wurzelwachstums kann sowohl durch Variation der Zellstreckungseigenschaften (Kap. 3.2) als auch der Zellteilungsparameter (Kap. 3.3) erfolgen. Das Zusammenspiel zwischen Zellstreckung und -teilung wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Kap. 3.4). Mit einer zur Verfügung stehenden CycB1;1-GFP exprimierenden Transformante (Kap. 2.1), soll daher die Dynamik der Zellteilung *in vivo* ohne externe Farbstoffapplikation untersucht werden (Kap. 5.3, Kap. 5.4).

Einige für das Wurzelwachstum wichtige physiologische Prozesse, wie z.B. die Stickstoff- und Sulfat-Aufnahme (Delhon et al. 1995, Lejay et al. 2003) sowie der Zucker-Import aus dem Spross (Hansen 1977), werden diurnal reguliert. Ob sich diese Regulierungsmuster auf das Wurzelwachstum auswirkt, soll systematisch mit weitgehend automatisierten Methoden (Kap. 4.5) untersucht werden (Kap. 5.1).

Mit klassischen Untersuchungen zum Wurzelwachstum konnten wegen des hohen Zeit- und Arbeitsaufwandes meist nur wenige Wachstumsprofile gewonnen werden (Baskin et al. 1995, Walter et al. 2000). Untersuchungen wurden in vielen Fällen unter konstanten („steady state“) Bedingungen durchgeführt. Dies gilt auch für die meisten Experimente, in denen der Einfluss von einzelnen Umweltparametern wie z.B. der Temperatur (Pahlavanian & Silk 1988), dem Wasserpotenzial (Sharp et al. 1990, Wu & Cosgrove 2000) oder der externen Nährstoffversorgung (Al-Ghazi et al. 2003, Ma et al. 2003) auf das Wurzelwachstum untersucht wurde.

Obwohl die Wichtigkeit des externen Nährstoffangebots auf die Allokation von Kohlenstoff und Stickstoff in der Pflanze, sowie das Verhältnis zwischen Spross und Wurzel (Scheible et al. 1997) bekannt ist und auch gezieltes Wachstum von Wurzeln in Richtung höheren Nährstoffangebots (Billbrough & Caldwell 1995, Arredondo & Johnson 1999) nachgewiesen wurde, gibt es bisher nur wenige Studien, die den Einfluss variiertes Nährstoffverfügbarkeit auf die relative elementare Wachstumsrate<sup>1</sup> (REGR) untersucht haben. Beispielweise konnte die zeitliche Dynamik des Spitzenwachstums ohne räumliche Auflösung mit sogenannten „Linear Variable Differential Transducern“ (LVDTs) bestimmt werden (Cramer et al. 1988, Bengough & MacKenzie 1994, Frensch & Hsiao 1994). Erste Ergebnisse zur dynamischen Reaktion der Pflanze auf variierte Umweltbedingungen konnten mit einer zeitlichen Auflösung von 30 - 60 min. erzielt werden (Walter et al. 2002, Walter et al. 2003).

Ein Gegenstand dieser Arbeit ist es, Untersuchungen zur dynamischen Anpassung des Wachstums auf variierende Umweltparameter mit höherer raum-zeitlicher Auflösung durchzuführen (Kap. 5.2). Versuche mit konstanten Nährlösungskonzentrationen (Kap.5.1) dienen einerseits als Referenz für die Untersuchungen mit variierten Nährlösungsbedingungen und ermöglichen andererseits den Vergleich des Wurzelwachstums verschiedener Arten unter unterschiedlichen externen Nährlösungsbedingungen haben auch einen Einfluss auf die Ausprägung von Circumnutationen (Shabala & Newman 1997, Walter et al. 2003), die zusammen mit anderen Wachstumsbewegungen einen Einfluss auf die Analyse des Wachstums haben können. Daher werden in Kapitel 3.6 Wachstumsbewegungen behandelt, die für die Analyse von Wurzelwachstum mit Bildsequenzanalyse wichtig sind.

---

<sup>1</sup> Relativer Zuwachs pro Längenelement in % h<sup>-1</sup>

### 3.1 Morphologie und Wachstum der Wurzelspitze

Die Wurzel lässt sich in verschiedene Bereiche mit unterschiedlicher Struktur und Funktion unterteilen (Abb. 3.1). Eine grobe Einteilung der Wachstumszone kann in die apikal gelegene **Calyptra** oder Wurzelhaube, das **Apikalmeristem** und die **Streckungszone** erfolgen (für eine feinere Einteilung siehe Ishikawa & Evans 1995).

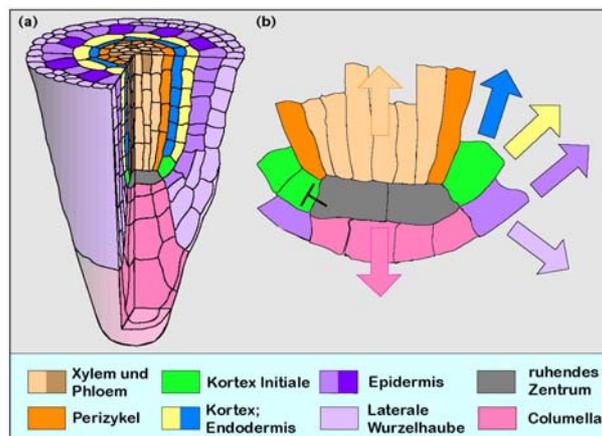
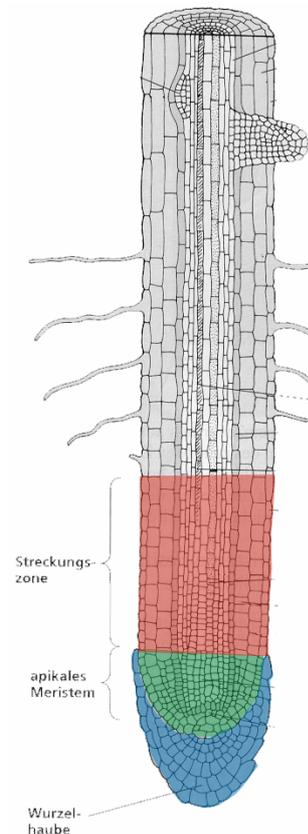
Die **Calyptra** dient hauptsächlich zum Schutz des empfindlichen Meristems, reduziert durch Verschleimung den Widerstand im Boden und ist an der Perzeption der Schwerkraft mit den sogenannten Statholithen (spezialisierte, stärkehaltige Plastiden) maßgeblich beteiligt. Für das eigentliche Längenwachstum der Wurzel hat die Calyptra allerdings keine direkte Bedeutung, weshalb sie in der vorliegenden Arbeit nicht genauer untersucht wird.

Das Wachstum der Wurzelspitze (Apikalmeristem + Streckungszone) lässt sich durch ein **lineares Wachstumsmodell** beschreiben (Silk 1992, Schurr 1997), da Wurzeln überwiegend in der Länge zuwachsen. In der Wachstumszone lässt sich eine räumliche Abfolge von Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien beobachten. An der Spitze des Apikalmeristems liegt das sogenannte ‚ruhende Zentrum‘ (benannt nach seiner geringen Zellteilungsrate), das aus wenigen Zellen besteht und das

Zellteilungsmuster der umgebenden Initialen steuert (Dörner 2000). Die

Initialen sind Stammzellen, die regelmäßig neue Zellen bilden, dabei aber meristematisch bleiben (Dörner 2003). Die von den Initialen in basale Richtung abgegebenen Zellen teilen sich noch mehrmals, während sie das Meristem durchlaufen. In der Streckungszone gehen sie für eine beschränkte Dauer zu schnellem, fast ausschließlich entlang der Wurzelachse gerichtetem Streckungswachstum über.

**Abb. 3.1: Organisation der Wurzelspitze:** Die Wurzelspitze lässt sich in Wurzelhaube (blau), apikales Meristem (grün) und die Streckungszone (rot) unterteilen. (nach Taiz & Zeiger 2000).



**Abb. 3.2: Organisation der Wurzelspitze am Beispiel von *Arabidopsis*** a) Zelltypen b) Initialen (meristematische Stammzellen) und die Richtung, in die sie Zellen bilden (nach Benfey & Scheres 2000)

In der **Wurzelhaar- oder Differenzierungszone**, die sich an die Streckungszone anschließt, findet kein Streckungswachstum der Wurzel mehr statt. Dort differenzieren sich die Zellen gemäß ihrer Bestimmung aus, wie z.B. die Trichoblasten, spezialisierte Rhizodermiszellen, die die Wurzelhaare (Ausstülpungen der Zelle, die sich durch Spitzenwachstum verlängern) bilden. Basal werden in unterschiedlichem Ausmaß Seitenwurzeln gebildet. **In dieser Arbeit wird ausschließlich das Wachstum von Primärwurzelspitzen** (Apikalmeristem und Streckungszone) untersucht.

### 3.1.1 Allgemeine Form von Wachstumsprofilen der Wurzelspitze

Die generelle Verteilung der Wachstumsgeschwindigkeiten<sup>2</sup> und daraus abgeleitet der relativen elementaren Wuchsraten (REGR), im Folgenden auch kurz **Wachstumsprofil** genannt, ist schon seit langem bekannt (Brumfield 1942, Goodwin & Stepka 1945):

An der Spitze ist nur eine geringe Wachstumsgeschwindigkeit (Abb. 3.3) zu messen, die in einer sigmoidalen Form (Morris & Silk 1992) stetig zunimmt, bis sie am Ende der Streckungszone (auf Abb. 3.3 ca. bei 10 mm) einen Maximalwert ( $V_{\text{Spitze}}$ ) annimmt. Die REGR (Abb. 3.4) liegt im apikalen Bereich des Meristems zwischen 0 und  $6\% \text{ h}^{-1}$  und ist auf den geringen Zuwachs der meristematischen Zellen zurückzuführen. Beim Übergang in die Streckungszone steigt die REGR schnell auf ein Maximum ( $\text{REGR}_{\text{max}}$ ) an und sinkt anschließend bis an das Ende der Streckungszone auf Null ab.

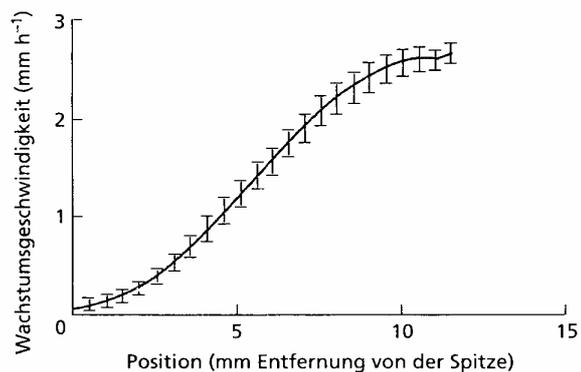


Abb. 3.3: Geschwindigkeitsprofil entlang einer Wurzelspitze (aus {Taiz & Zeiger 2000 TAIZ.2000 /id})

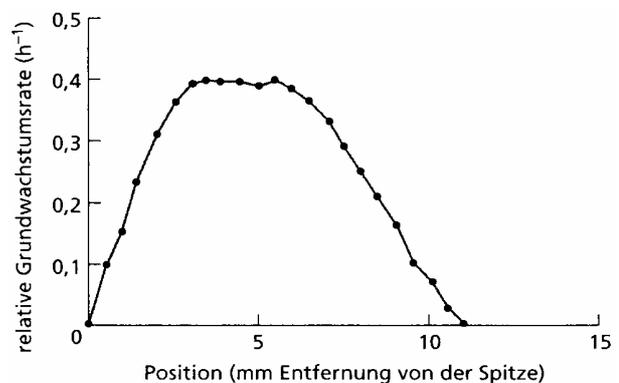


Abb. 3.4: REGR-Profil entlang einer Wurzelspitze ( $0,5 \text{ h}^{-1}$  relative Grundwachstumsrate entspricht  $50\% \text{ h}^{-1}$ ; (aus Taiz & Zeiger 2000))

<sup>2</sup> In dieser Arbeit werden die Wachstumsgeschwindigkeiten in ‚physiologischen‘ Koordinaten (relativ zum ruhenden Zentrum als Quelle der Zellen) angegeben. Für Details siehe Kap. 4.5.4.5

Für die exakte Bestimmung von Wachstumsprofilen ist eine hohe räumliche Auflösung notwendig, da die Wachstumszone der Wurzeln relativ klein ist (je nach Art 0,5 bis über 12 mm; vgl. Tabelle 6-2). Um auch geringe Schwankungen in den Wuchsraten detektieren zu können, ist eine hohe zeitliche Auflösung erforderlich. Je geringer die zeitliche Auflösung ist, desto stärker werden Fluktuationen geglättet.

Das Wurzelwachstum wird auf die Einwirkung von veränderten Umweltbedingungen dynamisch angepasst. Faktoren, die dabei die Zellstreckung und Zellteilung beeinflussen, werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

### 3.2 Einfluss interner und externer Faktoren auf die Zellstreckung

Das Wachstum von pflanzlichen Zellen hängt vom Turgor (dem von der Zelle auf die Zellwand ausgeübten Druck) und der Expansibilität der Zellwand ab. Die Interaktion zwischen Turgor und Expansibilität kann in der **Lockhart-Gleichung** (Formel 1), einem biophysikalischen Modell der Wachstumsregulation ausgedrückt werden (Lockhart 1965, Cosgrove 1986):

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

**Formel 1: Die Lockhart-Gleichung** beschreibt die relative Wachstumsrate ( $1/V * dV/dt$ ) in Abhängigkeit von der Zellwand-Expansibilität  $\Phi$ , dem Turgor  $P$  und dem ‚yield threshold‘  $Y$  (Grenzwert des Turgors, bei dessen Überschreitung irreversible Volumenvergrößerung der Zelle eintritt).

#### 3.2.1 Beeinflussung des Turgordrucks

Der Turgordruck entsteht durch osmotischen Wassereinstrom in die Vakuole, bedingt durch einen Gradienten des Wasserpotenzials zwischen Vakuole und Umgebung, der im Druck des Plasmalemmas gegen die Zellwand resultiert. Die Wasserpotenzialgleichung (Formel 2) gibt den Zusammenhang zwischen dem Wasserpotenzial, dem osmotischen Potenzial und dem Turgordruck (bzw. Druckpotenzial) wieder:

$$\psi = \psi_{\pi} + \psi_p$$

**Formel 2: Wasserpotenzialgleichung.** Das Wasserpotenzial  $\psi$  hängt vom osmotischen Potenzial  $\psi_{\pi}$  und dem Druckpotenzial  $\psi_p$  (= Turgordruck  $P$ ) ab.

Dabei wird die Zellwand durch den Turgordruck solange gedehnt, bis der Gegendruck der Zellwand (Wanddruck) den Turgordruck kompensiert. Die Pflanze kann den Turgordruck sowohl durch das osmotische Potenzial als auch durch die Dehnbarkeit der Zellwand (siehe Kap. 3.2.2) beeinflussen. Osmoregulation der Zelle kann z. B. durch Auf- bzw. Abbau von Polysacchariden sowie durch An- bzw. Abtransport von gelösten Molekülen durch das Phloem stattfinden. Im

Gewebeverband wirkt zusätzlich zum Wanddruck auch der Druck des gespannten Gewebes der Dehnung der Einzelzelle entgegen.

Der Turgor scheint bei konstanten Außenbedingungen in intakten Pflanzengeweben nicht stark zu variieren. So ist auch entlang der gesamten Wachstumszone einer Wurzel im ‚steady state‘ der Turgor relativ konstant, obwohl sich die Wuchsraten deutlich unterscheiden (Tomos & Pritchard 1994). In der aktuellen Literatur wird für die Regulation des Wachstums in Pflanzengeweben daher die Variation der Zellwand-Expansibilität (siehe Kap. 3.2.2) verantwortlich gemacht (Schurr 1997, Cosgrove 1999). Bei rascher Veränderung der externen Wasserverfügbarkeit wird jedoch der Turgor besonders in der Wurzel beeinflusst (Spollen & Sharp 1991, Wu & Cosgrove 2000). Der Turgor sinkt bei rascher Erhöhung der externen Osmolarität ab, kann aber durch Osmoregulation wieder erhöht werden (Sharp et al. 1990). Durch diese Turgorschwankung wird nach der Lockhart-Gleichung (Formel 1) auch das Wachstum beeinflusst. Für Maiswurzeln beispielsweise ist bekannt, dass der Turgor langsam wieder steigt, aber ein niedrigeres Niveau als zuvor erreicht. Gleichzeitig wird der ‚Yield threshold‘ verringert, so dass die Wurzel weiterhin zuwachsen kann (Frensch & Hsiao 1994). Bisher ist nicht bekannt, wie sich eine rasche Veränderung der osmotischen Verhältnisse auf die raum-zeitliche Dynamik der Wachstumsparameter auswirkt. Die raum-zeitliche Veränderung des Wachstumsprofils bei dynamischen Veränderungen von Umweltfaktoren wird in Kapitel 5.2 untersucht.

### ***3.2.2 Beeinflussung der Zellwand-Dehnbarkeit***

Die pflanzliche Zellwand besteht aus einem dichten Netzwerk von langgestreckten Polysacchariden wie Cellulose, Hemicellulose und Pektinen. Diese Makromoleküle werden zu ‚Fibrillen‘ verknüpft und durch Oligosaccharide und Proteine quervernetzt (Strasburger 1998). Die Dehnbarkeit der Zellwand hängt hauptsächlich vom Quervernetzungsgrad der Fibrillen ab (Cosgrove 1999). Die Richtung, in welcher die Dehnbarkeit am größten ist, kann vor allem durch die Orientierung der Cellulose-Fibrillen beeinflusst werden. Beispielsweise haben Zellen, deren Streckungswachstum vornehmlich in eine Richtung orientiert ist, häufig eine Ausrichtung der Cellulose-Fibrillen senkrecht zur Wachstumsrichtung (Taiz 1984, Cosgrove 1997). Die Orientierung der Cellulose-Fibrillen wird bereits bei der Synthese durch Bewegung der Cellulose-Synthase an streng geordneten Plasmamembran-gebundenen Mikrotubuli erzeugt (Gunning & Hardham 1982, Quader et al. 1986, Baskin 2001). Die Orientierung der Cellulose-Fibrillen lässt sich durch Polarisationsmikroskopie (Ziegenspeck 1948) und durch Polarisations-CLSM (Wilms 1998, Verbelen & Stickens 1994) genauer quantifizieren. Auch in der

Wachstumszone von Wurzeln sind die Cellulose-Fibrillen vorwiegend senkrecht zur Hauptstreckungsrichtung angeordnet (Verbelen & Kerstens 2000).

### ***3.2.2.1 Ansäuerung der Zellwand („Acid Growth“-Hypothese)***

Die Ansäuerung der Zellwand durch interne oder externe Einflüsse führt zu einer erhöhten Expansionsrate („Acid growth“-Hypothese; Edwards & Scott 1974, Virk & Cleland 1988). Allerdings wurden diese Versuche überwiegend an isolierten Gewebestücken durchgeführt und haben für intakte Organe meist keine Relevanz (Walter et al. 2000), da der pH-Wert des Apoplasten aktiv gepuffert und reguliert wird (Gerendas & Schurr 1999). Vermutlich beruht dieser Effekt darauf, dass Expansin (ein zentrales Zellwand-erweichendes Enzym, siehe Kap. 3.2.2.3) sein Aktivitätsoptimum bei niedrigeren pH-Werten hat (Cosgrove 1998).

### ***3.2.2.2 Einfluss des Calcium-Gehaltes des Apoplasten***

Das Pektin-Netzwerk ist ein wichtiger stabilisierender Faktor der Zellwand. Darin sind negativ geladene Uronsäuregruppen enthalten, die hauptsächlich durch Calcium und andere zweiwertige Kationen komplexiert werden können (Trewavas & Malhó 1997). Die Variation der Calcium-Konzentration im Apoplasten hat daher direkten Einfluss auf die Zellwand-Dehnbarkeit.

### ***3.2.2.3 Aktive enzymatische Regulation***

Es sind mehrere Enzymklassen bekannt, die die **Zellwand-Dehnbarkeit direkt erhöhen** können: **Expansine**, **Endoglucanasen** und **Xyloglucan-Transglycosylasen** (Cosgrove 1999, Vissenberg et al. 2000). Indirekt können auch Peroxidasen, die Hydroxyl-Radikale ( $\bullet\text{OH}$ ) erzeugen, durch Reaktion der Radikale mit Querverbindungen des Fibrillen-Netzwerkes die Dehnbarkeit der Zellwand erhöhen (Schopfer et al. 2002). Das gegenwärtige Modell zur Zellwand-Erweichung weist Expansin die Hauptrolle zu, die anderen Enzyme modulieren demnach dessen Wirkung sekundär (Cosgrove 1999). Das raum-zeitliche Expressionsmuster von Expansin korreliert mit den Wachstumsmustern von Tabakblättern (Walter 2001, Cosgrove 2000).

Eine **Verringerung der Zellwanddehnbarkeit** wird durch eine aktive Erhöhung der Quervernetzung des Zellwandmaterials erreicht (Warneck et al. 1998). Ebenso wird durch Regulation der Biosynthese und Sekretion der Zellwandbestandteile die Festigkeit der Zellwand beeinflusst (Delmer 1999). Wie oben bereits beschrieben hat auch die Orientierung der Fibrillen, die durch die Anordnung von Plasmamembran-assoziierte Mikrotubuli vorgegeben wird, eine große Bedeutung für die Expansibilität der Zellwand.

### 3.3 Einfluss interner und externer Faktoren auf die Zellteilung

Der Zellzyklus wird durch eine komplizierte Interaktion vieler verschiedener Regulatoren, darunter Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs), Cycline und CDK-Inhibitoren gesteuert (Dörner 1994, Potuschak & Dörner 2001). Jedes Cyclin ist spezifisch für eine bestimmte CDK und beide werden nur zu bestimmten Phasen des Zellzyklus exprimiert (Ferreira et al. 1994). Cycline werden zyklisch gebildet und kurz nach erfolgter Aktivierung der zugehörigen CDK enzymatisch abgebaut (Colon-Carmona et al. 1999). Dabei ist die Zahl der Zellzyklus regulierenden Moleküle bei Pflanzen deutlich höher als die bei Säugetieren beschriebene Anzahl (Vandepoele et al. 2002). Dies wird teilweise auf die sessile Lebensform von Pflanzen zurückgeführt, die bedingt, dass eine Pflanze stets durch Anpassung auf veränderte Bedingungen reagieren muss und z.B. nicht über die Möglichkeit zur Flucht verfügt. Die hohe Anzahl der vorhandenen Zellzyklus-Regulatoren könnte die dafür notwendige Möglichkeit zur schrittweisen Anpassung bieten (Inzé 2003).

Unabhängig von der Frage, wie die exakte Interaktion der CDKs, Cycline und CDK-Inhibitoren abläuft, sind einige Faktoren untersucht, die die Zellteilungsaktivität beeinflussen:

Beispielsweise stimulieren **Auxin** und **Cytokinin** Zellteilungen an verschiedenen Orten (Beemster & Baskin 2000, Dörner 2000, Himanen et al. 2002). **Abscisinsäure** induziert z.B. den CDK-Inhibitor ICK1 transkriptional um einen Faktor 2 – 3 (Wang et al. 1997, Wang et al. 2000).

**Zucker** und **Nitrat** können ebenfalls die Zellteilungsregulation beeinflussen. So wird die Expression von D-Cyclinen abhängig von der Zuckerkonzentration variiert (Riou-Khamlichi et al. 2000). Lokale Nitrat-Konzentrationen fördern die Meristemaktivität spezifisch in der Nebenwurzel, die der erhöhten Nitrat-Konzentration ausgesetzt ist (Zhang & Forde 2000).

Tabelle 3-1: Wichtige Begriffe im Bezug auf Zellteilung.

Begriff	Beschreibung	Einheit
<b>Zellproduktionsrate</b>	gibt die Anzahl der pro Zeiteinheit vom Meristem an die Streckungszone abgegebenen Zellen an (bezieht sich auf das ganze Meristem)	Zellen h <sup>-1</sup>
<b>Zellteilungsrate</b>	Gibt an, wie schnell eine Zelle den Zellzyklus durchläuft (Invers zur Zellzyklusdauer; bezieht sich auf einzelne Zellen)	Zellen Zelle <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
<b>Zellzyklusdauer</b>	Zeit in der ein Zellzyklus durchlaufen wird (G <sub>1</sub> – S – G <sub>2</sub> – M – Phase; bezieht sich auch einzelne Zellen)	h

### 3.4 Modelle zur Interaktion von Zellstreckung und Zellteilung

Es gibt zwei Modelle zum Zusammenhang zwischen Zellteilung und Zellstreckung, die auch beim Wurzelwachstum diskutiert werden (Silk 1984):

Bei dem **räumlichen Modell** („spatial model“) dienen Zellteilungen nur zur Unterteilung der Zellen (Green 1976); der Gesamtzuwachs des Organs ist lediglich die Summe der relativen Wuchsraten (auch „strain rates“ genannt; Formel 3). Nach dieser Sichtweise ist die Position und Größe der Elongationszone durch Mechanismen bestimmt, die hauptsächlich die Expansion durch Positionsinformationen steuern (Fiorani et al. 2000). Bei diesem Modell ist nicht klar, wie unterschiedliche meristematische Aktivität einen Einfluss auf die Gesamtwachstumsrate haben könnte. Die Gesamtelongation  $E$  eines Organs entspricht der Summe der relativen Wuchsraten über die gesamte Wachstumszone:

$$E = \int_0^{L_{gz}} r(x) dx$$

**Formel 3: Organzuwachs nach dem räumlichen Modell:** Die Gesamtelongationsrate des Organs  $E$  ist nur von der Summe der relativen Wuchsraten ( $r(x)dx$ ) über die Wachstumszone ( $L_{gz}$ ) abhängig.

Das **zellbasierte Modell** („cellular model“) betrachtet die Entwicklung einzelner Zellen während ihres Durchlaufs durch Meristem und Streckungszone. Im Meristem strecken sich die Zellen mit geringer Wachstumsrate und teilen sich mehrmals. In der darauf folgenden Elongationsphase strecken sie sich nur noch und expandieren mit hoher relativer Wachstumsrate. Die Verteilung der relativen Wuchsraten ist aus dieser Sichtweise durch das Entwicklungsstadium der Zellen an der betrachteten Stelle bestimmt. Vor diesem Hintergrund kann Zellteilungsaktivität im Meristem als eine treibende Kraft für Wachstum angesehen werden. Unter der Annahme, dass einzelne Zellen in der Streckungszone das gleiche Programm durchlaufen (Dauer der Elongationsphase und REGR), bestimmt die Zellproduktion (Tabelle 3-1) im Meristem die Anzahl der Zellen in der Streckungszone. Mit der Anzahl der Zellen in der Elongationszone würde auch die räumliche Verteilung der relativen Wuchsraten des Organs kontrolliert. Die Elongationsrate des ganzen Organs würde bei einer erhöhten Zellproduktionsrate steigen, wenn die durchschnittliche Endgröße der Zellen dabei etwa konstant bleibt (Fiorani et al. 2000). Die Gesamtelongationsrate  $E$  (in der vorliegenden Arbeit als  $V_{\text{Spitze}}$  bezeichnet) für dieses Modell lässt sich durch Formel 4 (Ivanov & Dubrovsky 1997) beschreiben und ist demnach von der Anzahl sich teilender Zellen, der durchschnittlichen Endgröße der Zellen und der Dauer des Zellzyklus (Tabelle 3-1) abhängig:

$$E = \frac{\ln(2)N_{div}l_m}{\bar{T}_c}$$

**Formel 4: Organzuwachs nach dem zellbasierten Modell:** Die Gesamtelongationsrate des Organs (E) ist von der Anzahl der teilenden Zellen ( $N_{div}$ ), durchschnittlichen Größe der ausgewachsenen Zellen ( $l_m$ ) und der Zellzyklusdauer ( $T_c$ ) abhängig.

In der Literatur werden beide Modelle intensiv diskutiert. Für die zellbasierte Theorie sprechen Experimente, in denen ein Zusammenhang zwischen der Zellproduktionsrate und der Gesamtelongationsrate ( $V_{Spitze}$ ) festgestellt wurde (z.B. Dörner et al. 1996, Cockcroft et al. 2000, De Veylder et al. 2001a, Beemster et al. 2002). Dagegen unterstützen Studien an anderen transgenen Linien, die Zellzyklus-regulierende Gene überexprimieren, eine teilweise Entkopplung von Zellteilungsaktivität und Wachstum des Organs (Hemerly et al. 1995, Wang et al. 2000, De Veylder et al. 2001b).

### 3.5 Überblick über verfügbare Methoden zur Wurzelwachstumsanalyse

Die Wahl der richtigen Analysemethode ist für die Bestimmung des Wurzelwachstums essentiell. Die Methoden zur Analyse des Wurzelwachstums wurden seit den Anfängen Ende des 19. Jahrhunderts von sehr zeit- und arbeitsaufwändigen manuellen Verfahren immer mehr vereinfacht bzw. automatisiert. Durch den erreichten Grad der Automatisierung (siehe Kap. 3.5.1 und 4.5) der in der vorliegenden Arbeit benutzten Bildsequenzanalyse (DISP-Methode, siehe Kap. 4.5) wurde die Untersuchung mehrerer Arten mit hoher raum-zeitlicher Auflösung (Kap. 5.1) sowie die Evaluierung des Einflusses einzelner Gene auf das Wurzelwachstum (Vergleich Transformanten mit Wildtyp, Kap. 5.1.2) möglich.

Die verwendeten Methoden unterscheiden sich durch das Aufnahmeverfahren, die Art der Auswertung (Kap. 3.5.1) und die für die Analyse betrachteten Strukturen (Kap. 3.5.2). Im Folgenden wird ein Überblick über die Entwicklung dieser Methoden gegeben.

#### ***3.5.1 Analyseverfahren zur Erstellung von Wachstumsprofilen***

Mit hohem Zeitaufwand wurden bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts Wachstumsprofile bei *Phleum pratense* bestimmt (Brumfield 1942, Goodwin & Stepka 1945). Dies wurde durch manuelle Verfolgung der Wurzelspitze mit dem Mikroskop und **Zeichnung der Zellgrenzen** mit Hilfe eines Camera-Lucida-Projektors in definierten Zeitabständen realisiert. Die so bestimmten Zellgrößen konnten in Wachstumsraten umgerechnet werden. Zur Erleichterung der Visualisierung und Quantifizierung der Wuchsraten wurden schon früh **fotografische Techniken** eingesetzt (Erickson & Sax 1956). Mit der Entwicklung der

Computer-Technik wurde die Grundlage zur Automatisierung der Wachstumsanalyse gelegt. Durch die **Einzelbildanalyse von digitalen Bildern** (Einscannen oder CCD-Kamera) der Wachstumszone konnte der Zeitaufwand weiter gesenkt werden (Beemster et al. 1996, Sacks et al. 1997, Walter et al. 2000). Die logische Fortentwicklung der Einzelbildanalyse war die Anwendung der **Bildsequenzanalyse (DISP-Methode)**, die mit der Einführung neuer Algorithmen zur Bewegungsanalyse (Haußecker & Spies 1999) eine sehr hohe raum-zeitliche Auflösung erreicht (Schmundt et al. 1998). Bei dieser Methode werden Geschwindigkeiten von Grauwertstrukturen auf der Wurzel automatisch verfolgt und in Wuchsraten umgerechnet, wie in Kapitel 4.5 näher ausgeführt wird. Durch Ergänzung der DISP-Methode durch eine **automatische Verfolgung der Wurzelspitze** (in interdisziplinärer Zusammenarbeit zu Beginn der vorliegenden Arbeit entwickelt) mittels computergesteuerten Verschiebetischen konnte die Aufnahme weiter automatisiert werden (Küstners 2001, Walter et al. 2002). Während dieser Arbeit wurde die DISP-Technik für Wurzeln in interdisziplinärer Kooperation weiter optimiert hinsichtlich der raum-zeitlichen Auflösung und Automatisierung der Auswertung (siehe Kap. 4.5). Ein weiterer großer Vorteil der DISP-Methode ist, dass sie **ohne externe Markierungen** der Wurzel auskommt.

### ***3.5.2 Externe Markierungen versus intrinsische Strukturen***

Für die Visualisierung von Wachstum werden sowohl für die manuelle als auch für die automatisierte Auswertung Strukturen benötigt, deren Bewegungen relativ zur Wurzelspitze bzw. dem ruhenden Zentrum bestimmt werden können. Strukturen der Wurzel wie die Zellwände bieten sich als intrinsische Strukturen an. Allerdings ist die manuelle Bestimmung der Zellgrößen durch die Zellwände sehr zeitintensiv.

Daher ist die Mehrzahl der publizierten Wurzeldata durch die manuelle oder automatische Vermessung von **externen Markierungen**, die regelmäßig oder zufällig auf die Wurzel aufgebracht wurden, erhoben worden. Dazu wurden in definierten Abständen Tintenpunkte (Erickson & Sax 1956, Muller et al. 1998), kleine Kügelchen (Chanson & Pilet 1982, Pilet et al. 1983) oder Graphit- bzw. Aktivkohlepartikel (Mullen et al. 1998a) im Bereich der Wurzelspitze appliziert. Teilweise wurden die Markierungen auch zufällig auf der Wachstumszone der Wurzel aufgebracht (Beemster & Baskin 1998, Beemster & Baskin 2000). Ein großer Nachteil der Methoden mit externen Markierungen der Wurzel ist, dass dadurch das Wachstumsverhalten der Wurzel beeinflusst werden kann. Die Wurzel kann dabei sowohl auf Berührungsreize (Migliaccio & Piconese 2001) als auch auf chemische Substanzen reagieren, wenn die verwendeten Marker nicht inert sind. Daher muss bei der Applikation der Partikel vorsichtig vorgegangen werden. Es

dauert nach der Markierung eine gewisse Zeit, bevor die Wurzel wieder ihr normales Wachstumsmuster erreicht. Typischerweise wird die Untersuchung erst 30 Minuten nach dem Aufbringen begonnen.

In vergleichsweise wenigen Studien wurde das Wachstumsverhalten von Wurzeln **ohne Applikation von externen Markern** untersucht. Dazu werden z.B. die Zellwände als natürliche Markierungen benutzt, um Wachstumskarten zu erstellen (Brumfield 1942, Goodwin & Stepka 1945).

Ein weiterer Ansatz ohne externe Markierung ist die Anwendung der **kinematischen Analyse** auf Zelllängen-Profile und  $V_{\text{Spitze}}$  (Baskin et al. 1995, Beemster et al. 2002). Dabei wurden die Zelllängen-Profile durch Differenz-Interferenz-Kontrast (DIC) Mikroskopie mit hohem Arbeitsaufwand und zeitlicher Auflösung von einer Stunde bestimmt.

Eine moderne Methode, die intrinsische Struktur der Wurzel für die Analyse zu nutzen, ist die in dieser Arbeit verwendete DISP-Methode (Walter et al. 2002, Kap. 4.5). Sie ermöglicht mit hoher raum-zeitlicher Auflösung die automatisierte Aufnahme über mehrere Tage, kombiniert mit einer weitgehend automatisierten Auswertung und Erstellung der Wachstumsprofile, einschließlich der tabellarischen Ausgabe von wichtigen Wachstumsparametern. Die **DISP-Methode ist somit die Grundlage**, um:

- a) Daten von mehreren Arten mit der selben Methode zu bestimmen und auf Gemeinsamkeiten zu vergleichen (Kap. 5.1).
- b) Zu untersuchen, ob diurnale Rhythmen des Wurzelwachstums auftreten (Kap. 5.1).
- c) Den Einfluss der externen Nährstoffverfügbarkeit auf das Wurzelwachstum bei konstanten (Kap.5.1) und variierten Bedingungen (Kap. 5.2) zu untersuchen.
- d) Den Einfluss von veränderten Aktivitäten einzelner Gene bei Transformanten mit dem Wildtyp zu vergleichen (Kap. 5.1.2).

### 3.6 Krümmungsbewegungen und Wachstumsanalyse

Wachsende zylindrische Pflanzenorgane (Wurzel, Spross, Hypokotyl) führen oft Wachstumsbewegungen aus, die unabhängig von Reizen sind – sogenannte **Nutationen** – oder zur Richtung des auslösenden Reizes in Beziehung stehen – sogenannte **Tropismen**. Die Bewegungsarten, die auf die Erstellung von Wachstumsprofilen einen Einfluss haben können, werden im Folgenden vorgestellt.

**Circumnutationen** sind runde oder elliptische Drehbewegungen, die mit starken transienten Verformungen der zuwachsenden Organe einhergehen. Alle Pflanzen führen diese Wachstumsbewegungen in verschiedener Ausprägung entlang ihrer Wachstumsachse aus. Der Begriff Circumnutation wurde bereits von Charles Darwin eingeführt (Darwin 1880). Circumnutationen treten je nach Pflanze und Umweltbedingungen bei Wurzeln in verschieden starker Ausprägung auf (Okada & Shimura 1990, Simmons et al. 1995, Mullen et al. 1998b, Migliaccio & Piconese 2001). Sie sind aber auch an Rankenbewegungen windender Pflanzen (Silk 1989) und Hypokotylen von Keimlingen (Kristie & Joliffe 1986, Barron & Liptay 1997) untersucht worden. Die Frequenz dieser Oszillationen ist von der externen Nährstoffversorgung abhängig (Shabala & Newman 1997, Walter et al. 2003). Diese Krümmungsbewegungen können einerseits interessante physiologische Informationen über den Wachstumsprozess liefern, andererseits verkomplizieren sie jedoch die Analyse von Wachstumsprofilen, da das Organ nicht gleichförmig in die Länge wächst, sondern dynamische Drehbewegungen um die resultierende Wachstumsachse ausführt. In der vorliegenden Arbeit konnte die physiologische Kopplung dieser Bewegungen mit REGR-Feldern entlang der Wachstumszone zwar leider nicht weiter untersucht werden, es standen jedoch Algorithmen zur Verfügung, um Wuchsraten stets in Projektion auf die Mittellinie des Organs betrachten zu können (Kap. 4.5).

Durch den **Gravitropismus** wird das Wurzelwachstum in Richtung des Schwerkraftvektors gelenkt (Taiz & Zeiger 2000). Dabei wird die Wachstumsaktivität so verändert, dass die der Erde abgewandte Laterale der Wurzel schneller zuwächst als die erdnahe (Mullen et al. 1998a). Für die Perzeption der Gravitation sind die sogenannten Statholithen, modifizierte Plastiden in der Calyptra, notwendig (Blancaflor et al. 1998). Es gibt Hinweise darauf, dass eventuell auch Zellen außerhalb der Wurzelhaube zur gravitropischen Reaktion beitragen (Wolverton et al. 2002). Gravitropismus erschwert die Kartierung von Wachstumsprofilen durch Dreh- und Krümmungsbewegungen, wenn die Wurzeln in horizontaler Ausrichtung, wie z.B. bei der mikroskopischen Visualisierung (Beemster & Baskin 1998, van der Weele et al. 2003), aufgenommen werden. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde ein ‚**Mikrorhizotron**‘

konstruiert (Kap. 4.5.2.2), um das Wurzelwachstum von *Arabidopsis*, Tabak und Kartoffel ohne Beeinflussung durch Gravistimulation ermitteln zu können. Auch im Durchfluss-Rhizotron wachsen die Maiswurzeln nahezu senkrecht.

Auch die Reaktionen auf Berührungsreize führen zu gerichteten Bewegungen und werden **Thigmotropismus** genannt. Bei Wachstum in Richtung des Reizes spricht man von positivem Thigmotropismus, was typisch für Rankenpflanzen ist. Wurzeln weisen meist negativen Thigmotropismus auf, wachsen also von Hindernissen weg (Migliaccio & Piconese 2001). Wachstumsanalysen, die mit externen Markierungen oder LVDTs durchgeführt werden, können durch diese Wachstumsbewegungen verfälscht werden. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Bildsequenzanalyse-basierte DISP-Methode kommt ohne externe Markierungen aus.

**Phototropismus**, Wachstum in Richtung einer Lichtquelle, zeigt sich besonders deutlich bei der Ausrichtung der Blattoberfläche zur Lichtquelle. Für die Aufnahme der Bildsequenzen für die DISP-Methode wurde die Wurzel stets durch nahes Infrarot-Licht ( $\lambda_{\text{max}} = 940 \text{ nm}$ ) beleuchtet, da dieses von den Pflanzen nach heutigem Wissensstand nicht perzipiert wird und damit die Bildsequenzakquisition auch in der Dunkelperiode ohne Beeinflussung des Wachstums möglich ist (Kap. 4.5.2).

### 3.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es:

- Hochaufgelöste Wachstumsprofile von Primärwurzeln verschiedener Arten zu kartieren.
- Invarianten des Wurzelwachstums aus den Wachstumsprofilen verschiedener Arten abzuleiten.
- Die Wachstumsdaten von verschiedenen Arten auf diurnale Rhythmen zu evaluieren.
- Den Einfluss externer Nährstoffversorgung auf das ‚steady state‘ Wurzelwachstum zu untersuchen.
- Dynamische Änderungen von Wachstumsmustern bei rascher Variation der Umgebungsbedingungen zu bestimmen.
- Transformanten auf Unterschiede im Wurzelwachstum zu screenen.
- Die Dynamik der Zellteilung bei unterschiedlichen Umweltbedingungen *in vivo* zu visualisieren.
- Die Ergebnisse mit möglichen Regulationsmechanismen raum-zeitlicher Wachstumsdynamik aus der Literatur zu vergleichen.



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Pflanzenanzucht

In der vorliegenden Arbeit wurde folgendes **Pflanzenmaterial** zur Untersuchung der raumzeitlichen Dynamik des Wurzelwachstums eingesetzt:

- *Zea mays* L. cv. Lixis (Mais), Wildtyp
- *Nicotiana tabacum* cv. Samsun (Tabak), Wildtyp
- *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree (Kartoffel), Wildtyp
- *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand):

#### 1. Ecotype C24 Wildtyp

2. **Ecotype C24 Linie 145-3**: eine transformante Linie mit **verringertem DOF14-Aktivität**. Die Inhibierung ist durch ein RNAi-Konstrukt realisiert. DOF14 gehört zur Familie der ‚DNA-binding One Finger‘-Transkriptionsfaktoren. Die Expression von DOF-14 ist auf den Meristembereich von Wurzelspitzen beschränkt, Überexpression und Inhibierung von DOF14 wirken sich auf die Wachstumsgeschwindigkeit und Seitenwurzelbildungsrate aus (persönliche Mitteilung, Slobodan Ruzicic, Universität Potsdam). Diese Linie wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Ruzicic und B. Müller-Röber, Universität Potsdam.

3. **Ecotype Col-0**: Transformante Linie **CycB1;1-GFP**, die ein Cyclin B1;1 Reporter-gen-Konstrukt enthält, das unter der Kontrolle des Cyclin B1;1-Promotors steht und die ersten zweieinhalb Exons des Gens enthält. Diese werden translationell mit GFP fusioniert. In den benutzten Fragmenten des Cyclin B1;1-Gens sind die sogenannte ‚Destruktion box‘, die den Abbau des Proteins am Anfang der Mitosephase bewirkt, und das ‚nuclear localising signal‘ (NLS) enthalten (Colon-Carmona et al. 1999). Das Reporter-gen-Konstrukt kann aber nicht mit der entsprechenden Cyclin-abhängigen Kinase interagieren (persönliche Mitteilung P. Dörner, Edinburgh). Diese Linie wurde freundlicherweise von P. Dörner, Edinburgh, zur Verfügung gestellt.

Die **Kultivierung zu Bildverarbeitungszwecken** richtete sich nach der Größe der zu beobachtenden Wurzeln:

**Maispflanzen**, deren Wurzeln einen Durchmesser von etwa einem Millimeter haben, wurden in einem speziellen **Durchfluss-Rhizotron** (Abb. 4.2/ Walter 2001) für die Bildsequenzaufnahme kultiviert. Die Keimung erfolgte zuvor für 2-3 Tage in gut gewässertem Sand bei etwa 24 °C Lufttemperatur. Zu diesem Zeitpunkt haben die Maiskeimlinge eine etwa 2-3 Zentimeter lange Primärwurzel sowie eine Koleoptile mit einer Länge von ca. einem Zentimeter. Der Aufbau des Durchfluss-Rhizotron ist in Kapitel 4.5.2 beschrieben.



Abb. 4.2: Maiskeimlinge im Durchfluss-Rhizotron (ohne schwarze Abdeckfolie; aus Nagel 2003)

Die Anzucht von der *Arabidopsis* und *Nicotiana*-Pflanzen erfolgte in Sterilkulturen mit einem Agar-Nährlösungsgel (1 % w/v Agar, Ingestad-Nährlösung s.u.) in rechteckigen Petrischalen (12 x 12 cm, Fa. Greiner, Kremsmünster, Abb. 4.4, Abb. 4.5) oder für die Beobachtung der *Arabidopsis* Wurzeln am CLSM in ein- oder zweikammerigen Labtek-Chamberslides (Fa. VWR international, Darmstadt, Abb. 4.3). Je nach Versuchsziel wurde die Nährlösungskonzentration variiert. Nach Sterilisation der



Abb. 4.1: Petrischalenhalter zur Kultivierung der steril auf Agar angezogenen Pflanzen

*Arabidopsis*- als auch *Nicotiana*-Samen in der Sterilbank (3 min 70 %-iger Ethanol, 10 min 0,1 %-iges NaOCl, anschließend dreimal mit autoklaviertem bidestilliertem Wasser ausgewaschen) wurden diese je nach Versuchsziel direkt auf dem Agar-Gel aufgebracht oder mit der Pipettenspitze leicht in den Agar eingedrückt, so dass die Primärwurzel im Agar wuchs. Die Petrischalen wurden mit Micropore-Klebeband (3M Health Care, Borken) verschlossen und für drei Tage im Kühlschrank bei 4 °C gelagert, um die Keimung zu synchronisieren, bevor sie bei Standard-Klimabedingungen (s.u.) nahezu senkrecht in speziellen Haltern (Abb. 4.1) inkubiert wurden.



Abb. 4.3: Chamberslide für die Anzucht von *Arabidopsis*-Pflanzen für die Beobachtung mit dem CLSM verwendet



Abb. 4.4: Anzucht in Petrischalen am Beispiel von Tabak-Pflanzen



Abb. 4.5: Anzucht in Petrischalen am Beispiel eines Vorversuchs mit Aktivkohle im Agar zur Kontraststeigerung (Ansatz wurde nicht weiterverfolgt)

Die Vermehrung der ***Solanum*-Pflanzen** erfolgte ebenfalls steril auf Agar. Im Rahmen ihrer Diplomarbeit führte Nicole Gasche hierzu Mikropropagation in Phytatrays durch (Gasche 2001). Für Bildverarbeitungszwecke wurden Sprossspitzen in Petrischalen mit Agar umgesetzt. Nach etwa sechs Tagen waren die neu gebildeten Wurzeln lang genug zur Bildsequenzaufnahme.

### Standard-Klimabedingungen

Das Durchfluss-Rhizotron mit den Maiswurzeln befand sich in einem klimatisierten Raum bei einer durchschnittlichen Temperatur von 22 °C, 50 % relativer Luftfeuchte. Die Lichtperiode war zwischen 8 und 20 Uhr eingestellt und an den Blättern wurde eine Lichtintensität von 100 bis 150  $\mu\text{mol}$  photosynthetic active radiation ( $\mu\text{mol}$  PAR) erreicht.

Die Tabak- und Kartoffelpflanzen wurden im Mikrorhizotron-Aufbau unter den gleichen Bedingungen wie die Maispflanzen im Durchfluss-Rhizotron (22 °C, 50 % rel. Luftf., 8-20 Uhr: 100-150  $\mu\text{mol}$  PAR) untersucht.

Für die Bildsequenzaufnahmen der *Arabidopsis*-Pflanzen wurde das Mikrorhizotron bei 22 °C, 60 % rel. Luftfeuchtigkeit und 100  $\mu\text{mol}$  PAR Lichtintensität (8-20 Uhr) betrieben. Zusätzlich wurden auch Aufnahmen mit dem Durchlichtkanal eines Leica TCS SP2 AOBS konfokalen Laser-Scanning Mikroskops (CLSM) durchgeführt. Dieses Mikroskop steht in einem auf 21 °C klimatisierten Raum. Die Beleuchtung konnte hier nur seitlich mit 30-50  $\mu\text{mol}$  PAR erfolgen, da bei höheren Lichtintensitäten die Aufnahmequalität beeinträchtigt worden wäre.

## 4.2 Nährstoffversorgung der Pflanzen

Für die beschriebenen Versuche wurde eine Ingestad-Nährlösung (Ingestad 1982, Ingestad & Agren 1992) verwendet, deren Konzentration je nach Versuchsziel zwischen 2,5 und 20 mM Stickstoff eingestellt wurde. Die Nährelemente liegen bei diesem Nährlösungstyp im Verhältnis zur eingesetzten Stickstoffmasse in folgenden Anteilen vor:  $\text{NO}_3^-$  61,5 %,  $\text{NH}_4^+$  38,5 %,  $\text{K}^+$  65 %,  $\text{PO}_4^{3-}$  13 %,  $\text{SO}_4^{2-}$  9 %,  $\text{Mg}^{2+}$  8,5 %,  $\text{Ca}^{2+}$  7 %,  $\text{Fe}^{3+}$  0,7 %,  $\text{Mn}^{2+}$  0,4 %, B 0,2 %, Mo 0,07 %,  $\text{Zn}^{2+}$  0,06 %,  $\text{Na}^+$  0,034 %, Cl 0,033 %,  $\text{Cu}^{2+}$  0.03 %. Für den Einsatz der Ingestad-Nährlösung mit Sterilanzuchten in Petrischalen wurde die benötigte Konzentration durch 1 % w/v Agar geliert, so dass die Wurzeln auch in senkrecht stehenden Petrischalen auf oder in dem Gel wachsen konnten.

Um den unterschiedlichen Einfluss von Osmolarität und Konzentration von Nährelementen zu untersuchen, wurden zusätzlich zu der Standard-Nährlösung auch modifizierte Nährmedien benutzt, bei denen einzelne Bestandteile ( $\text{KNO}_3$  und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; modifizierte Stammlösung A siehe Tabelle 4-3) gegen Polyethylenglykol mit der mittleren Molekülmasse von  $6000 \text{ g mol}^{-1}$  (PEG6000) gleicher Osmolarität ersetzt (Abb. 4.6). Einen Überblick über die gemessenen Osmolaritäten der benutzten Lösungen gibt Tabelle 4-4.

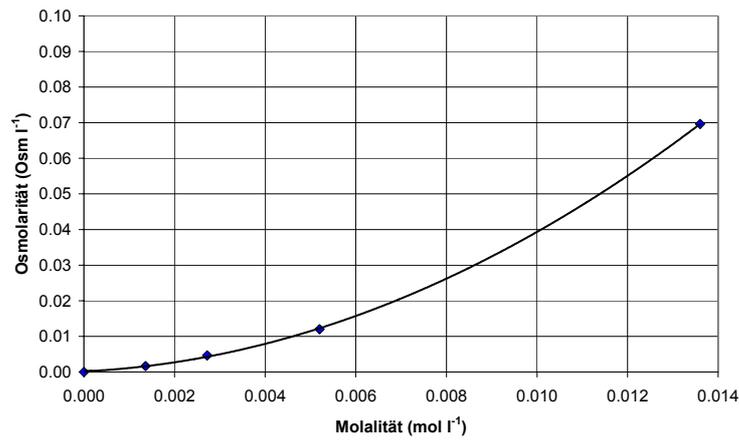


Abb. 4.6: Bestimmung der Osmolarität von PEG6000-Lösungen

Tabelle 4-1: Ingestad Stammlösung A

Substanz	Molekulargewicht (g mol <sup>-1</sup> )	Einwaage (g l <sup>-1</sup> )	Konzentration (mmol l <sup>-1</sup> )
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	174,27	24,48	141,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	174,19	19,34	82,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	17,83	131,0
KNO <sub>3</sub>	101,11	19,97	197,5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80,05	108,87	1360

Tabelle 4-2: Ingestad Stammlösung B

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Einwaage [g/l]	Konzentration [mmol/l]
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	236,16	29,52	125
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	256,43	47,44	185
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	404,00	2,532	6,27
Mn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	251,01	0,914	
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	261,44	0,12	0,46
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	170,49	0,04	0,24
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	241,95	0,009	0,04
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,83	0,572	9,25
HNO <sub>3</sub>	63,02	2,2 ml	48,35

Tabelle 4-3: Stickstofffreie modifizierte Stammlösung A (die verringerte Osmolarität wird durch Zugabe anderer Osmotika, wie z.B. PEG6000 ersetzt)

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Einwaage [g/l]	Konzentration [mmol/l]
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	174,27	24,48	141,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	174,19	19,34	82,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	17,83	131,0
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	138,21	13,65	98,8

Tabelle 4-4: Übersicht über die gemessenen Osmolaritäten der benutzten Nährlösungen

Zusammensetzung	gemessene Osmolarität (Osm l <sup>-1</sup> )
5 mM Ingestad	0,009
10 mM Ingestad	0,018
20 mM Ingestad	0,030
Stickstoffreduzierte ,10 mM <sup>3</sup> Ingestad (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> + KNO <sub>3</sub> durch PEG6000 ersetzt)	0,017
10 mM Ingestad + 0.018 Osm l <sup>-1</sup> PEG6000	0,029

### 4.3 Wachstumsbestimmung mit konventionellen Methoden

Die Längenzunahme aller **Primärwurzeln** im Durchfluss-Rhizotron (Kap. 4.5.2.1) wurde täglich durch Markierung der aktuellen Position der Wurzelspitze durch weißen Lackstift auf der Deckfolie bestimmt. Die Abstände zwischen aufeinanderfolgenden Markierungen wurden vermessen. Mittels Division durch den zugehörigen Zeitabstand wurde die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Wurzelspitze im betrachteten Intervall berechnet. Die Längenzunahme von *Arabidopsis*- und *Nicotiana*-Wurzeln konnte wegen der im Vergleich zu Mais geringen Wachstumsgeschwindigkeit nur alle 2-3 Tage mit dem Lineal vermessen werden.

### 4.4 Cyclin-Aktivitätsbestimmung mit dem CLSM

Für die Aufnahme der GFP-Verteilung der Transformanten konnte ein Leica TCS SP2 mit AOBs-Technik (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim; Abb. 4.7) in der Advanced Light Microscopy Facility (ALMF) am Europäischen Molekularbiologischen Laboratorium (EMBL) benutzt werden. Dieses Mikroskop war mit vier Kanälen zur konfokalen Fluoreszenzdetektion und einem Transmissionsdetektor sowie einem inversen Mikroskopstativ ausgerüstet. Zur Anregung des GFP wie auch für Transmissionsbilder wurde ein Argon-/Krypton-Laser ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) eingesetzt. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Aufnahmen mit einem 20-fach Objektiv (Wasserimmersion, 0,7 NA; Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar) und einem S23-Kondensator (0.53 NA; Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar) durchgeführt. Durch diese Kombination konnte einerseits die gesamte Wachstumszone der Wurzel aufgenommen werden, andererseits war die Fluoreszenzausbeute relativ gut, so dass die benötigte Laserleistung zur Anregung des GFP niedrig gehalten werden konnte. Die GFP-Fluoreszenz wurde im zweiten Kanal im Bereich von 505 bis 600 nm detektiert, während gleichzeitig ein Transmissionsbild aufgezeichnet wurde, um die relative Lage der Fluoreszenz in der Wurzel zuordnen zu können. Durch den inversen Aufbau des Mikroskopstatives<sup>3</sup> konnten Wurzeln, die in den Labtek-Chamberslides von oben auf das Deckglas gewachsen waren, direkt ohne weitere Präparation aufgenommen werden.

<sup>3</sup> das Objektiv wird von unten an die Probe herangeführt

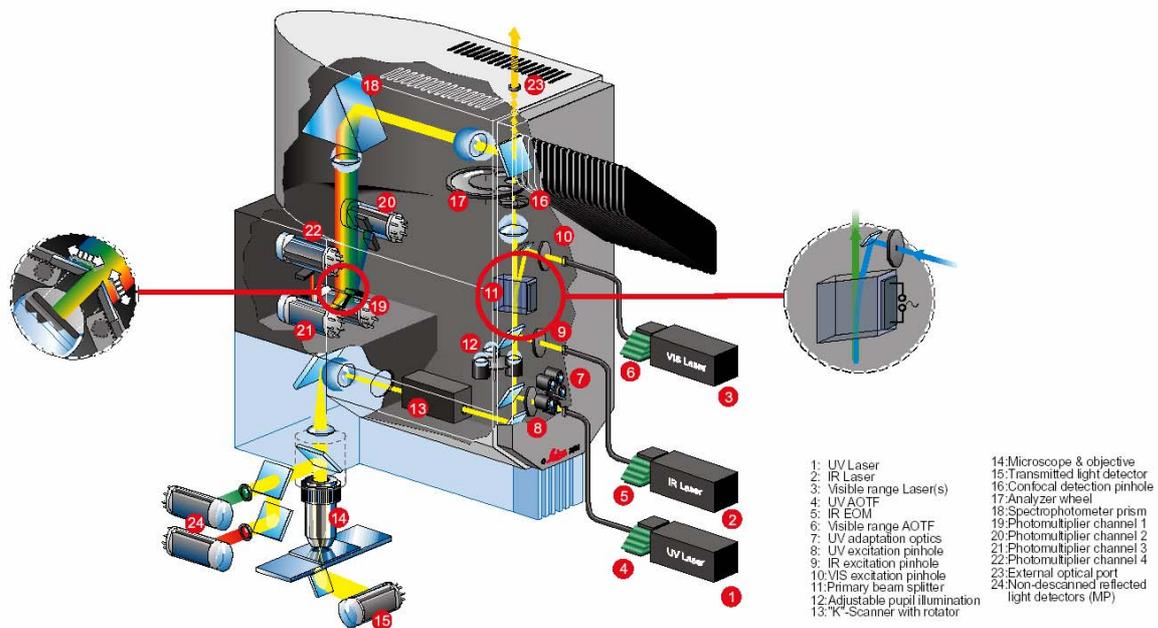


Abb. 4.7: Schematischer Aufbau des Leica TCS SP2 AOBS CLSM

Für die Wurzelgeometrie erwies sich das Scanformat 1024 x 256 Pixel als sehr geeignet, da es einerseits die Wurzel mit ausreichender Genauigkeit auflöst und andererseits ausreichend schnelle Scangeschwindigkeiten ermöglichte (~ 1 Minute / 3D-Stapel). Zur Ausrichtung der Wurzel im Bild konnte die Funktion „Scan Rotation“ eingesetzt werden, bei der der Scankopf und damit das Objekt im Bild in kleinen Schritten gedreht werden kann.

Um die Verteilung der GFP-Aktivität in der Wurzelspitze analysieren zu können, wurden jeweils optische Schnitte im Abstand von 2-3  $\mu\text{m}$  durch die untere (dem Objektiv zugewandte) Wurzelhälfte gelegt. Diese Schnitte ermöglichen eine dreidimensionale Rekonstruktion der GFP-Aktivität, die für die Auflösung von ganzen Zellen ausreichend ist.

Mikroskopiert wurden entweder Einzelpflanzen über längere Beobachtungszeiträume (Timelapse) oder kurz hintereinander mehrere Pflanzen einer Anzucht mit je einem bzw. wenigen 3D-Stapeln (Einzelzeitpunkte), um mehrere Aktivitätswerte bei gleichen Umweltbedingungen zu ermitteln.

#### **4.4.1 Analyse der Cyclin-Aktivität zu Einzelzeitpunkten**

Die Wachstumszonen mehrerer Pflanzen einer Anzucht (Petrischale) wurden unmittelbar nacheinander aufgenommen (jeweils mindestens ein Satz optischer Schnitte durch die halbe Wurzel mit GFP-Fluoreszenz und Durchlichtbild). Um Wurzeln, die im Agar gel wuchsen, mikroskopieren zu können, wurde um die Pflanze herum vorsichtig ein Block mit ausreichendem Abstand zur Wurzel und dem Hypocotyl aus dem Agar ausgeschnitten. Die in Agar eingebettete Pflanze wurde mit einem Tropfen Nährlösung der gleichen Konzentration wie im Agarblock auf dem Deckglas der Labtek-Chamberslide für die Aufnahme positioniert.

Pflanzen, deren Wurzel auf der Agaroberfläche wuchs, konnten mit einer Pinzette vorsichtig direkt auf das Deckglas einer ‚Chamberslide‘ überführt werden, so dass die Wurzel in der entsprechenden Nährlösung eingebettet war. Zum Schutz der Wurzel wurden kleine Knetpunkte auf das Deckglas der ‚Chamberslide‘ aufgetragen, die das kleinere obere Deckglas (18 x 18, Fa. VWR International, Darmstadt) auf ausreichendem Abstand hielten, um die Wurzel nicht zu quetschen. Nach der Aufnahme wurden die Agarblöckchen wieder in die Petrischale zurück-transferiert. Die beobachtete Wurzel wuchs dort in allen Fällen weiter, auch über die ‚Blockgrenze‘ hinweg.

#### **4.4.2 Timelapse-Aufnahmen der CycB1;1-GFP-Aktivität**

Die in Chamberslides angezogenen *Arabidopsis*-Pflanzen konnten, sobald die Wurzel bis auf das Deckglas herabgewachsen war und dort zumindest zeitweise nahezu waagrecht wuchs, ohne weitere Präparation beobachtet werden. Das 20-fach Multiimmersionsobjektiv bot mit Wasserimmersion sowohl eine ausreichende Auflösung als auch ein genügend großes Bildfeld. Für die Timelapse-Aufnahmen wurde etwa der halbe Wurzeldurchmesser als dreidimensionaler Scanbereich eingestellt. Pro dreidimensionalem Stapel betrug die Aufnahmezeit in der Regel eine Minute. Die Anzahl der Timelapse-Durchläufe war bei der benutzten Auflösung durch die Software auf 60 Zeitschritte (mit 2 Kanälen und 25 Schnitten pro Stapel) beschränkt, so dass für längere Beobachtungszeiten mehrere Timelapse-Aufnahmen nacheinander gestartet werden mussten, wodurch eine Pause zwischen den Serien unvermeidbar war. Dies bot die Möglichkeit, während der Aufnahme oder zwischen zwei Serien die Umweltbedingungen zu verändern, um die Dynamik der Reaktion auf diese Veränderung zu beobachten. Später wurden auch in Chamberslides angezogene Pflanzen verwendet, um den Einfluss von veränderten Umweltbedingungen zu untersuchen. Dazu wurde die Agarschicht um die Wurzelspitze vorsichtig mit Skalpell und Spatel entfernt und anschließend mit der gewünschten Nährlösung bzw. bidestilliertem Wasser gefüllt.

#### 4.4.3 Semi-automatische Detektion der GFP-enthaltenden Zellen

In mehreren Schritten wurden die Bilddaten mit Hilfe einzelner Tools (Cavallo 2002) weiter verarbeitet. Diese Programme führen folgende Operationen durch:

- **Konvertierung** in ein geeigneteres Bildformat („KDF“-Format)
- Bestimmung der geeigneten **Schwellwerte** für jeden Zeitpunkt
- **Dreidimensionale Segmentierung** mit diesen Schwellwerten
- **Umwandlung** der segmentierten Daten in „Chords“-Koordinaten<sup>4</sup>
- Bestimmung von **Volumenstrukturen**, die eine vorgegebene Größe übersteigen
- **Tracking** der gefundenen Spots über die Zeit

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Auswertung werden in einer Datei, die Koordinaten der einzelnen detektierten Volumenelemente („Spots“) der Reihe nach auflistet, ausgegeben. Für jedes Volumenelement werden die Daten in der Reihenfolge Zeitschritt, X-, Y- und Z-Koordinate des Schwerpunktes sowie Intensität des gesamten Volumenelements aufgelistet (Tabelle 4-5). Die Anzahl der GFP-Cyclin enthaltenden Zellen kann für jeden Zeitschritt aus dieser Datei ermittelt werden. Die Kinetik der GFP-Cyclin Zu- bzw. Abnahme lässt sich nach Einlesen der Ergebnisdatei in Excel durch lineare Fits bestimmen. Aus den Excelgrafiken lassen sich der Beginn der GFP-Cyclin Expression, der Zeitpunkt der maximalen CycB1;1-GFP-Akkumulation und des beendeten Abbaus bestimmen (Abb. 4.8).

**Tabelle 4-5: Ausschnitt einer Ergebnis-Datei** mit Koordinaten der verfolgten CycB1;1-GFP exprimierenden Zellen

Spot Nummer	Zeitschritt	X-Koordinate	Y-Koordinate	Z-Koordinate	Intensität des Volumenelementes
1	0	602.2764	155.0679	36.8322	403486
	1	603.9893	155.2707	35.96043	405528
	2	605.8708	155.1882	35.12461	421163
Zeitschritte 3 bis 17 zur besseren Übersichtlichkeit weggelassen					
	18	631.321	153.3746	33.2901	12918
	19	632.6992	152.9848	33.58446	5004
	20	634.6892	153.1233	33.49781	1612
2	0	601.9582	123.856	61.9952	220314
	1	604.3474	125.4173	59.16938	209282
Zeitschritte 2 bis 43 zur besseren Übersichtlichkeit weggelassen					
	44	674.9533	121.5438	53.48564	10552
	45	675.8666	120.9998	53.72627	4060

<sup>4</sup> Chords-Koordinaten geben Strukturen durch Linien wieder, die jeweils durch einen Anfangspunkt und die Länge in X-Richtung definiert werden

Um Fehler dieser semi-automatischen Auswertung (besonders wenn zwei oder mehr benachbarte Zellen ohne Zwischenraum GFP-Aktivität aufweisen) zu erkennen und auszugleichen wurden die Ergebnisse zusätzlich mit dem nachfolgend beschriebenen Tool betrachtet.

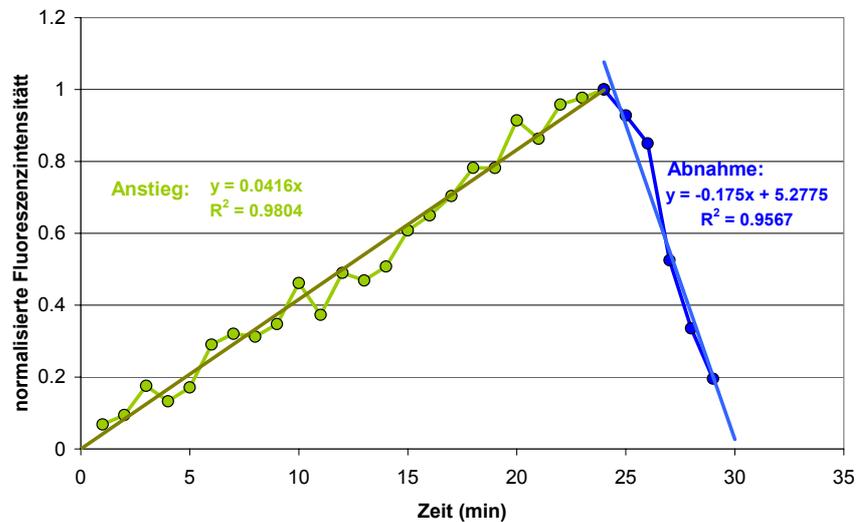


Abb. 4.8: Beispielhafte CycB1;1-GFP Aktivitätskurve einer Zelle

#### 4.4.4 Visualisierung der dreidimensional segmentierten und getrackten Spots

Die mit der oben beschriebenen Methode erhaltenen Trajektorien der Cyclin-GFP aktiven Zellen konnten mit dem Programm ‚Visubild‘ (Andrés Chavarria, Forschungszentrum Jülich) auf das Fluoreszenzbild und Transmissionsbild projiziert werden. Dabei werden die Spots je nach Ebene, in der das Zentrum liegt, farbkodiert (blau entspricht nah am Objektiv, rot vom Objektiv weit entfernt, Abb. 4.9). ‚Visubild‘ ermöglicht sowohl die Anzeige und das Scrollen der einzelnen z-Ebenen als auch die Darstellung der Daten auf Projektionen der dreidimensionalen Bildstapel für jeden Zeitpunkt. Dieses Tool wurde zur visuellen Kontrolle der automatisch segmentierten und verfolgten Aktivitätspunkte verwendet. Auf diese Weise konnten kleine Fehler der semi-automatischen Auswertung überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden.

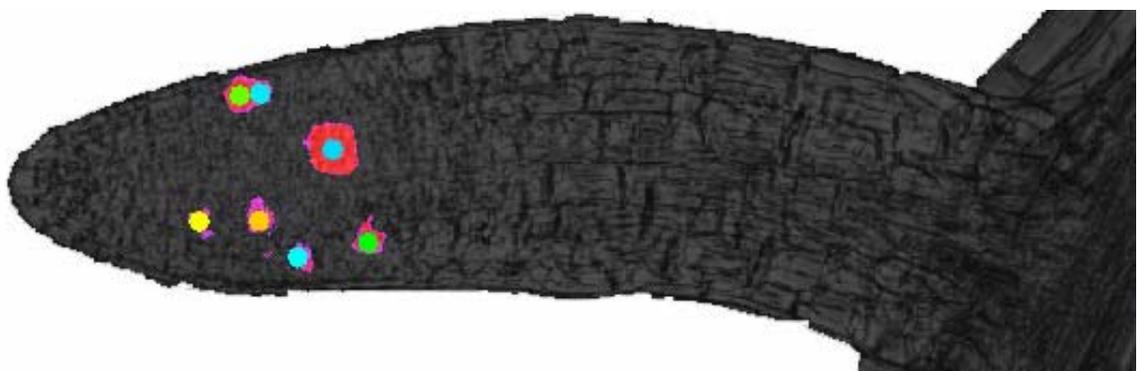


Abb. 4.9: Beispiel für ein ‚Visubild‘ Overlay-Bild aus dem Transmissionsbild (dunkelgrau), der GFP-Fluoreszenz (rot) und den semiautomatisch gefundenen ‚Spots‘ (z-Ebene farbkodiert: blau außen, orange am weitesten innen).

Für die automatische Erstellung von **Projektionen in Z-Richtung** pro dreidimensionalem Stapel aus den Fluoreszenzbildern (GFP-Kanal) wurde in der auf Bildverarbeitung spezialisierten Interpretersprache Heurisko (Fa. Aeon Verlag, Hanau) ein Programm (sog. Workspace) geschrieben. Dieser Heurisko-Workspace lädt jeweils einen dreidimensionalen Bildstapel, entrauscht die Einzelbilder durch zweifache Anwendung eines Diffusionsfilters und projiziert das Maximum des Grauwertes in Z-Richtung des Bildstapels für jeden Pixel des projizierten Bildes. Von dem projizierten Bild wird abschließend der mittlere Grauwert abgezogen. Negative Werte werden durch den Grauwert null ersetzt.

In den oben beschriebenen Ablauf wurde ein Workspace (Dierig 2002) integriert, der aus jeweils einem dreidimensionalen Stapel der Transmissionsbilder ein tiefenscharfes Bild erzeugt.

#### 4.5 Wachstumsanalyse durch digitale Bildsequenzverarbeitung

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war es, Wachsratenprofile in den Wachstumszonen der aufgenommenen Wurzeln mit hoher raum-zeitlicher Auflösung zu ermitteln. Mit Hilfe der DISP-Technik (Digital Image Sequence Processing, Walter 2001) konnte die Wachstumsgeschwindigkeit in der Streckungszone in Abhängigkeit von der Wurzelspitze als Ursprung der sich streckenden Zellen sowie die relative elementare Wachsrate (REGR) ermittelt werden.

In interdisziplinärer Zusammenarbeit wurden hierfür zahlreiche Erweiterungen und Optimierungen vorgenommen, um auch schnelle und kurzfristige Veränderungen der Wachstumsdynamik, wie z.B. nach rascher Veränderung der Umweltbedingungen (siehe Kap. 5.2), analysieren zu können. Ein weiterer Schwerpunkt war die Portierung der für Maiswurzeln eingeführten DISP-Methode auf andere Arten wie *Arabidopsis*, *Nicotiana* und *Solanum*. Dies ermöglicht das Screenen von Mutanten und die Analyse von transformierten Pflanzen verschiedener Arten.

Unter anderem wurde die Beleuchtung der Maiswurzeln durch neue Halterungen verbessert (reflexfreier und heller), die Aufnahmefrequenz durch Optimierung der Aufnahme-Workspaces erhöht und die Auswertung durch neuere Verfahren verbessert (Scharr 2000, Spies 2001, Kirchgessner 2003). Das Verfolgen der Wurzelspitzen im Aufnahmebereich durch computergesteuerte Verschiebetische (Küsters 2001) ermöglicht die Untersuchung von Veränderungen über mehrere Tage. Für die Aufnahme der viel kleineren Wurzeln von *Arabidopsis*, Tabak und Kartoffel war die Konstruktion eines eigenen Aufbaus ‚Mikrorhizotron‘, siehe unten) mit mikroskopischer Hellfeldbeleuchtung im nahen Infrarot (NIR) notwendig.

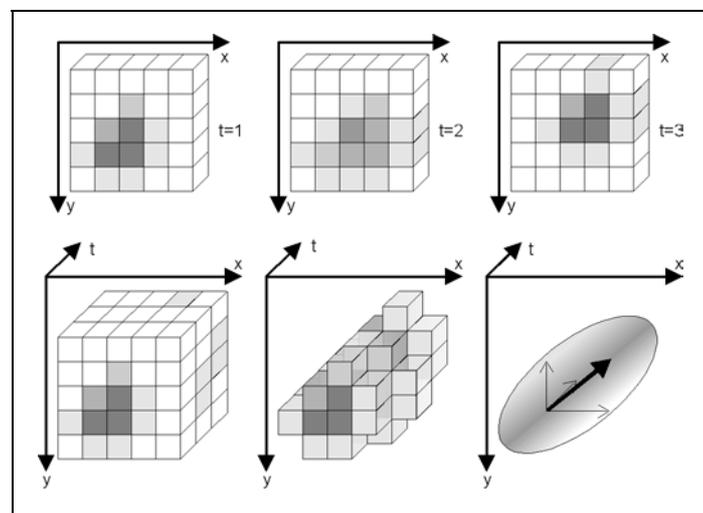
Die ‚DISP‘-Methode wurde auch durch zwei biologische Diplomarbeiten (Gasche 2001, Nagel 2003), die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind, dem Routinebetrieb näher gebracht.

### 4.5.1 Messprinzip

Die Wurzelspitzen werden mit Dioden beleuchtet, die im nahen Infrarot (NIR,  $\lambda_{\max}=940$  nm) emittieren. Diese werden durch eine CCD-Kamera (siehe Tabelle 4-6), deren CCD-Chip parallel zur Bildebene ausgerichtet ist, in regelmäßigen Zeitabständen (zwischen 10 s und 1 min) aufgenommen. Die Veränderung des Grauwertmusters über die Zeit einer Bildsequenz kann durch das **Strukturtensor-Verfahren** (Bigün & Granlund 1987, Haußecker & Spies 1999) ausgewertet werden, um die Geschwindigkeiten der einzelnen Bildpunkte (= Pixel) in x- und y-Richtung (Längs- bzw. Querachse des CCD-Chips) zu bestimmen.

Jedes Grauwertmuster des Bildes führt in einem Bildstapel der Bildsequenz (x- und y-Koordinaten der Bilder und der Zeit als dritten Achse) zu einem dreidimensionalen virtuellen Gebilde (Abb. 4.10). Unter der Voraussetzung, dass sich die Helligkeit der betrachteten Struktur über die betrachtete Zeit nicht verändert hat, beschreiben Vektoren konstanter Helligkeit die Geschwindigkeit (Bewegung über die Zeit). Die Berechnung erfolgt pixelweise. Dazu wird ein virtueller Quader (7x7 Pixel x-/y- und 11 Pixel t-Achse) mit dem betrachteten Pixel als Mittelpunkt gebildet und der berechnete Vektor der konstanten Helligkeit als Wert für den betrachteten Pixel abgespeichert.

Die auf diese Weise bestimmten Geschwindigkeitswerte werden durch Bildung der Divergenz benutzt, um die REGR zu bestimmen.



**Abb. 4.10: Schematisierte Darstellung der Geschwindigkeitsbestimmung mit dem Strukturtensor-Verfahren:** Eine Grauwertstruktur führt in einem Quader mit x- und y-Koordinaten der Bilder und der Zeit als dritten Achse zu einem dreidimensionalen Gebilde, dessen Orientierung der Geschwindigkeit zum betrachteten Zeitraum entspricht. (aus Walter 2001).

### 4.5.2 Aufbauten zur Bildsequenzaufnahme

Für die Aufnahme von Bildsequenzen zur anschließenden Auswertung mit der Strukturtenormethode ist eine über einen Framegrabber an einen Computer angeschlossene CCD-Kamera mit geeigneter Aufnahmesoftware und gleichmäßiger Beleuchtung des aufgenommenen Objektes notwendig.

Während der vorliegenden Arbeit wurden je nach Aufnahmeobjekt verschiedene CCD-Kameras verwendet (vgl. Tabelle 4-6). Als Objektiv kam entweder ein Cosmimar 25-mm-Objektiv (Blende 1,4-16; Schärfbereich 17 cm bis unendlich; Fa. The Imaging Source, Bremen) oder ein 4-fach Mikroskopobjektiv (0,1 NA; Fa. Linos, Göttingen) mit Mikroskoptubus (Fa. Linos, Göttingen) zum Einsatz. Der Bildausschnitt und die Objektdistanz wurden bei der Benutzung des 25-mm-Objektivs durch verschieden große Zwischenringe angepasst (Tabelle 4-7).

Die Beleuchtung wurde durch NIR-LED-Arrays (15 NIR-Dioden;  $\lambda_{\max} = 940 \text{ nm}$ ; Fa. Conrad Electronic, Hirschau) im Auflicht- (Rhizotron, s.u.) oder Durchlichtverfahren (Mikrorhizotron, s.u.) realisiert.

Tabelle 4-6: Übersicht über die verwendeten CCD-Kameras.

Kameratyp	Hersteller bzw. Bezugsquelle	Auflösung (Pixel)	Bemerkung
Sony XC-75	Linos, Göttingen	max. 752 x 566	Standard s/w CCD-Kamera, <b>ohne Infrarot-Sperrfilter</b>
DMK-3032NIR	The Imaging Source, Bremen	max. 752 x 566	s/w CCD-Kamera, die im NIR-Bereich sensitiver ist als Standard CCD-Kameras
Pixelfly Scientific	PCO, Kelheim	1280 x 1024	s/w 12bit CCD-Kamera mit hoher Auflösung, variabler Belichtungszeit (10 $\mu$ s - 10s) und geringem Dunkelrauschen

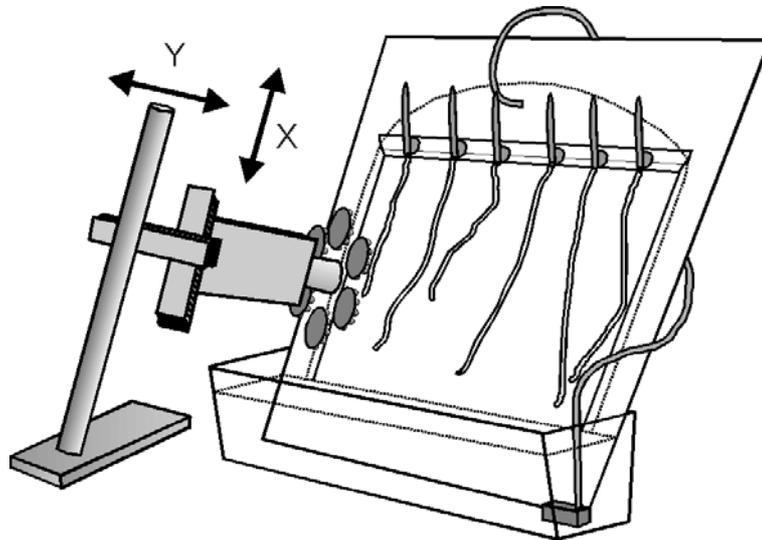
Tabelle 4-7: Übersicht der mit dem Cosmimar-25-mm-Objektiv verwendeten Zwischenringe.

Zwischenringdicke	Aufnahmebereich	Objektdistanz
5 mm	23 x 14,5 mm (Sony XC75, 740 x 480 Pixel)	9,5 cm
10 mm	15,6 x 10 mm (Sony XC75, 740 x 480 Pixel)	5 cm
20 mm	8 x 5 mm (Sony XC75, 740 x 480 Pixel)	2,4 cm
40 mm	3,7 x 2,4 mm (Sony XC75, 740 x 480 Pixel)	0,65 cm

#### 4.5.2.1 Durchfluss-Rhizotron

Zur raschen Variation einzelner Umwelteinflüsse während der Bildsequenzanalyse wurde das sogenannte Durchfluss-Rhizotron (Abb. 4.11) eingesetzt. Dieser spezielle Anzucht-Aufbau besteht aus einer Grundplatte aus schwarzem Kunststoff, deren Seiten zur Stabilisierung nach vorne gebogen sind. Ein Plexiglashalter, der im oberen Bereich der Grundplatte befestigt wird, dient zur Aufnahme von bis zu 20 Maiskeimlingen. Die Wurzeln der Maiskeimlinge werden durch eine transparente Haushaltsfolie bedeckt, die ebenfalls am Plexiglashalter angebracht wird. Die Grundplatte wird mit einer Neigung von  $68^\circ$  gegen die Horizontale in einem Kunststoffbehälter (Fa. Dehner, Rain am Lech, Volumen 15 l) verankert. Die Nährlösung wird in diesen Kunststoffbehälter eingefüllt und durch eine Tauchpumpe auf die Grundplatte über dem Plexiglashalter gepumpt. Der Flüssigkeitsstrom wird durch den Plexiglashalter auf die ganze Breite aufgeweitet und umspült die Wurzeln als überwiegend laminarer Strom zwischen Grundplatte und Haushaltsfolie.

Durch Zugabe von konzentrierter Nährlösung bzw. einzelnen Substanzen in die Nährlösung im Kunststoffbehälter oder durch das Erhitzen bzw. Kühlen der Nährlösung ist die rasche Variation von Umwelteinflüssen während der Bildaufnahme möglich.



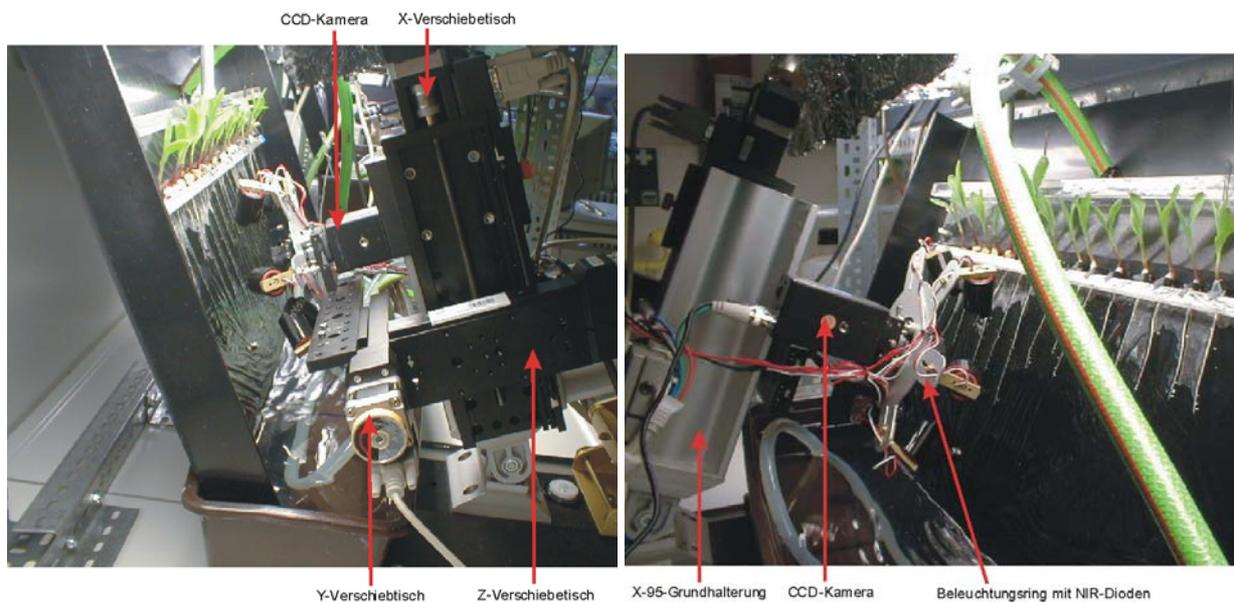
**Abb. 4.11: schematische Darstellung des Durchfluss-Rhizotrons.** Auf einer Grundplatte werden die Pflanzen mit einem Plexiglas-Halter befestigt und wachsen zwischen dieser und Haushaltsfolie. Aus einem Vorratsbehälter, in dem die Grundplatte verankert ist, wird die Nährlösung mit einer Tauchpumpe auf die Grundplatte nach oben gepumpt und fließt zwischen Grundplatte und Haushaltsfolie zurück (aus Walter 2001).

Die Kamera ist an computergesteuerten Verschiebetischen (Fa. Owis, Staufen) montiert und wird an einem aus X95-Profilen (Fa. Linos, Göttingen) bestehenden Gestell mit der Bildachse parallel zur Ebene der Grundplatte ausgerichtet, um Fehler durch optische Verzerrungen zu

vermeiden (Abb. 4.12). Die beobachtete Wurzel wird mit einer Beleuchtungseinheit aus einem Aluminiumring mit sechs beweglich angebrachten NIR-LED-Scheinwerfern nahezu senkrecht zur Grundplattenebene beleuchtet. Diese Beleuchtung sorgt für einen hohen Kontrast zwischen Wurzel und schwarzer Grundplatte bei weitgehender Eliminierung von Reflexen auf der Haushaltsfolie. Nahes Infrarotlicht hat auch den Vorteil, dass es Pflanzenwachstum nicht beeinflusst (Schmundt et al. 1998). Die Kamera ist mit einem RG-9 Filter (Fa. Schott, Wiesbaden) bestückt, der eine gute Transmission im nahen Infrarot aufweist und sichtbares Licht absorbiert.

Die computergesteuerten Verschiebetische werden nicht nur zur Verfolgung (x-, y- und z-Achse) der Wurzelspitze über den Beobachtungszeitraum, sondern auch zur Einstellung vor der Aufnahme benötigt. Der Einsatz der Verschiebetische ermöglicht darüber hinaus auch die sequentielle Aufnahme mehrerer Wurzeln oder mehrerer überlappender Ausschnitte einer Wurzelspitze.

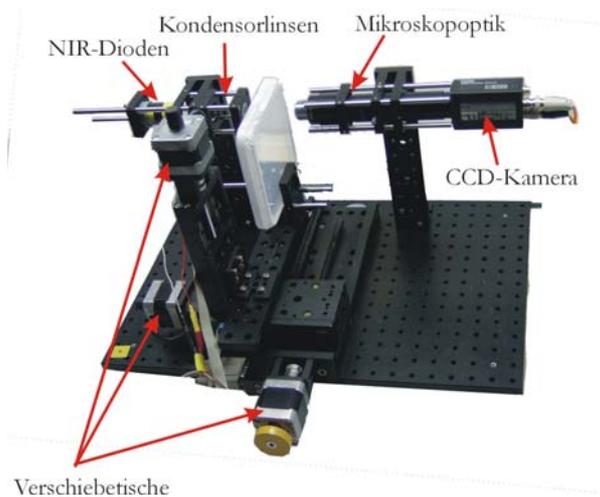
Die Wurzeln und der Kamerabereich wurden während der Versuchszeit durch schwarze Plastikfolie abgedunkelt (bei Abb. 4.12 zur besseren Übersicht entfernt).



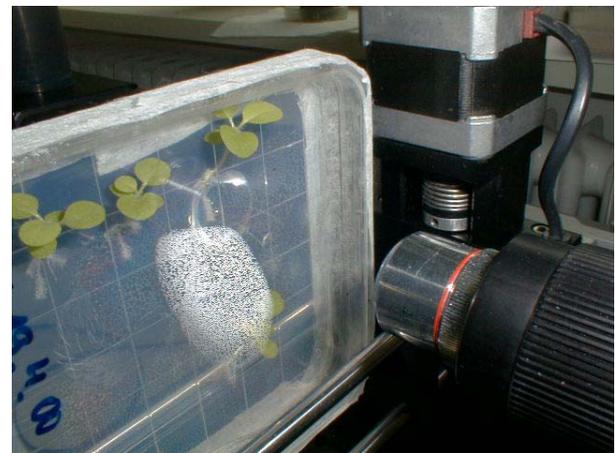
**Abb. 4.12: Durchfluss-Rhizotron:** Die CCD-Kamera ist an drei computergesteuerten Verschiebetischen montiert, die an einem flexiblen Gestell aus X95-Profilen befestigt sind. Direkt am Objektiv befestigt ist auch der Beleuchtungsring mit sechs NIR-LED-Scheinwerfern(nach Nagel 2003).

#### 4.5.2.2 Mikrorhizotron

Zur Aufnahme von Pflanzen mit kleineren Wurzeldurchmessern (*Arabidopsis*, *Nicotiana*, *Solanum*) wurde das Mikrorhizotron (Abb. 4.13, Abb. 4.14) mit Einzelkomponenten aus dem Mikrobanksystem (Fa. Linos, Göttingen) konstruiert. Wie bei dem Durchfluss-Rhizotron sind drei computergesteuerte Verschiebetische zur Einstellung und Verfolgung der Wurzelspitzen<sup>5</sup> in den Aufbau integriert. Die Beleuchtung der Wurzeln für die Visualisierung erfolgt bei diesem Aufbau mit Durchlicht. Nahes Infrarot aus einem Array mit 15 NIR-Dioden wird durch eine Volumenstreukscheibe homogenisiert und durch zwei asphärische Kondensorlinsen ( $f = 15\text{ cm}$ ; Fa. Linos, Göttingen) auf das Objekt abgebildet. Die Kamera ist je nach Wurzelgröße mit einem 25 mm Objektiv an einem 40 mm Zwischenring (The Imaging Source, Bremen) oder einem 4-fach Mikroskopobjektiv an einem Mikroskoptubus (Fa. Linos, Göttingen) ausgerüstet. Für die vorliegende Arbeit wurden vorwiegend Wurzeln aufgenommen, die in Petrischalen im Agar wuchsen. Wurzeln, die auf dem Agar wachsen, wölben diesen an der Grenzfläche ein, wodurch die Wurzelstruktur verzerrt wird. Im Gegensatz zum Durchfluss-Rhizotron waren daher keine Veränderungen der Umgebungsbedingungen (abgesehen von langsamerer Temperaturveränderung) während der Aufnahme möglich. Diese Beschränkung könnte in Zukunft durch Konstruktion einer passenden Durchflusseinrichtung aufgehoben werden.



**Abb. 4.13:** Mikrorhizotron-Aufbau mit NIR-Hellfeld Beleuchtung und Mikroskoptubus.



**Abb. 4.14:** Beobachtung von Tabak-Pflanzen im Mikrorhizotron.

<sup>5</sup> Verschieben wird hier die Petrischale, damit die Beleuchtungsachse konstant bleibt.

### 4.5.3 Aufnahme der Bildsequenz

Die **Bildaufnahme** und die gleichzeitige Verfolgung der Wurzelspitzen wurde durch Heurisko-Workspaces gesteuert. Der zeitliche Abstand zwischen aufeinanderfolgenden Bildern sowie die Anzahl der pro abgespeichertem Bild gemittelten Einzelbilder<sup>6</sup> wurde jeweils der Geschwindigkeit und den Aufnahmebedingungen des beobachteten Objektes angepasst. So wurden Durchlichtbilder des Mikrorhizotrons meist mit hohen Mittelungsfaktoren (z.B. 50) aufgenommen, da dabei die Wandstrukturen, deren Bewegung bestimmt werden soll, erhalten bleiben. Organellbewegungen, die unabhängig von der Wachstumsrichtung sind, verwischen, so dass ihre Bewegung nur minimal die Auswertungsergebnisse beeinflusst. Der Zeitabstand wurde stets deutlich unter 1,5 Pixel Wachstum der Wurzelspitze pro Zeitschritt eingestellt, da der Fehler der Strukturtensor-Methode in diesem Bereich am geringsten ist (Scharf 2000).

Da die Wurzelspitze relativ schnell aus dem Aufnahmebereich herauswächst, wurde im Rahmen einer physikalischen Diplomarbeit (Küsters 2001) die Wurzel Aufnahme durch ein ‚**Wurzelfolger**‘-Modul erweitert, das die Kameraposition durch Ansteuerung der Verschiebetische anpasst, sobald die Wurzelspitze in die Nähe des Bildrandes wächst. Zusätzlich bietet das ‚Wurzelfolger‘-Modul auch die Möglichkeit, mehrere Wurzeln sequenziell aufzunehmen oder die Auflösung zu steigern, indem die Wachstumszone einer Wurzel durch mehrere überlappende Teilbilder aufgenommen wird. Zu Beginn der ‚Wurzelfolger‘-Aufnahme wurden jeweils folgende Parameter festgelegt:

- Anzahl der Aufnahmen
- zeitlicher Abstand zwischen den einzelnen Aufnahmen
- Anzahl der aufgenommenen Wurzeln
- Anzahl der Teilbilder pro Wurzel
- der zu verfolgende Bereich wurde durch ein Rechteck markiert.

Während der Aufnahme wurde jeweils das aktuelle Wurzelbild sowie der zur Verfolgung ausgewählte rechteckige Bereich angezeigt.

---

<sup>6</sup> Um Helligkeitsschwankungen und Bildrauschen zu vermindern, wurden 20-100 Bilder in Folge aufgenommen und in ein float-Bild (jeder Bildpunkt kann 32-bit Fließkomma-Werte annehmen) addiert. Anschließend wird das addierte float-Bild durch die Anzahl der Mittelungen geteilt und das Ergebnis wieder in ein byte-Bild (8-bit Grauwertbild mit Grauwerten von 0-255) kopiert.

#### **4.5.4 Auswertung der Bilddaten**

##### **4.5.4.1 Begutachtung der Bildsequenz**

Vor der Auswertung einer Sequenz durch das Strukturtensorverfahren wurde eine Begutachtung der Aufnahme auf eventuelle Störstellen durchgeführt. Zur Betrachtung der Bildserien wurde für Einzelbildserien die Software ACDSee eingesetzt (Fa. ACDSee Systems, Victoria, Kanada); für Serien, die in einer einzigen Tif-Datei abgespeichert waren, wurde die Software Scroll (Andrés Chavarria, Forschungszentrum Jülich) verwendet. Beide Programme ermöglichen es, einen Film der Bildsequenz ablaufen zu lassen, um eine erste Begutachtung der Daten vorzunehmen. Zu häufigen Fehlerquellen, die leicht mit dem Auge erkennbar sind, gehören Luftblasen und deren Reflexionen bzw. Lichtstreuungen, Staubpartikel oder Spritzer auf der die Wurzeln abdeckenden Haushaltsfolie sowie starke, durch die Nährlösungsströmung bewirkte Verschiebungen der Wurzeln. Bildsequenzen, die solche Störstellen enthielten, wurden entweder gar nicht ausgewertet oder nur in Bereichen der Sequenz, die davon nicht betroffen waren.

##### **4.5.4.2 Vermessen des Wurzeldurchmessers**

Die Wurzeldurchmesser wurden auf Grundlage der Bildsequenzdaten mit dem Grafik-Programm Corel Draw 9 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) vermessen. Dazu wurde für jede Messserie eine Kalibration durchgeführt. Anschließend wurden die Bilder in Corel Draw importiert und mit der Funktion ‚Diagonale Dimension‘ wurde am Ende der Streckungszone der Wurzeldurchmesser bestimmt.

##### **4.5.4.3 Vorverarbeitung der Bildsequenz (Filtern)**

Bei den mit NIR-Hellfeld Beleuchtung im Mikrorhizotron aufgenommenen Bildern (dunkle Wurzeln auf ungleichmäßig hellem Hintergrund, Abb. 4.16 A,C,E) hat es sich als sinnvoll herausgestellt, die Bilder vor der Strukturtensor-Auswertung zu invertieren und von jedem Pixel den mittleren Grauwert abzuziehen (nun erscheinen die Wurzeln hell auf nahezu schwarzem Hintergrund, Abb. 4.16 B,D,F). Dieses Verfahren erhält die benötigten Strukturen der Wurzel, steigert aber den Kontrast zum Hintergrund und verringert die Rechenzeit der Strukturtensor-Auswertung, da auf dem schwarzen Hintergrund nicht gerechnet werden muss.

Für die Durchfluss-Rhizotron-Aufnahmen war eine Vorfilterung in der Regel nicht notwendig, da die Aufnahmen ausreichend kontrastreich bei nahezu schwarzem Hintergrund (Abb. 4.15) waren.

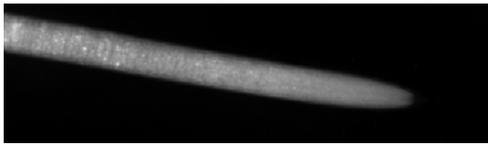


Abb. 4.15: Originalbild einer Maiswurzel (oben) aufgenommen mit dem Durchfluss-Rhizotron Aufbau.

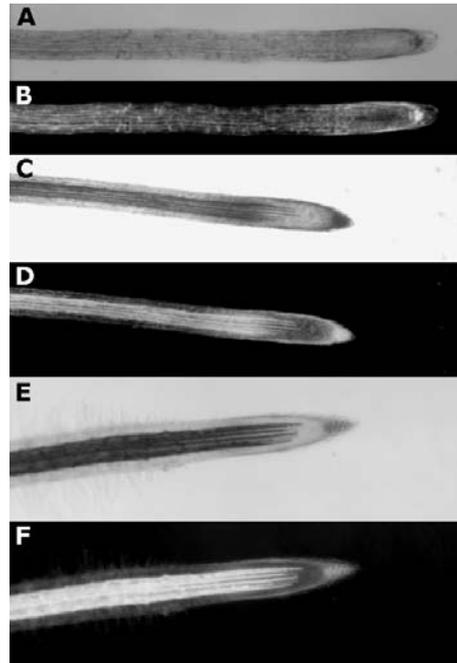


Abb. 4.16: Beispiele für Wurzelbilder bei NIR-Hellfeld Beleuchtung im Mikrorhizotron vor und nach Filterung. A + B Arabidopsis Wurzel, C+D Kartoffel Wurzel und E+F Tabak Wurzel.

Um die Datenmenge zu verringern (Einsparen von Rechenzeit und Speicherplatz) wurde teilweise ein Heurisko-Workspace (Kirchgessner 2003) eingesetzt. Nach Einstellung eines Schwellwert-Bereiches wird das jeweils größte Objekt aller Bilder bestimmt und anschließend die minimale Bildgröße errechnet und die Bilder entsprechend zugeschnitten.

#### 4.5.4.4 Strukturtensor-Auswertung

Die Auswertung wird ebenfalls mit Heurisko-Workspaces (Spies & Scharf 2001) durchgeführt. Je nach Art der Bilddaten müssen verschiedene Parameter angepasst werden, um optimale Ergebnisse zu erzielen:

- **„tau“**: Eigenwerte der Strukturtensoranalyse werden auf Null gesetzt, wenn sie „tau“ nicht übersteigen. Je höher das Bildrauschen ist, desto größer muss auch „tau“ gewählt werden. Typische „tau“-Werte waren für Mais 0,15, für Tabak 0,3, für Kartoffel 1,3 und für *Arabidopsis* 1,2.
- **„noise“**: Gibt die Schwelle auf die Summe der Eigenwerte der Strukturtenormatrix an. Wenn die Summe der Eigenwerte unter „noise“ liegt wird nicht gerechnet, da in diesem Fall die Spur sehr wahrscheinlich durch das Rauschen (bei korrekter „noise“-Einstellung) und nicht durch eine Struktur hervorgerufen wurde. Je mehr Rauschen (z.B. auch durch Zellorganellbewegungen bei Durchlichtaufnahmen oder Verstärker rauschen der CCD-Kamera) in den Bildern ist, desto höher muss „noise“ eingestellt werden. Typische „noise“-Werte waren für Mais 0,44 , für Tabak 0,89 , für Kartoffel 3,89 und für *Arabidopsis* 3,59.

- **Schwellwert:** Um die Auswertung auf die Wurzel zu beschränken (weniger Rechenaufwand und Verringerung der Fehler) kann je ein unterer und oberer Schwellwert gesetzt werden. Diese beiden Werte sollten so angepasst werden, dass die Wurzel in diesem Helligkeitsbereich liegt.
- **Bildgröße:** Der Strukturtensor-Workspace muss auf veränderte Originalbildgrößen angepasst werden. Es ist auch möglich, auf geringeren ‚Pyramidenstufen‘ zu rechnen: Das Originalbild hat ‚Pyramidenstufe 0‘, bei ‚Pyramidenstufe 1‘ wird die Bildbreite und -länge halbiert, wodurch die Bildgröße und die Rechenzeit auf ein Viertel reduziert wird, aber das Ergebnis auch eine entsprechend geringere räumliche Auflösung besitzt. Weiterhin besteht auch die Möglichkeit nur einen **Ausschnitt auszuwerten**, was bei Wurzeln besonders effektiv ist, da nur ein geringer Teil der Bildhöhe (von Standardformaten) ausgefüllt ist. Für die meisten Auswertungen in dieser Arbeit wurde nur ein 240 Pixel hoher Streifen der Gesamtbildgröße von 480 Pixeln verwendet.
- **Regularisierungsparameter:** Da die Strukturtensor-Methode selten für jeden Pixel zu jedem Zeitpunkt ein Ergebnis ermitteln kann und die Ergebnisse auch einer statistischen Fehlerstreuung unterliegen, werden die Werte anschließend regularisiert (geglättet und interpoliert). In der vorliegenden Arbeit wurde die normalisierte Faltung (Jähne 2002) mit 2 Glättungsfiltern (je ein rekursiver und ein iterativer) angewandt. Die Glättung (per Diffusion) unterscheidet zwischen gemessenen Daten und Datenlücken: Während Datenlücken immer interpoliert werden, werden gemessene Daten nur leicht geglättet. Folgende Parameter wurden eingestellt: ‚smooth = 10000.0‘ (gibt an, wie stark geglättet wird); ‚viter = 15‘ (Anzahl der Iterationen des iterativen Filters); ‚viter\_rec = 50‘ (Anzahl der Durchläufe des rekursiven Filters); B\_x\_rec = 0.45, 0.55 (geringe Glättung in Wurzel-Richtung); B\_y\_rec = 0.6, 0.4 (stärkere Glättung senkrecht zur Wurzel)

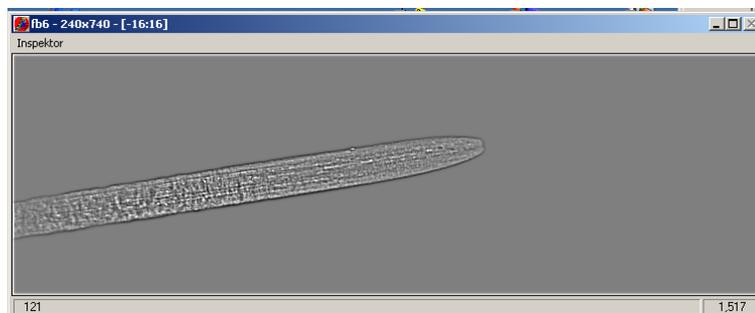


Abb. 4.17: Hochpass-Filterung der Wurzel, die in die Strukturtensorberechnung eingeht, wird dargestellt.

Während der Auswertung werden für den aktuellen Bildstapel (pro Zeitpunkt wird über jeweils 11 Bilder ausgewertet) das aktuelle Hochpass-gefilterte Bild (Abb. 4.17) und die folgenden Werte in Bildform ausgegeben:

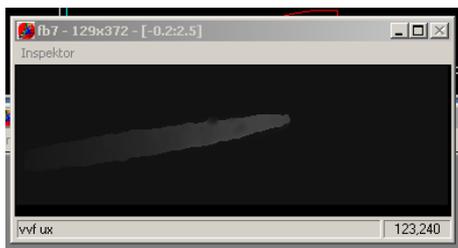
- **„Rang“:** Anzahl der Strukturtensor-Eigenwerte über Null bzw. ‚tau‘. Nur Werte mit Rang 2 (Werte für sowohl für die x- als auch y-Richtung) werden verwendet, daher ermöglicht die Rang-Anzeige eine erste Beurteilung der Auswertungsqualität (Abb. 4.18).
- **„model error“:** Gibt das ‚total least squares‘ Residuum der optischen Flussgleichung an. Ist es Null, ist die optische Flussgleichung ohne Fehler erfüllt; wenn sie unter ‚tau‘ liegt, wird der kleinste Eigenwert als Modellfehler akzeptiert. Bei größeren Werten als ‚tau‘ wird die Lösung nicht akzeptiert und der Rang auf 3 gesetzt.
- **„coherence“:** Ist ein normiertes Maß, das die Qualität der Analyse angibt (Abb. 4.19, Jähne 2002).
- **Geschwindigkeit in x- und y-Richtung:** Die für einzelne Pixel ermittelten Geschwindigkeiten werden Graustufenkodiert angezeigt (Abb. 4.20).
- **Geschwindigkeits- und Divergenzprofil:** Die regularisierte x-Geschwindigkeit und die berechnete Divergenz, die der relativen Wachsrates entspricht, werden zu jedem Zeitschritt in einem Diagramm angezeigt (Abb. 4.21)



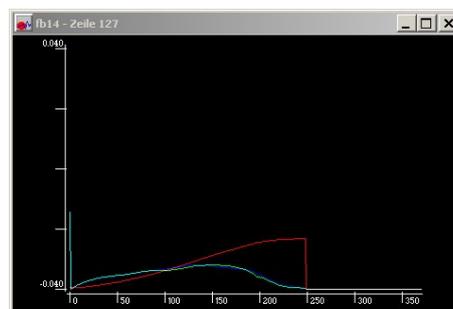
**Abb. 4.18: Rang der Strukturtensor-Matrix.** Der helle Teil der Wurzel auf diesem Beispiel hat Rang 2 (x- und y-Geschwindigkeit können berechnet werden), der dunklere Rang 1. Dem Hintergrund ist Rang 0 zugewiesen und Rang 3 ist auf diesem Beispielbild nicht vorhanden.



**Abb. 4.19: Die Coherence** ist ein normiertes Maß für die Güte der Berechnung und zeigt an, welche Pixel für die Berechnung des Struktur tensors benutzt werden.



**Abb. 4.20: Die berechnete Geschwindigkeit in x-Richtung** wird graustufenkodiert angezeigt. Eine Geschwindigkeit von einem Pixel pro Zeitabstand zwischen aufeinanderfolgenden Bildern entspricht dem Grauwert 1.



**Abb. 4.21: Anzeige des Geschwindigkeitsprofils** in x-Richtung (rot) und der daraus berechneten Divergenz (grün/blau).

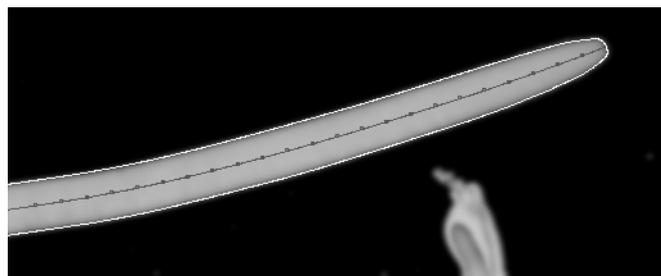
Die Ergebnisse werden entweder in Bildform (die Werte werden als Fließkomma-Grauwerte für jeden Pixel ausgegeben, Abb. 4.20), in Form von GNUPlot-Diagrammen ([www.gnu.org](http://www.gnu.org)) oder spaltenweise als ASCII-Tabelle ausgegeben.

#### 4.5.4.5 Transformation in das Wurzelkoordinatensystem

Das oben beschriebene Auswerteverfahren wertet auf Bildkoordinaten aus und ermittelt die Geschwindigkeit des sich bewegenden Objektes (Wurzel) in x- und y-Richtung des Bildes. Von Interesse sind jedoch die Geschwindigkeiten der verschiedenen Zellen der Wurzel relativ zueinander, woraus dann die REGR errechnet wird. Die Wurzel wächst in den seltensten Fällen exakt gerade und ausschließlich in x-Richtung durch das Bild. Das ruhende Zentrum der Wurzelspitze – der Mittelpunkt des physiologischen Koordinatensystems – wächst oft schlängelnd durch den Beobachtungsbereich.

Zur Transformation der Aufnahmedaten (Bildkoordinaten) in physiologische Koordinaten (Wurzelkoordinaten) wurden parallel zur vorliegenden Arbeit im Rahmen einer physikalischen Dissertation (Kirchgessner 2003) ergänzende Heurisko-Workspaces entwickelt, die:

- den **Wurzelumriss mit Splines** (aktive Konturmodelle, Kirchgessner 2003, Abb. 4.22) detektieren und subpixelgenau in einer Funktion beschreiben
- die **Mittellinie** der Wurzel aus der Splinefunktion berechnen (Abb. 4.22)
- die **Wurzelspitze zum Ursprung des Koordinatensystems** transformieren
- die Strukturtensordaten **entlang der erhaltenen Mittellinie abtasten** und in das physiologische Koordinatensystem übertragen.



**Abb. 4.22: Umrissdetektion und Mittellinienbestimmung** durch „Splines“ (Beispiel anhand einer Maiswurzel), die zur Abtastung der Wuchsratenverteilung entlang der Mittellinie mit der Wurzelspitze als Ursprung („physiologisches Koordinatensystem“) dient.

Dieses Verfahren stand am Ende der vorliegenden Arbeit zur Verfügung und wurde vorrangig für die Auswertung von Bildsequenzen verwendet, in denen die Wurzel besonders schräg wuchs oder oszillierte. Dies traf besonders für die Sequenzen der Maiswurzeln zu, da die Wurzeln im Durchfluss-Rhizotron-Aufbau kaum Widerstand erfahren. In den anderen Fällen, in denen die

Wurzel nahezu waagrecht ohne Oszillationen wächst (bei vielen Sequenzen von Arabidopsis, Tabak und Kartoffel, deren Wurzel in Agar wuchs) wurde die Transformation von Bildkoordinaten in ein Koordinatensystem mit der Wurzelspitze als Ursprung direkt mit den Daten aus der DISP-Auswertung durchgeführt.

#### 4.5.4.6 *Einlesen der ausgewerteten Daten in Excel durch ein VBA-Makro*

Werte aus der Strukturtelemetriauswertung bzw. ins physiologische Koordinatensystem transformierte Werte, die spaltenweise in ASCII-Tabellen abgespeichert sind, wurden mit einem Excel-VBA-Makro weiterverarbeitet. Das Makro führt dabei folgende Funktionen aus:

- **Einlesen der ASCII-Dateien** (je eine Datei für die Geschwindigkeitsverteilung, die Divergenz aus x- und y-Geschwindigkeitsverteilung und die Divergenz nur aus der x-Geschwindigkeitsverteilung).
- **Transformation** der Daten von Bildkoordinaten in ein **Koordinatensystem mit der Wurzelspitze als Nullpunkt** (falls keine Transformation durch Splines durchgeführt wurde).
- **Umrechnung der Daten** von ‚Pixel Bild<sup>1</sup>‘ in **mm h<sup>-1</sup>** bzw. ‚% Bild<sup>1</sup>‘ in **% h<sup>-1</sup>** sowie der Wurzelkoordinaten von Pixeln in Millimeter.
- **Robuste Statistik:** Um Ausreißer zu eliminieren werden Werte gelöscht, die ein einstellbares Vielfaches (meist das Dreifache) der Standardabweichung über- oder unterschreiten. Dieses Verfahren wird dreimal (mit aktualisierten Standardabweichungen) wiederholt.
- Berechnung und Darstellung von **Mittelwerten** über verschiedene Zeiträume (einstellbar).

#### **Ermittlung charakteristischer Werte:**

1. Das **Gesamtwachstum der Streckungszone**, das in der Geschwindigkeit der Wurzelspitze (in Bildkoordinaten) resultiert und im folgenden als  $V_{\text{Spitze}}$  bezeichnet wird.
2. Die **Länge der Wachstumszone** wurde vom Ruhenden Zentrum bis zum Ende der Streckungszone ( $\text{REGR} < 0,2\%$ ) gemessen.
3. Die maximale relative elementare Wachsrates, im Folgenden als  $\text{REGR}_{\text{max}}$  bezeichnet, wurde als Maximum der REGR-Verteilung bestimmt.
4. Der Abstand der maximalen Wachsrates von der Wurzelspitze ( **$\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position**) wird ebenfalls automatisch ermittelt.

5. Die **REGR-Halbwertsbreite** entspricht dem Abstand der Positionen, an denen 50% der  $REGR_{max}$  vorliegen. Dieser Parameter wurde bisher noch nicht für die Charakterisierung von Wurzelwachstum verwendet. In Verbindung mit  $REGR_{max}$  ist er sehr geeignet um die Wachstumsverteilung zu beschreiben, da die Summe aller Wuchsraten in  $V_{Spitze}$  resultiert.
6. Die Wuchsrate an der Wurzelspitze ( **$REGR_{Tip}$** ) wird aus den ersten fünf Werten an der Wurzelspitze gemittelt

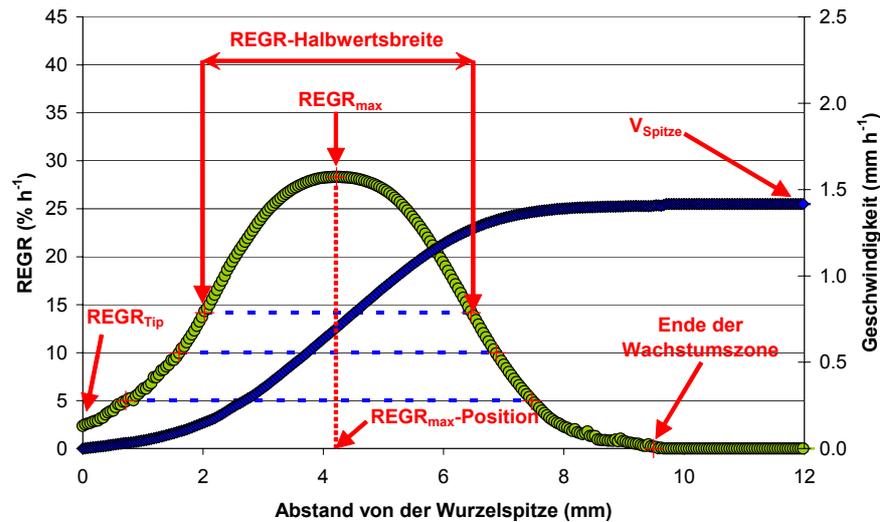


Abb. 4.23: Wachstumsparameter aus dem Excel-VBA-Makro im Wachstumsprofil dargestellt

Aus den Werten, die die Makrosauswertung bestimmt hat, lassen sich weitere Parameter bestimmen, wie z.B. die relative Lage der  $REGR_{max}$  zum Mittelpunkt der REGR-Verteilung. Für Wachstumsprofile von Maiswurzeln in bidestilliertem Wasser bzw. in Nährlösung wurde in der Literatur eine unterschiedliche Lage dieser relativen  $REGR_{max}$ -Position beschrieben (Walter et al. 2003). Daher wurde dieser Parameter zur Quantifizierung der ‚Symmetrie‘ der  $REGR_{max}$ -Verteilung benutzt.

Der **Wurzeldurchmesser** als weiterer Parameter zur Charakterisierung des Wurzelwachstums wurde manuell bestimmt (Kap. 4.5.4.2).

Unter ‚**Symmetrie des REGR-Verlaufs**‘ wurde die Lage der  $REGR_{max}$  relativ zum Mittelpunkt der Kurve verstanden. Dieser Parameter wurde zum Vergleich von REGR-Verteilungen bei Maiswurzeln der verschiedenen Anzuchtbedingungen benutzt.

Nach visueller Überprüfung der vom Makro erstellten Diagramme und Wertetabellen sowie bei Bedarf einzelner manueller Nachbearbeitung wurden diese Daten für die weitere Auswertung verwendet.

#### 4.5.4.7 Ermittlung von Mittelwerten

Um Daten zwischen verschiedenen Versuchen besser vergleichen zu können, wurden jeweils Durchschnittswerte ermittelt. Grundlage waren jeweils die von Ausreißern, z.B. durch das Verschieben der Wurzelspitze durch den Wurzelfolger, bereinigten Daten (s.o. Beschreibung des Excel VBA-Makros). Die Mittelwerte wurden für jeden einzelnen Datenpunkt des Wurzelkoordinatensystems bestimmt. Je nach Versuch (Wachstum bei konstanten Bedingungen oder Betrachtung der Dynamik bei Veränderung der Umgebungsbedingungen) wurden unterschiedliche Zeitintervalle für die Mittelwertbildung verwendet.

Für die Darstellung und den Vergleich von Daten bei **konstanten Außenbedingungen** wurde in den meisten Fällen der Durchschnitt über 250 Messpunkte verwendet (entsprechende Intervalle siehe Tabelle 4-8). Für den Vergleich der Wachstumsparameter über die Zeit bzw. aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  wurden die Werte durch Mittelwertbildung zu Kategorien zusammengefasst und die Standardabweichung (SD) berechnet.

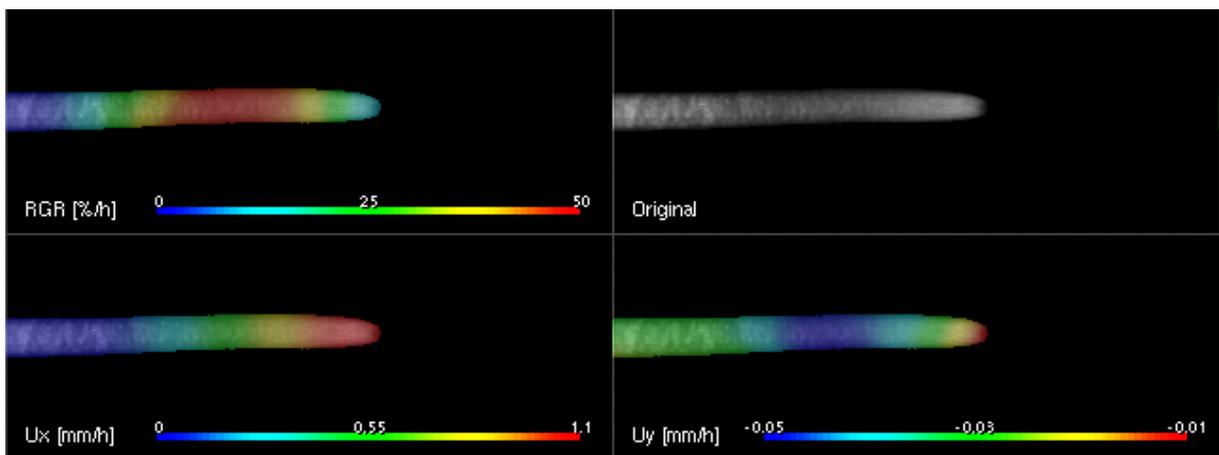
Bei Versuchen, in denen **dynamische Anpassungen auf variierte Umweltparameter** von Interesse waren (Kap.5.2), wurden Mittelwerte über jeweils drei aufeinanderfolgende Zeitpunkte gebildet. Um gleichwertige gemittelte Messpunkte (z.B. zur gleichen Zeit nach Nährlösungsvariation) kombinieren zu können, wurden relative Geschwindigkeits- bzw. REGR-Werte gebildet. Dazu wurde der Durchschnittswert vor der Variation (über 100 gemittelte Messpunkte) mit 100 Prozent gleichgesetzt und die jeweiligen Messpunkte dazu in Relation gesetzt. Aus diesen relativen Werten gleichartiger Versuche wurden wiederum vergleichbare Messpunkte (z.B. nach Zeitpunkt seit Variation eines Umweltparameters) gemittelt.

**Tabelle 4-8: Aufnahmefrequenzen** und korrespondierende Mittelungszeiträume

<b>Aufnahmefrequenz</b>	<b>Mittelwert über 250 Messpunkte entspricht</b>
20 Sekunden Bildabstand	ca. 1:25 Stunden
30 Sekunden Bildabstand	2:05 Stunden
1 Minute Bildabstand	4:10 Stunden

#### 4.5.4.8 Farbkodierte Darstellung der Ergebnisse

Die Geschwindigkeits- und REGR-Daten lassen sich auch direkt durch Farbcodierung auf den Originalbildern (Abb. 4.24) darstellen, indem die aufsteigenden Werte anhand einer Farbtabelle (‘look up table’ LUT) Farben zugeordnet werden. Diese Farben werden transparent über die Originalbilder projiziert. Diese Darstellung eignet sich besonders gut, um das Wachstum in Form von Filmen darzustellen. Hierfür stand das von Andrés Chavarria (ICG-3 Phytosphäre, Forschungszentrum Jülich) geschriebene Visualisierungstool ‚Auswertvisu‘ zur Verfügung, das auf dem VTK-Visualisierungstoolkit ([www.vtk.org/](http://www.vtk.org/)) basiert.



**Abb. 4.24:** Farbkodierte Darstellung der DISP-Ergebnisse durch Overlay auf den Originalbildern. Links oben ist die REGR in % h<sup>-1</sup>, unten links die Geschwindigkeitsverteilung in x-Richtung in mm h<sup>-1</sup> und unten rechts die Geschwindigkeitsverteilung in y-Richtung in mm h<sup>-1</sup> dargestellt (jeweils mit der zugehörigen Farbskala).

## 5 Ergebnisse

Die Wachstumszone im Apex einer Wurzel beinhaltet Zellen verschiedener Entwicklungsstadien, deren Übergang vom meristematischen Charakter am Apex zur ausdifferenzierten Zelle am Ende der Wachstumszone fließend ist. Außer Zellstreckung laufen auch gleichzeitig weitere physiologische Entwicklungsprozesse wie Zellteilung und Differenzierungsprozesse in diesem Bereich ab. Die zur Wachstumsmessung in dieser Arbeit benutzte DISP-Methode detektiert Bewegungen unabhängig von parallel ablaufenden physiologischen Prozessen und ermöglichte die Untersuchung des Volumenwachstums. Mit der *Arabidopsis*-Transformante CycB1;1-GFP (Peter Dörner, Edinburgh) konnte ergänzend fluoreszenzmikroskopisch auch die raum-zeitliche Dynamik der Zellteilungen *in vivo* untersucht werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden sowohl an Wurzeln von Monokotylen (*Zea mays*) als auch an Dikotylen Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*) erzielt. Aus der Literatur liegen keine Hinweise darauf vor, dass sich die Organisation der Wurzelwachstumszonen von Monokotylen und Dikotylen Pflanzen grundlegend unterscheidet.

Bevor der Einfluss von Umweltbedingungen, wie z.B. Änderungen im Nährstoffangebot sowie Temperaturschwankungen, auf die raum-zeitliche Dynamik des Wurzelwachstums untersucht werden kann, muss der Ausgangszustand genau charakterisiert sein. Zu diesem Zweck wurden die Pflanzen zur Einstellung eines Fließgleichgewichts (Kapitel 5.1) bei möglichst konstanten Bedingungen kultiviert. Die erhaltenen Daten konnten auch für einen Vergleich zwischen den verschiedenen Arten benutzt werden (Kapitel 5.1.5). Im Anschluss konnten die Mais-Pflanzen, deren ‚steady state‘ bestimmt war, veränderten Umweltbedingungen ausgesetzt und die dynamischen Wachstumsreaktionen darauf ermittelt werden (Kap. 5.2). In einer weiteren Versuchsreihe wurden CycB1;1-GFP *Arabidopsis*-Pflanzen, deren Wachstumseigenschaften unter konstanten Bedingungen bereits analysiert waren (Kap. 5.1.2), mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (CLSM) auf die Zellteilungsaktivität (bzw. Anzahl CycB1;1-GFP exprimierender Zellen) bei konstanter Nährlösungskonzentration untersucht (Kap. 5.3). Der nächste Schritt war die Analyse der dynamischen Anpassung der Zellteilungsaktivität auf Veränderung der umgebenden Nährlösungskonzentration (Kap. 5.4).

## 5.1 Zellstreckung unter konstanten Bedingungen

Auch bei konstanten Umweltbedingungen variieren die messbaren Parameter des Wurzelwachstums deutlich. Einerseits ist zwischen Individuen einer Art, die sich im gleichen Entwicklungsstadium befinden, eine **intraspezifische Variabilität** zu detektieren. Andererseits hängt die Ausprägung der Wachstumszone auch vom Entwicklungsstadium ab. Aus diesem Grund wurden für Vergleiche jeweils Pflanzen des gleichen Entwicklungsstadiums verwendet.

### 5.1.1 Mais

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Primärwurzelspitze ( $V_{\text{Spitze}}$ ) von Mais nimmt nach der Keimung stetig zu, bis sie bei etwa fünf Zentimeter Wurzellänge für einige Zeit einen Plateauwert annimmt (Ishikawa & Evans 1993, Walter 2001). Daher wurden die Maiskeimlinge für die Versuche in dieser Arbeit stets mit einer Wurzellänge von etwa drei Zentimetern in das Durchfluss-Rhizotron eingesetzt. Experimente wurden erst am nächsten Tage durchgeführt, nachdem sich die Pflanzen auf die Verhältnisse im Rhizotron eingestellt hatten und etwa fünf Zentimeter Wurzellänge erreicht hatten. Für das DISP-Verfahren wurden Bildsequenzen der Wurzeln aufgenommen (Kap. 4.5.3) und anschließend wie in Kap. 4.5.4 beschrieben ausgewertet. Die Ergebnisse der Auswertung können sowohl als Diagramme (z.B. Abb. 5.1, Abb. 5.2, Abb. 5.3) als auch durch farbkodierte Overlays auf den Originalbildern dargestellt werden (z.B. Abb. 5.50).

Als **Standardbedingungen** für die nachfolgend dargestellten Ergebnisse dienen, wenn nicht anders angegeben:

- konstante Temperatur (22 °C)
- konstante Luftfeuchte (50 %  $\pm$  10 %)
- konstantes Lichtregime (12 h hell / 12 h dunkel (8-20 Uhr) bei einer Lichtintensität von ca. 100  $\mu\text{mol PAR}$ )

#### 5.1.1.1 Kultivierung in bidestilliertem Wasser

Nach einer Adaptionzeit von etwa einem Tag an die veränderten Bedingungen im Durchfluss-Rhizotron pendelt sich die maximale Wachstumsgeschwindigkeit ( $V_{\text{Spitze}}$ ) je nach Pflanze auf einem relativ konstanten Niveau zwischen 1 und 2,5  $\text{mm h}^{-1}$  ein.

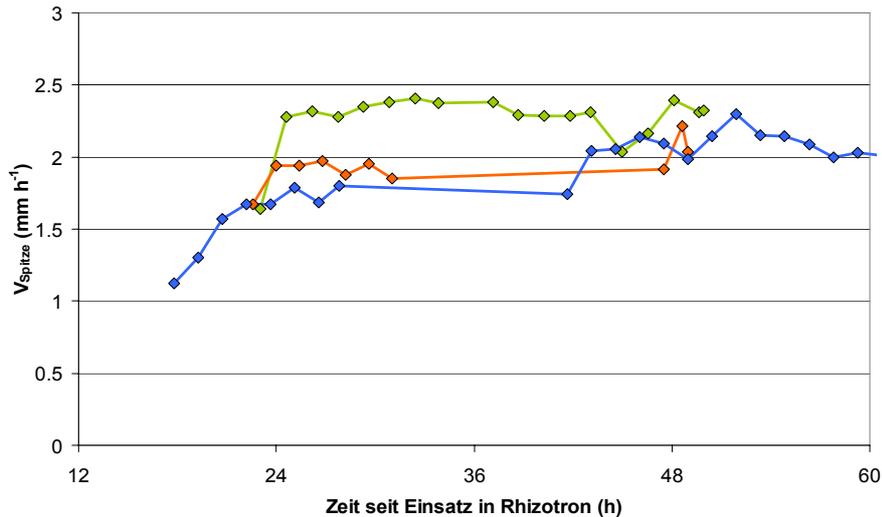


Abb. 5.1:  $V_{\text{Spitze}}$  von Maiswurzeln nach Einsatz in das Durchfluss-Rhizotron. Dargestellt sind DISP-Daten (Mittelwerte über  $\sim 1:30$  h) von 3 verschiedenen Versuchsansätzen mit nährstofffreiem Aussenmedium (bidest).

$V_{\text{Spitze}}$  liegt 1-2 Tage nach dem Einsatz in das Rhizotron im Durchschnitt bei etwa  $2 \text{ mm h}^{-1}$  bei Kultivierung in bidestilliertem Wasser (Abb. 5.1, Abb. 5.10). Dabei korrelieren Schwankungen von  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$  zu vielen Zeitpunkten (Abb. 5.2).  $V_{\text{Spitze}}$  bleibt bei Anzucht in bidestilliertem Wasser über mehrere Tage in etwa auf diesem Plateauwert, so dass die Wurzeln meist aus dem Beobachtungsbereich der Wurzelverfolgungsvorrichtung herausgewachsen sind, bevor die Wachstumsrate deutlich absinkt.

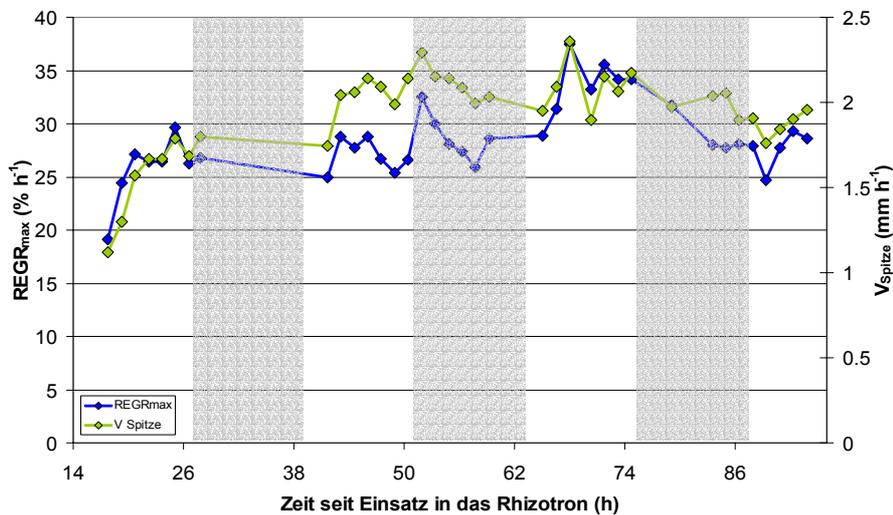


Abb. 5.2: Korrelation von  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$  einer Maiswurzel über mehrere Tage bei Kultivierung im Durchfluss-Rhizotron mit bidestilliertem Wasser (Mittelwerte über  $\sim 1:30$  h aus DISP-Auswertung einer Pflanze).

Bei einem **typischen Wachstumsprofil** (im Koordinatensystem der Wurzel, Kap. 4.5.4.5) ein bis zwei Tage nach Einsatz in das Durchfluss-Rhizotron (Abb. 5.3) liegen die Wachstumspara-

meter  $V_{\text{Spitze}}$  bei  $2 \text{ mm h}^{-1}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$  bei  $30\text{-}40 \text{ \% h}^{-1}$  (siehe auch Tabelle 5-1). An der Spitze beträgt die relative Wuchsrate meist zwischen  $3$  und  $5 \text{ \% h}^{-1}$ .

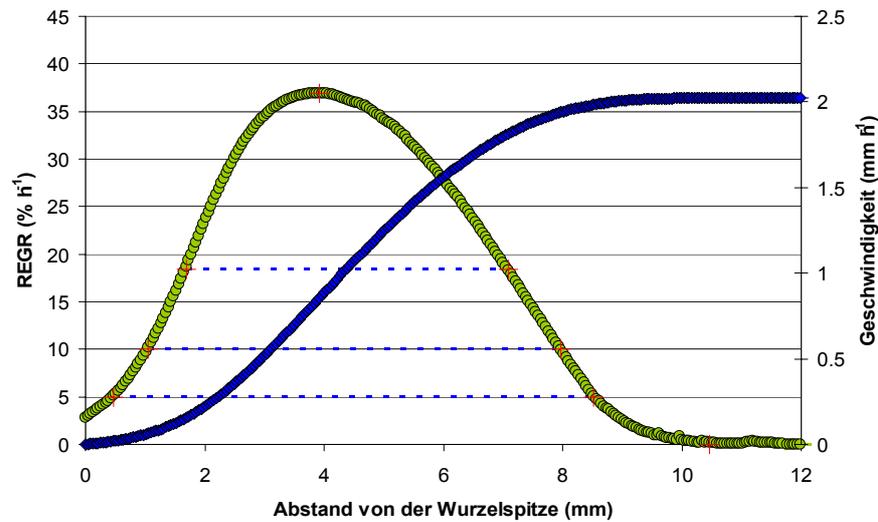


Abb. 5.3: typisches Wachstumsprofil einer in bidestilliertem Wasser wachsenden Primärwurzel von Mais (DISP-Messung), dargestellt in Wurzelkoordinaten.

Es liegt kein diurnaler Rhythmus des Wurzelwachstums vor (Abb. 5.1, Abb. 5.2). Die  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position liegt nicht im Zentrum der REGR-Verteilung, sondern ist etwas in apikale Richtung verschoben.

### 5.1.1.2 Kultivierung in 5 mM

Bei Inkubation der Maiswurzeln in 5 mM Ingestad-Nährlösung steigt  $V_{\text{Spitze}}$  nach dem Einsatz der Keimlinge in das Durchfluss-Rhizotron wie bei Kultivierung in bidestilliertem Wasser zunächst an (Abb. 5.4). Nach einem Tag im Rhizotron wird ein maximaler  $V_{\text{Spitze}}$ -Wert von durchschnittlich  $1,6 \text{ mm h}^{-1}$  erreicht. Dieser Maximalwert wird höchstens einen Tag aufrechterhalten (Abb. 5.11).

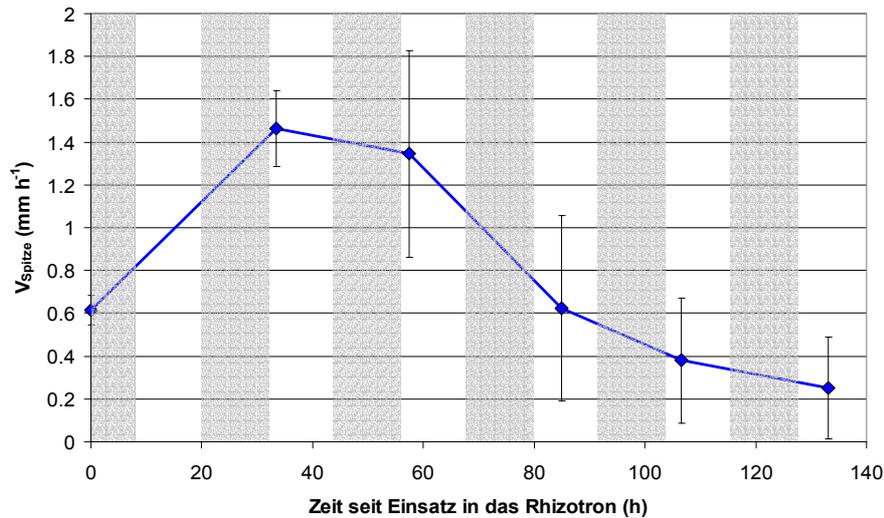


Abb. 5.4: typischer Zeitverlauf von  $V_{\text{Spitze}}$  bei Kultivierung von Maiswurzeln in 5 mM Ingestad-Nährlösung; Mittelwert + SD aus Linealvermessung über 15 Pflanzen.

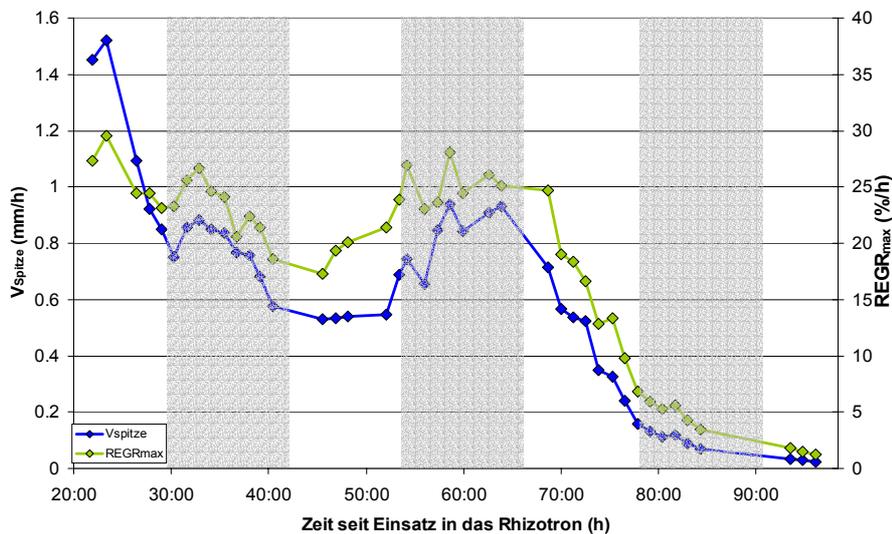


Abb. 5.5  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$  (DISP-Werte) einer über 3 Tage in 5 mM Ingestad-Nährlösung kultivierten Maispflanze.

Im Folgenden sinkt  $V_{\text{Spitze}}$  kontinuierlich auf sehr geringe Werte (Abb. 5.4, Abb. 5.5) ab. Manche Pflanzen stellen das Wachstum der Primärwurzel ganz ein. Unter diesen Kultivierungsbedingungen sind zu diesem Zeitpunkt bei manchen Pflanzen bereits Anlagen für Adventiv- sowie Seitenwurzeln gebildet. Der Zeitpunkt, zu dem  $V_{\text{Spitze}}$  wieder absinkt, variiert innerhalb der Pflanzen eines Versuches (15 Pflanzen) deutlich, was auch in größeren Standardabweichungen (Abb. 5.4, etwa ab 50 h) resultiert. Wie bei Pflanzen, die in bidestilliertem Wasser wachsen, verhalten sich  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$  auch bei 5 mM Nährlösung proportional zueinander und es ist kein diurnaler Rhythmus zu erkennen (Abb. 5.5).

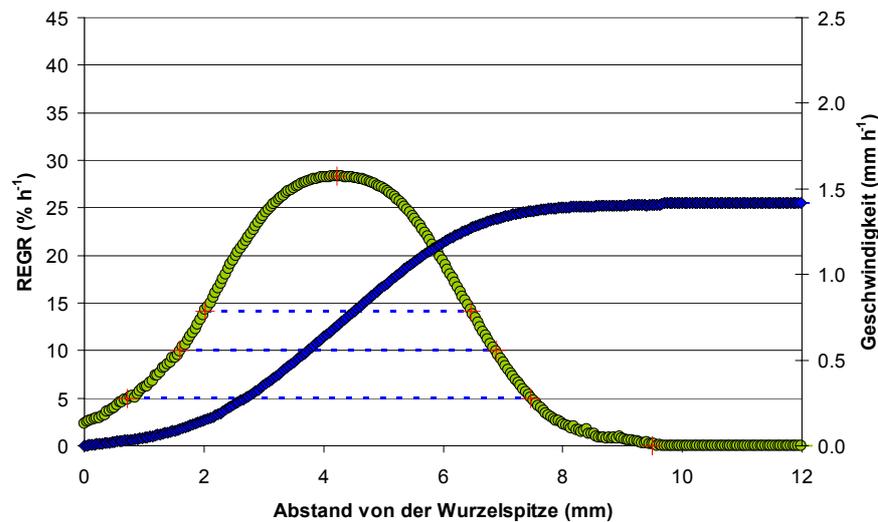


Abb. 5.6: Wachstumsprofil einer in 5 mM Nährlösung kultivierten Maiswurzel (DISP-Messung, in physiologischen Koordinaten).

Ein **typisches Wachstumsprofil** einer in 5 mM Nährlösung wachsenden Wurzel 1-2 Tage nach Einsatz in das Durchfluss-Rhizotron ähnelt auf den ersten Blick den Verhältnissen der in bidestilliertem Wasser kultivierten Wurzeln (Abb. 5.6). Bei genauerer Betrachtung ist zu erkennen, dass die  $REGR_{max}$  mit durchschnittlich  $27\% h^{-1}$  genau wie  $V_{Spitze}$  mit  $1,6\text{ mm h}^{-1}$  etwas geringere Werte annimmt (Tabelle 5-1). Außerdem ist die Position der  $REGR_{max}$  etwas weiter von der Wurzelspitze entfernt, obwohl die Wachstumszone in etwa gleich lang ist. Die relative Position der  $REGR_{max}$  liegt fast symmetrisch in der Mitte der Wachstumszone. Wie bei Kultivierung in bidestilliertem Wasser beträgt auch bei 5 mM Nährlösung die Wuchsrate an der Wurzelspitze zwischen  $3$  und  $5\% h^{-1}$ .

### 5.1.1.3 Kultivierung in 10 mM

Ähnlich verhält es sich bei Primärwurzeln von Maispflanzen, die im Durchfluss-Rhizotron mit 10 mM Nährlösung umspült werden. Auch bei diesen Versuchsbedingungen korrelieren  $V_{Spitze}$  und  $REGR_{max}$  (Abb. 5.7) zu vielen Zeitpunkten und es ist kein diurnaler Rhythmus erkennbar.

Die mittlere Spitzengeschwindigkeit ( $V_{Spitze}$ ) steigt auch bei 10 mM Nährlösungskonzentration zunächst bis auf ein Maximum von  $1,5\text{ mm h}^{-1}$  einen Tag nach dem Einsatz in das Rhizotron an (Abb. 5.8). Dieser Höchstwert wird etwa einen halben Tag aufrechterhalten und fällt anschließend wie bei Kultivierung in 5 mM Nährlösung auf deutlich geringere Werte ab.

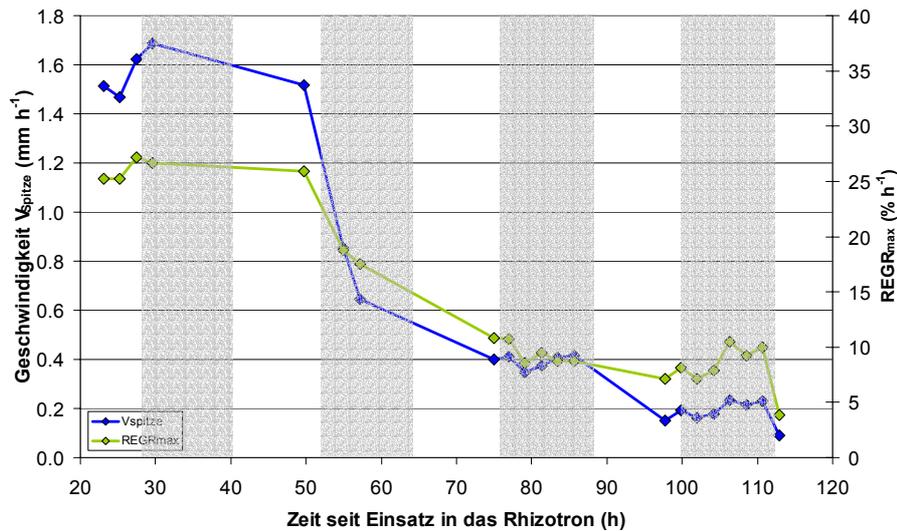


Abb. 5.7: Zeitverlauf von  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$  einer Maispflanze, die in 10 mM Ingestad-Nährlösung wächst; ein Datenpunkt entspricht jeweils einem Mittelwert über 1:30 Stunden.

Durchschnittliche Maximalwerte einen Tag nach Einsatz in das Rhizotron liegen bei  $1,5 \text{ mm h}^{-1}$  für  $V_{\text{Spitze}}$ ,  $27 \text{ \% h}^{-1}$  für  $\text{REGR}_{\text{max}}$ ; die Wachstumszonenlänge beträgt 10 mm (Tabelle 5-1). Ein typisches Wachstumsprofil einen Tag nach Einsatz der Pflanzen in das Rhizotron ähnelt der Verteilung bei 5 mM Inkubation, allerdings ist die REGR-Verteilung weniger symmetrisch, die relative Position der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  ist etwas in basale Richtung verschoben (Abb. 5.8). Wie auch bei Wachstum in bidestilliertem Wasser oder 5 mM Nährlösung liegt die REGR im Meristembereich bei etwa  $3 \text{ \% h}^{-1}$ .

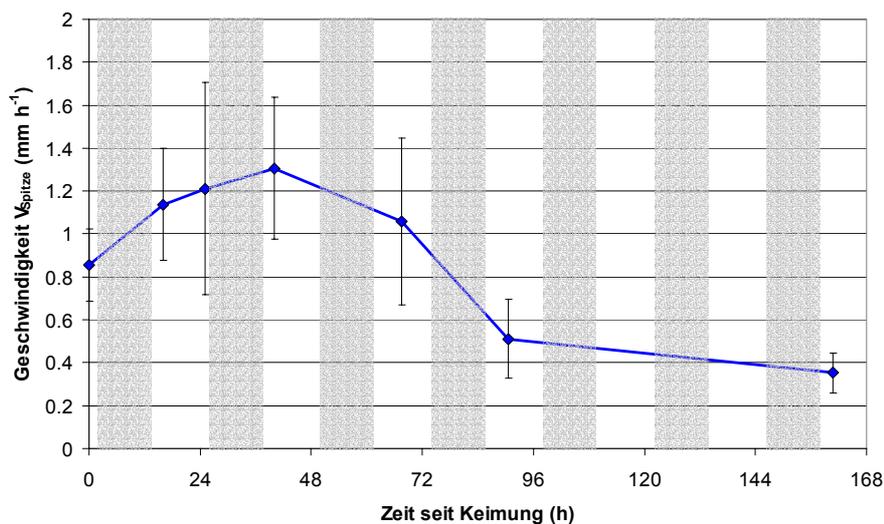


Abb. 5.8: Zeitverlauf von  $V_{\text{Spitze}}$  bei Kultivierung von Maiswurzeln im Durchfluss-Rhizotron in 10 mM Nährlösung (Mittelwert + SD über 15 mit der Linealmethode vermessenen Pflanzen).

Im Bereich von 1-2 Tagen nach Einsatz in das Rhizotron unterscheiden sich die Wachstumsverteilungen bei den unterschiedlichen Bedingungen nicht nur in den durchschnittlichen Maximalwerten von  $V_{\text{Spitze}}$  bzw.  $\text{REGR}_{\text{max}}$ , sondern auch in der Symmetrie der REGR-Kurve. Je konzentrierter die Nährstoffe im umgebenden Medium sind, desto geringer sind die durchschnittlichen Werte von  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$ . Die relative Position der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  befindet sich bei nährstofffreier Kultivierung tendenziell apikal vom Mittelpunkt der Wachstumszone und wird bei steigenden Nährlösungskonzentrationen basalwärts verschoben (Abb. 5.66).

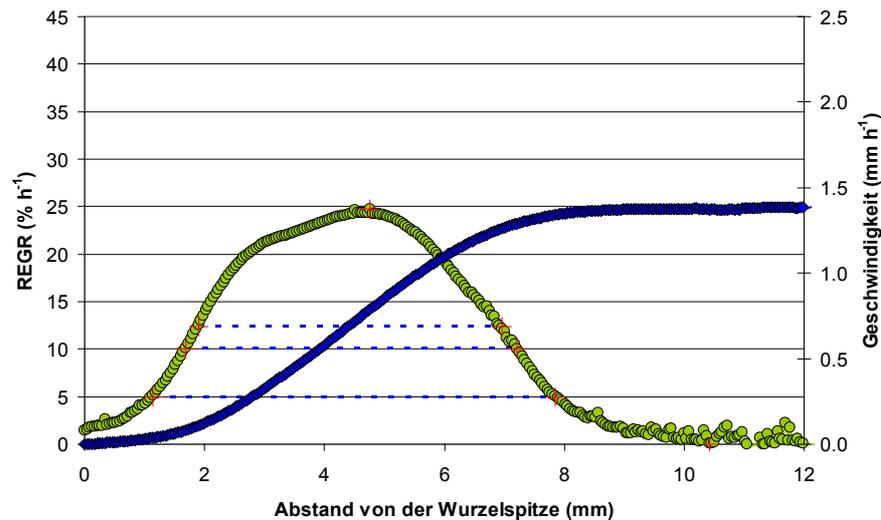


Abb. 5.9: Wachstumsprofil einer Primärwurzel von Mais in 10 mM Nährlösung, Mittelwert über 1:30 Stunden einer Serie von DISP-Daten.

Die relative elementare Wuchsrate an der Wurzelspitze ( $\text{REGR}_{\text{Tip}} \sim 3\text{-}5\% \text{ h}^{-1}$ ) unterscheidet sich nicht zwischen den verschiedenen Bedingungen. Unter allen drei Kultivierungen ist kein diurnaler Rhythmus des Wurzelwachstums zu erkennen. In diesem Kapitel wurden die Werte hauptsächlich im Bereich von ein bis zwei Tagen nach dem Einsatz in das Durchfluss-Rhizotron verglichen. Im folgenden Kapitel wird daher eine genauere Betrachtung der Wachstumsparameter über die gesamte Versuchsdauer bzw. in Bezug zu  $V_{\text{Spitze}}$  durchgeführt.

Tabelle 5-1: Zusammenfassung durchschnittlicher Wachstumsparameter 1 Tag nach Einsatz in das Durchfluss-Rhizotron für Maiswurzeln angezogen in bidestilliertem Wasser, 5 mM und 10 mM Nährlösung.

Bedingung	$V_{\text{Spitze}}$ ( $\text{mm h}^{-1}$ )	$\text{REGR}_{\text{max}}$ ( $\% \text{ h}^{-1}$ )	Position $\text{REGR}_{\text{max}}$ (mm)	REGR- Halbwertsbreite (mm)	Länge der Wachstumszone (mm)
bidestilliertes Wasser	1,8	33	3,9	5,1	10,0
5 mM	1,6	27	4,3	5,5	10,8
10 mM	1,5	27	4,4	5,0	10,1

### 5.1.1.4 Vergleich der Wachstumsparameter

#### Abhängigkeit von der Zeit im Durchfluss-Rhizotron

Der **Zeitverlauf** von  $V_{\text{Spitze}}$ ,  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position, der Länge der Wachstumszone und der  $\text{REGR}$ -Halbwertsbreite seit Einsatz in das Durchfluss-Rhizotron lässt sich im Falle der Kultivierung in Nährlösung sehr gut durch logistische Funktionen beschreiben ( $R^2$ -Werte zwischen 0,93 und 0,99). Im Gegensatz dazu sind die vergleichbaren Werte, der in bidestilliertem Wasser untersuchten Pflanzen, am besten durch eine polynomische Funktion 2. Ordnung zu fitten ( $R^2$ -Werte zwischen 0,25 und 0,55).

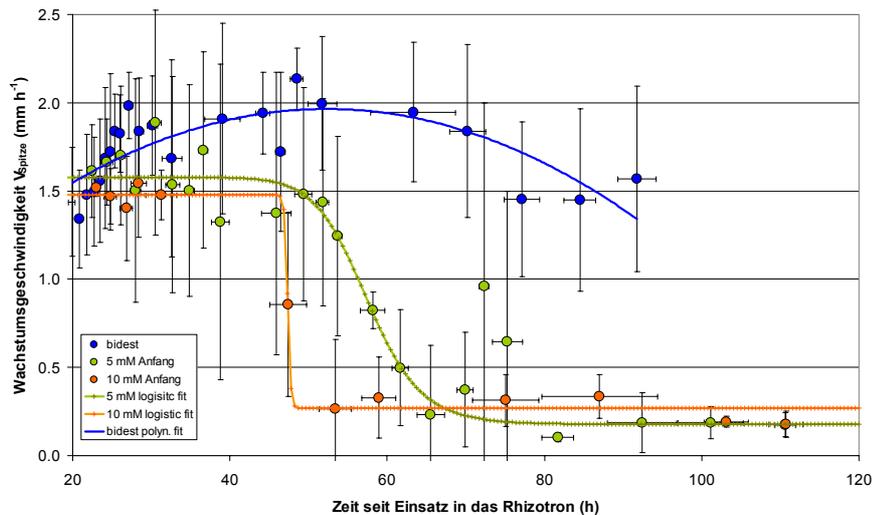


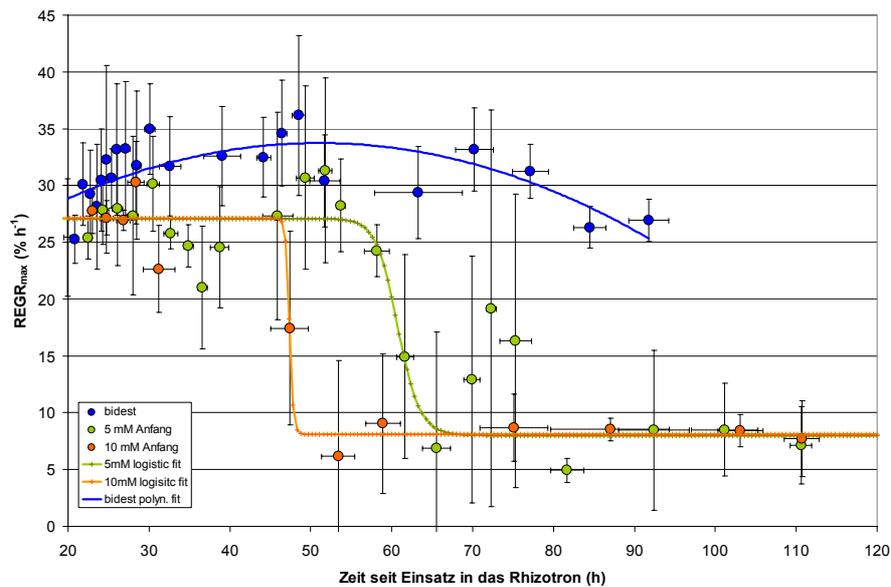
Abb. 5.10: Zeitverlauf von  $V_{\text{Spitze}}$  nach Einsatz im Rhizotron bei Wachstum der Maispflanzen in bidestilliertem Wasser, 5 und 10 mM Nährlösung (Messwerte in Kategorien eingeteilt + SD; bidest: 26 Pflanzen; 5 mM: 10 Pflanzen; 10 mM: 7 Pflanzen).

20 Stunden nach Einsatz der Pflanzen sind die Parameter bei allen drei Bedingungen ähnlich, nur die Position der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  (Abb. 5.13) liegt bei nährstofffreier Inkubation näher an der Wurzelspitze, wie oben bereits für die relative  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position (‘Symmetrie’ der  $\text{REGR}$ -Verteilung) beschrieben. Je nach betrachtetem Wachstumsparameter sinken die Werte bei 5 und 10 mM Nährlösung ab 40 Stunden unterschiedlich schnell ab und erreichen ein Minimum. Im Gegensatz dazu bleiben die Werte bei bidestilliertem Wasser als umgebendem Medium bis über 90 Stunden (das Ende des Beobachtungsbereichs ist dann erreicht) auf hohem Niveau.

Die genauere Betrachtung des **Zeitverlaufs von  $V_{\text{Spitze}}$**  (Abb. 5.10) zeigt sowohl bei Anzucht mit 5 mM als auch mit 10 mM Ingestad Nährlösung, dass der Höchstwert für  $V_{\text{Spitze}}$  nur bis etwa 45 (10 mM) bzw. 50 Stunden (5 mM) seit dem Einsatz in das Rhizotron annähernd konstant bleibt. Die Werte der 10 mM Kultivierung sinken deutlich schneller ab, beide Nährlösungsbedingungen erreichen Minimalwerte um  $0,25 \text{ mm h}^{-1}$ . Im Gegensatz dazu halten die Pflanzen der Anzucht in

bidestilliertem Wasser bis über 90 Stunden seit Einsatz in das Rhizotron hohe  $V_{\text{Spitze}}$ -Werte von über  $1,5 \text{ mm h}^{-1}$  aufrecht.

Die  $\text{REGR}_{\text{max}}$  über die Zeit nach Einsatz in das Durchfluss-Rhizotron aufgetragen (Abb. 5.11) hat einen sehr vergleichbaren Verlauf wie für  $V_{\text{Spitze}}$  beschrieben. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass  $\text{REGR}_{\text{max}}$  und  $\text{Zeit}_{\text{Spitze}}$  zeitlich häufig korrelieren. Die Werte beider Nährlösungsbedingungen fallen unterschiedlich schnell auf einen Minimalwert von  $7,5 \text{ \% h}^{-1}$  ab, während die Werte der in bidestilliertem Wasser kultivierten Pflanzen im Beobachtungszeitraum nicht unter  $25 \text{ \% h}^{-1}$  absinken.



**Abb. 5.11:** Zeitverlauf von  $\text{REGR}_{\text{max}}$  im Durchfluss-Rhizotron bei Umspülung der Maispflanzen mit bidestilliertem Wasser sowie 5 und 10 mM Nährlösung (Messwerte in Kategorien eingeteilt + SD; bidest: 26 Pflanzen; 5 mM: 10 Pflanzen; 10 mM: 7 Pflanzen).

Der Verlauf der **REGR-Halbwertsbreite** über die Zeit (Abb. 5.12) ist flacher als bei  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$ . Die Werte der Pflanzen in 5 und 10 mM Nährlösung sinken aber bereits früher, weniger als 40 Stunden seit Einsatz ab. Dem gegenüber steigen die durchschnittliche REGR-Halbwertsbreite der Wurzeln in bidestilliertem Wasser bis etwa 55 Stunden im Durchfluss-Rhizotron leicht an. Die Werte der REGR-Halbwertsbreite erreichen bei Kultivierung in 5 mM bzw. 10 mM ab etwa 90 h bzw. 60 h ein Minimum von 2 mm bzw. 2,3 mm.

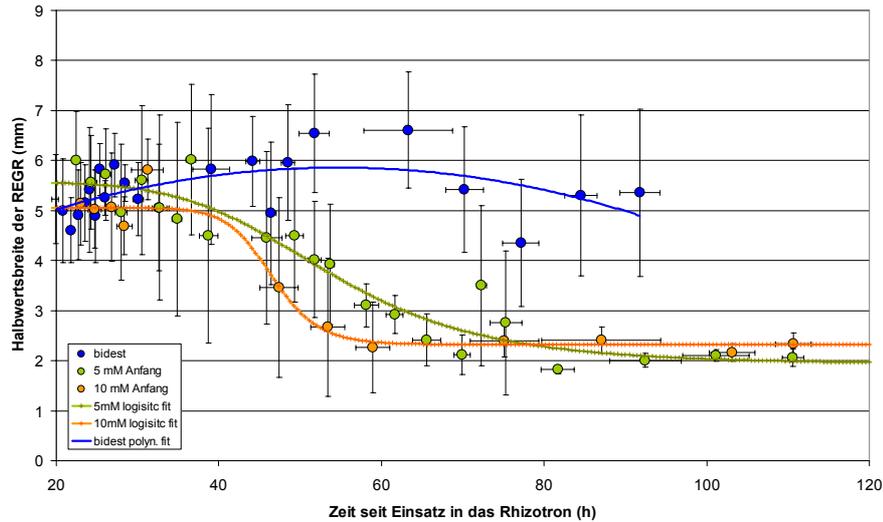


Abb. 5.12: Halbwertsbreite der REGR über die Zeit im Durchfluss-Rhizotron bei Umspülung der Maiswurzeln durch bidestilliertes Wasser, 5 mM und 10 mM Nährlösung (Messwerte in Kategorien eingeteilt + SD; bidest: 26 Pflanzen, 5 mM: 10 Pfl.; 10 mM 7 Pfl.).

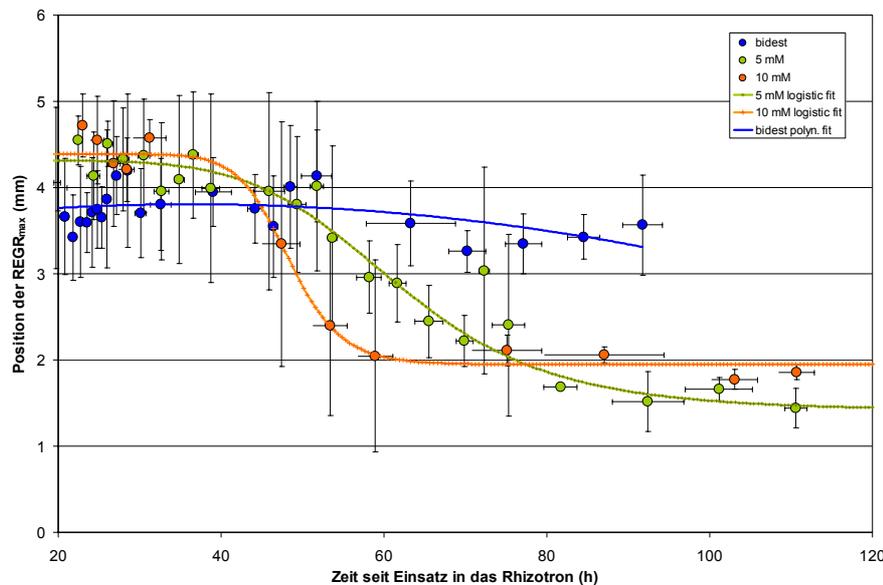
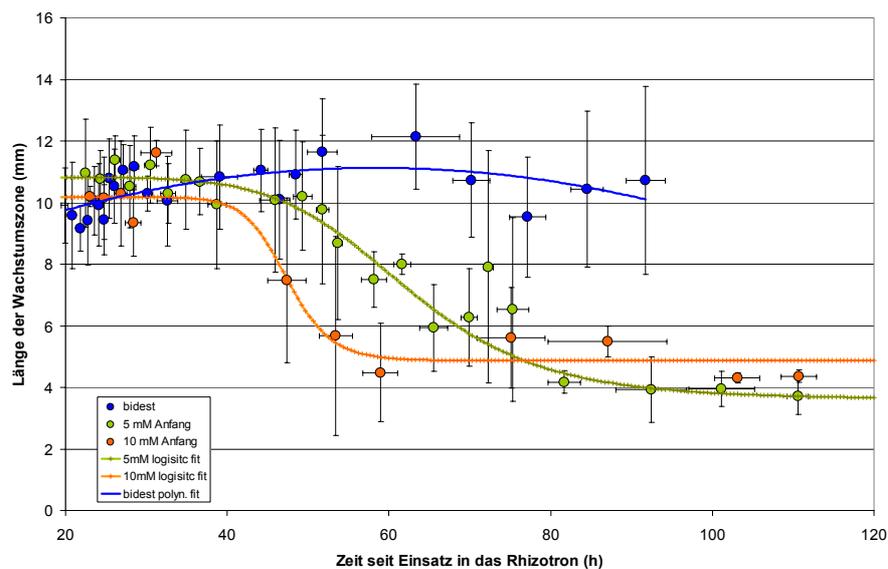


Abb. 5.13: Position der  $REGR_{max}$  über die Zeit im Durchfluss-Rhizotron bei Kultivierung der Maispflanzen in bidestilliertem Wasser, 5 mM und 10 mM Nährlösung (Messwerte in Kategorien eingeteilt + SD; bidest: 26 Pflanzen, 5 mM: 10 Pflanzen; 10 mM 7 Pflanzen).

Die **Position der  $REGR_{max}$**  (Abb. 5.13) ändert sich bei den in Nährlösung kultivierten Pflanzen über die Zeit sehr ähnlich wie z.B. die REGR-Halbwertsbreite. Bei etwa 80 Stunden (5 mM) bzw. 100 Stunden (10 mM) nähern sich die Werte 1,5 mm (5 mM) bzw. 1,8 mm (10 mM) an. Bei bidestilliertem Wasser als Umgebungsmedium bleibt der Abstand der  $REGR_{max}$ -Position zur Wurzelspitze über mehrere Tage nahezu konstant und nimmt nur ganz gering über die Zeit ab (der polymische Fit ist fast linear). Im Gegensatz zu den anderen Wachstumsparametern der in

bidest angezogenen Pflanzen, nimmt der Abstand der  $REGR_{max}$ -Position zwischen 20 und 40 Stunden seit Einsatz nicht deutlich zu. Wie bereits weiter oben beschrieben ist die  $REGR$ -Position auch der einzige Wachstumsparameter, der einen Tag nach Einsatz in das Rhizotron deutlich unter den Werten der Nährlösungsbedingungen liegt.

Die **Länge der gesamten Wachstumszone** (Abb. 5.14) verändert sich über die Zeit im Durchfluss-Rhizotron ähnlich wie die Halbwertsbreite der  $REGR$ . Unter gesamter Wachstumszone ist hier der Bereich vom Ruhenden Zentrum im Meristem bis zum Ende der Streckungszone gemeint. Aus den DISP-Daten lassen sich leider nicht direkt Werte für das Meristem bzw. die Streckungszone ablesen, da die angewandte Bildsequenzanalyse bei den verarbeiteten Strukturen nicht zwischen verschiedenen anatomischen Merkmalen unterscheidet. Die durchschnittliche Wachstumszonengröße steigt bei Wachstum in nährstoffreiem Außenmedium über mehrere Tage leicht an. Bei Umspülung der Wurzeln mit Nährlösung von 5 mM bzw. 10 mM Stickstoffkonzentration nimmt die Länge der Wachstumszone, vergleichbar zur Position von  $REGR_{max}$ , ab etwa 40 h seit Einsatz auf ein Minimum von 4 mm bzw. 3,8 mm ab.



**Abb. 5.14: Länge der Wachstumszone über die Zeit** der Maiswurzeln im Durchfluss-Rhizotron bei bidest. Wasser bzw. 5 mM und 10 mM Nährlösung als Umgebungsmedium (Messwerte in Kategorien eingeteilt + SD; bidest: 26 Pflanzen; 5 mM: 10 Pfl.; 10 mM: 7 Pfl.).

Generell lässt sich beim Vergleich der drei Wachstumsbedingungen feststellen, dass die **Wachstumsleistung der Primärwurzelspitze** bei steigenden Nährlösungskonzentrationen deutlich schneller nach Einsatz in das Durchfluss-Rhizotron abnimmt.

### Betrachtung der Wachstumsparameter im Bezug auf $V_{\text{Spitze}}$

Im Gegensatz zu der unterschiedlichen Verteilung der Wachstumsparameter über die Zeit im Rhizotron, ist das Verhältnis der **REGR-Halbwertsbreite aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$**  bei allen drei Wachstumsbedingungen nahezu identisch (Abb. 5.15). Die Verteilung der REGR-Halbwertsbreite lässt sich für die beiden Nährlösungsbedingungen sehr gut mit einer logistischen Funktion ausdrücken ( $R^2 = 0,90$  bzw.  $0,91$ ). Auch die Werte der Kultivierung in bidestilliertem Wasser korrelieren sehr gut mit diesen Fitlinien, können aber durch die fehlenden Werte unter  $0,5 \text{ mm h}^{-1}$  nicht mit einer logistischen Funktion ausgedrückt werden. Stellvertretend können die bidest-Werte mit einer polynomischen Funktion 2. Ordnung, die den logistischen Kurven sehr ähnlich ist, beschrieben werden ( $R^2 = 0,87$ ). Die Fitlinien der 5 und 10 mM Werte schneiden die Y-Achse bei 2 mm Halbwertsbreite und unterscheiden sich auch im Verlauf nur geringfügig.

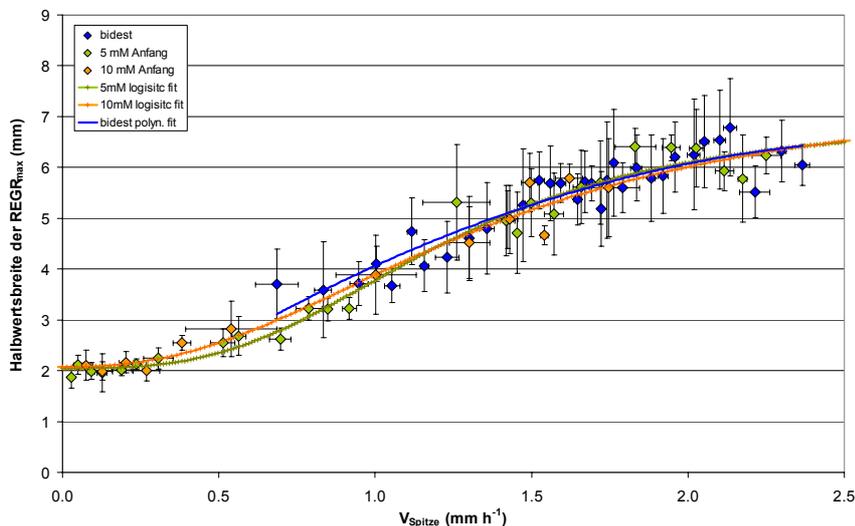
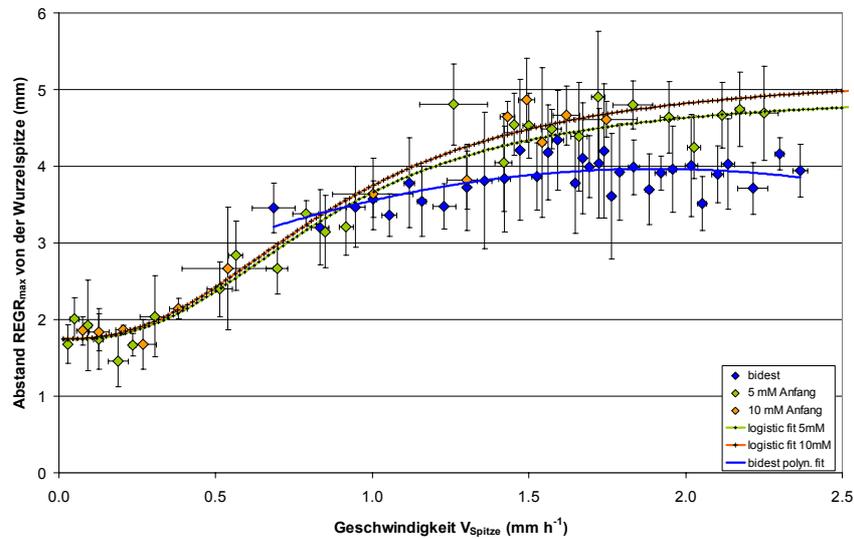


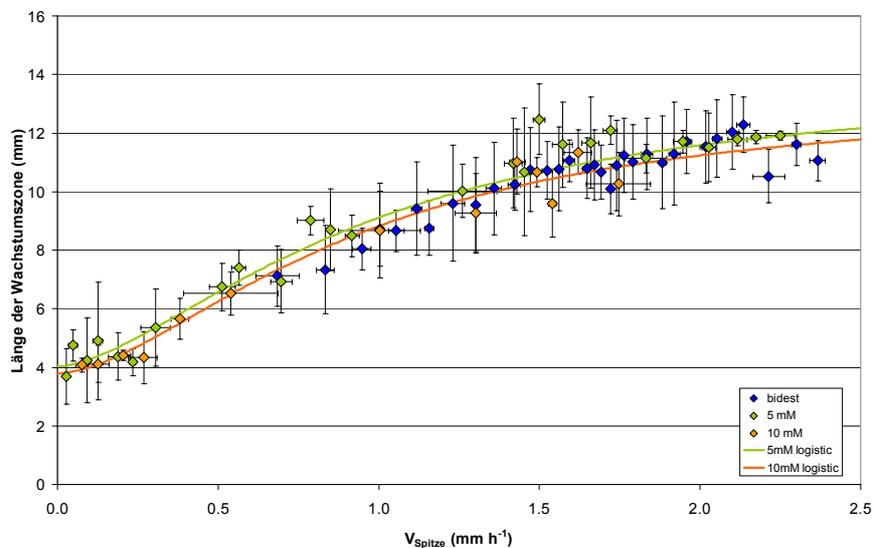
Abb. 5.15: Halbwertsbreite der REGR aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  bei Wachstum der Maispflanzen im Durchfluss-Rhizotron in bidest, 5 mM und 10 mM Nährlösung (Messwerte in Kategorien eingeteilt + SD; bidest: 26 Pflanzen; 5 mM: 10 Pflanzen; 10 mM: 7 Pflanzen).

Das Verhältnis der **REGR<sub>max</sub>-Position zu  $V_{\text{Spitze}}$**  lässt sich bei 5 und 10 mM Kultivierung ebenfalls durch eine logistische Funktion beschreiben ( $R^2 = 0,87$  bzw.  $0,89$ ). Der Y-Achsenabschnitt liegt für beide Nährlösungskonzentrationen bei  $1,7 \text{ mm}$  Abstand der REGR<sub>max</sub> von der Wurzelspitze. Extrapoliert mit der logistischen Funktion würden die Wurzeln bei  $2,5 \text{ mm h}^{-1}$   $4,8 \text{ mm}$  (5 mM) bzw.  $5 \text{ mm}$  (10 mM) Halbwertsbreite erreichen. Im Gegensatz dazu verändert sich bei Kultivierung in bidestilliertem Wasser die durchschnittliche Position der REGR<sub>max</sub> bei steigenden  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten im gemessenen Bereich nur gering. Oberhalb von  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten von  $1 \text{ mm h}^{-1}$  ist die REGR<sub>max</sub>-Position bei Nährlösungskultivierung zunehmend weiter von der Wurzelspitze entfernt als bei Wachstum in bidestilliertem Wasser. Dies stimmt auch mit dem Verlauf der

REGR<sub>max</sub>-Position über die Zeit und der bereits weiter oben beschriebenen Symmetrierverschiebung bei steigenden Nährlösungskonzentrationen überein.



**Abb. 5.16** REGR<sub>max</sub>-Position aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  der Maiswurzeln im Durchfluss-Rhizotron mit bidestiliertem Wasser, 5 sowie 10 mM Nährlösungskonzentration (Messwerte in Kategorien eingeteilt + SD; bidest: 26 Pflanzen; 5 mM: 10 Pflanzen; 10 mM: 7 Pflanzen)

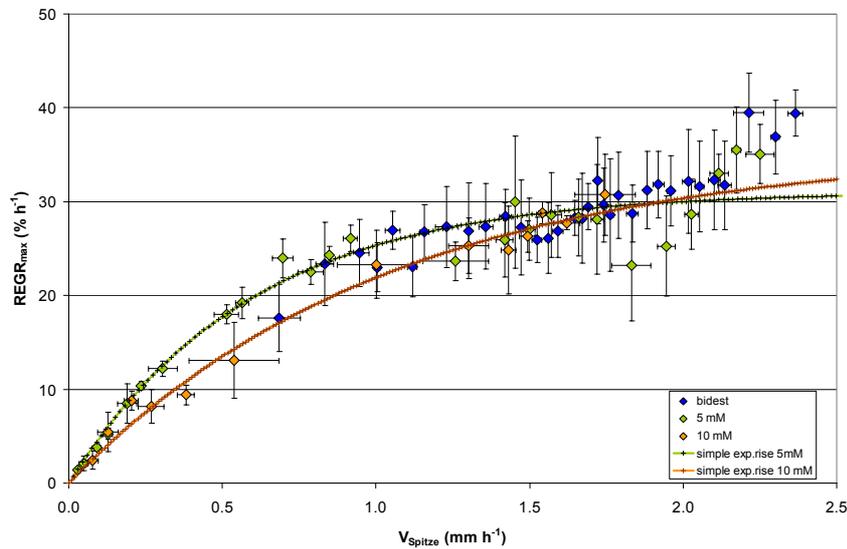


**Abb. 5.17:** Länge der Wachstumszone aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  bei Maiswurzeln im Durchfluss-Rhizotron in bidestiliertem Wasser sowie 5 und 10 mM Nährlösungskonzentration (Messwerte in Kategorien eingeteilt + SD; bidest: 26 Pflanzen; 5 mM: 10 Pflanzen; 10 mM: 7 Pflanzen).

Das Verhältnis zwischen der **Länge der Wachstumszone** und  $V_{\text{Spitze}}$  (Abb. 5.17) ist bei allen drei Bedingungen relativ ähnlich. Die Werte der Nährlösungsbedingungen lassen sich durch eine logistische Funktion anfitzen, die bidest-Werte liegen sehr nah an den beiden Fitlinien der 5 und 10 mM Bedingung. Bei sehr geringen  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten beträgt die minimale Länge der Wachstums-

zone ca. 4 mm. Bei steigenden  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten wächst die Länge der Wachstumszone bis etwa 12 mm bei  $2,5 \text{ mm h}^{-1}$  an.

Für einen Vergleich der ‚Minimalwerte‘ der  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position,  $\text{REGR}$ -Halbwertsbreite und Wachstumszonenlänge bei allen untersuchten Arten siehe Tabelle 5-4.



**Abb. 5.18:**  $\text{REGR}_{\text{max}}$  aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  der Maiswurzeln im Durchfluss-Rhizotron in bidestiliertem Wasser sowie 5 und 10 mM Nährlösungskonzentration (Messwerte in Kategorien eingeteilt + SD; bidest: 26 Pflanzen; 5 mM: 10 Pflanzen; 10 mM: 7 Pflanzen).

Die  $\text{REGR}_{\text{max}}$  steigt bei zunehmenden  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten sowohl bei 5 mM als auch bei 10 mM Nährlösung immer weniger an und nähert sich asymptotisch einem Maximum an (Abb. 5.18; Fitfunktion:  $y = a(1 - e^{-bx})$ ;  $R^2 = 0,87$  bzw.  $0,94$ ). Die Kurve der 5 mM-Werte verläuft etwas steiler. Ab  $1,5 \text{ mm h}^{-1}$  ist die Steigung nur noch gering, der durchschnittliche Maximalwert der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  liegt bei  $30 \text{ \% h}^{-1}$ . Die Kurve der 10 mM-Werte steigt flacher an, im Bereich zwischen  $1,5$  und  $2,5 \text{ mm h}^{-1}$  sind die Werte aber auf ähnlichem Niveau mit den 5 mM Werten. Die Daten der bidest-Anzucht entsprechen in dem gemessenen Bereich relativ gut den Werten der 5 mM-Bedingung.

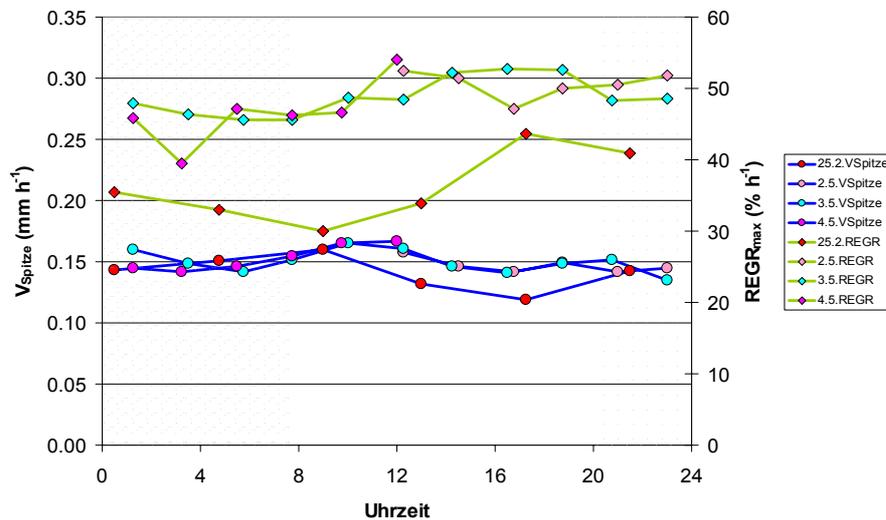
### 5.1.2 *Arabidopsis*

Die *Arabidopsis* Untersuchungen mit dem Mikrorhizotron-Aufbau wurden ab dem fünften Tag nach der Keimung begonnen und über ein bis zwei Wochen weitergeführt.

Als **Standardbedingungen** für die nachfolgend dargestellten Ergebnisse dienen, wenn nicht anders angegeben:

- konstante Temperatur (22 °C)
- konstante Luftfeuchte (50 %  $\pm$  10 %)
- konstantes Lichtregime (12 h hell / 12 h dunkel (8-20 Uhr) bei einer Lichtintensität von ca. 100  $\mu\text{mol PAR}$ )

Die Wachstumsgeschwindigkeit ( $V_{\text{Spitze}}$ ) der Primärwurzel von *Arabidopsis* nimmt von der Keimung je nach Anzuchtbedingung einige Zeit zu (Beemster & Baskin 1998). Danach bleibt  $V_{\text{Spitze}}$  über längere Zeit relativ konstant. Bei  $V_{\text{Spitze}}$  und der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  ist kein diurnaler Rhythmus erkennbar (Abb. 5.19), allerdings sind, wie auch bei Maiswurzeln, Schwankungen über den Tagesverlauf zu beobachten. Eine Beschleunigung des Wachstums während der Beleuchtungsphase kann durch Erwärmung, die von den Fluoreszenzleuchten ausgeht, hervorgerufen werden. Dieser Effekt wurde durch ständige Umwälzung der Luft mit einem Ventilator so gut wie möglich vermieden.



**Abb. 5.19:** Verlauf von  $V_{\text{Spitze}}$  bei zwei *Arabidopsis*-Pflanzen während vier Beobachtungstagen im Mikrorhizotron (DISP-Werte: jeder Datenpunkt ist ein Mittelwert über 2 h).

### 5.1.2.1 *CycB1;1-GFP Pflanzen*

Wachstumsprofile von *CycB1;1-GFP*-Pflanzen, die bei unterschiedlichen Nährkonzentrationen angezogen werden, unterscheiden sich im gleichen Entwicklungsstadium kaum voneinander (Abb. 5.20, Abb. 5.21). Im Gegensatz zu Mais ist der apikale Bereich, in dem nur geringes Streckungswachstum stattfindet (Meristembereich), relativ gesehen ausgeprägter. Der Anstieg auf die  $REGR_{max}$  ist deutlich steiler und es werden häufig höhere  $REGR_{max}$ -Werte als bei Mais erreicht. Basal von der  $REGR_{max}$  ist sowohl bei Anzucht in 2,5 als auch in 10 mM eine schwach ausgeprägte Ausbuchtung zu erkennen (Abb. 5.20, Abb. 5.21).

CycB1;1-GFP bei 2,5 bzw. 10 mM angezogen

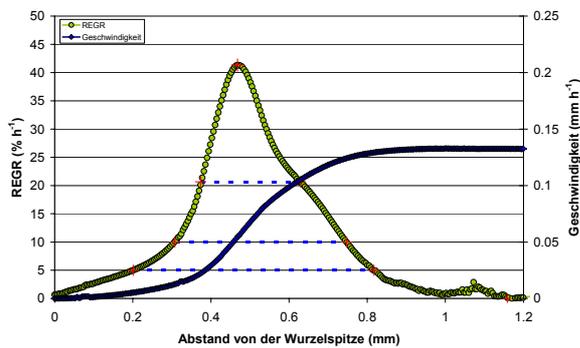


Abb. 5.20: Wachstumprofil einer bei 2,5 mM Nährlösung angezogenen *Arabidopsis CycB1;1-GFP*-Pflanze, (DISP-Messung im Mikrorhizotron, Mittelwert über 2 Stunden).

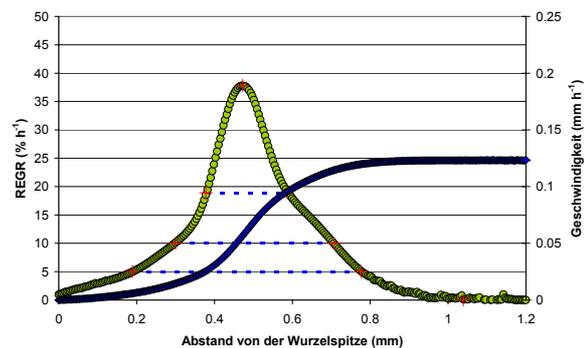


Abb. 5.21: Wachstumprofil einer bei 10 mM Nährlösung angezogenen *Arabidopsis CycB1;1-GFP*-Pflanze (DISP-Messung im Mikrorhizotron, Mittelwert über 2 Stunden).

C24-Wildtyp und C24-Linie 145-3 (DOF14-inhibiert)

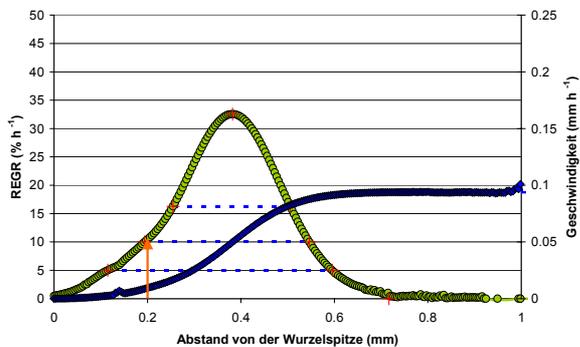


Abb. 5.22: Wachstumprofil von *Arabidopsis C24*-Wildtyp, angezogen bei konstant 10 mM Nährlösung (DISP-Messung im Mikrorhizotron, Mittelwert über 2 Stunden).

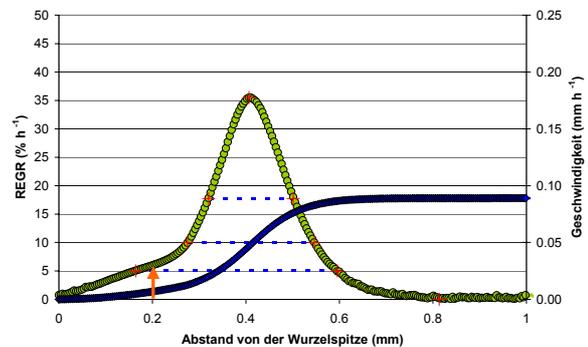


Abb. 5.23: Wachstumprofil von *C24-Linie 145-3 (Arabidopsis)*, angezogen bei konstant 10 mM Nährlösung (DISP-Messung im Mikrorhizotron, Mittelwert über 2 Stunden).

### 5.1.2.2 *Pflanzen des C24-Ecotypes*

Pflanzen des *C24-Ecotypes* wurden unter konstanten Bedingungen bei 10 mM Nährlösung über längere Zeit beobachtet, um das Wachstumsverhalten von *C24*-Wildtyp mit der transformanten Linie 145-3 zu vergleichen. Im Vergleich zu den *CycB1;1*-Pflanzen (*Ecotype Col-0*; Abb. 5.20 und Abb. 5.21) wachsen sowohl die Wildtyp-Pflanzen als auch die Transformanten langsamer.

Im Mittel ist  $V_{\text{Spitze}}$  der Wildtyp-Pflanzen etwas höher als bei den Pflanzen der Linie 145-3. Bei den Transformanten ist die apikale Zone mit geringem Wachstum ausgeprägter als beim Wildtyp (Abb. 5.22, Abb. 5.23, Abb. 5.33): Dies ist z.B. an der REGR am Ende des Meristems (oranger Pfeil in Abb. 5.22, Abb. 5.23) zu erkennen, die REGR der Transformante ist im Vergleich zum Wildtyp nur etwa halb so groß. Die bei den CycB1;1-GFP-Pflanzen beschriebene basal von der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  gelegene Ausbuchtung des REGR-Profiles, ist bei den C24-Pflanzen nicht zu erkennen. Da sich das Wachstumsverhalten zwischen den verschiedenen Pflanzen bzw. Transformanten nicht allein durch einzelne Wachstumsprofile (Abb. 5.20 bis Abb. 5.23) vergleichen lässt, werden im Folgenden die Wachstumsparameter in Relation zur Zeit seit der Keimung bzw. zu  $V_{\text{Spitze}}$  dargestellt.

### 5.1.2.3 Vergleich verschiedener Wachstumsparameter

#### Zeilige Entwicklung verschiedener Wachstumsparameter

$V_{\text{Spitze}}$  nimmt bei allen in dieser Arbeit beobachteten *Arabidopsis* Pflanzen mit der Zeit nach der Keimung langsam zu (Abb. 5.24, Tabelle 5-2). Zu Beginn der DISP-Aufnahmen, meist etwa 5 Tage nach der Keimung, beträgt  $V_{\text{Spitze}}$  bei allen Pflanzen etwa 0,05 bis 0,1  $\text{mm h}^{-1}$ . 20 Tage nach der Keimung haben die CycB1;1-GFP-Pflanzen je nach Nährlösungskonzentration eine durchschnittliche Spitzengeschwindigkeit von 0,15  $\text{mm h}^{-1}$  bzw. 0,2  $\text{mm h}^{-1}$  bei 2,5 mM und 10 mM Nährlösung erreicht. Wie bei Mais ist die Wachstumsleistung der Primärwurzel bei erhöhten Nährlösungskonzentrationen niedriger. *Arabidopsis* C24-Wildtyp Pflanzen haben 15 Tage nach der Keimung eine durchschnittliche Geschwindigkeit von 0,12  $\text{mm h}^{-1}$ , während Pflanzen der Linie 145-3 zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich 0,1  $\text{mm h}^{-1}$  zuwachsen.

**Tabelle 5-2: Übersicht über die Steigung** verschiedener Wachstumsparameter aufgetragen gegen die Zeit seit der Keimung *Arabidopsis*-Pflanzen

Pflanze, Bedingung	$V_{\text{Spitze}}$		REGR-Halbwertsbreite		REGR <sub>max</sub> -Position	
	Steigung	R <sup>2</sup>	Steigung	R <sup>2</sup>	Steigung	R <sup>2</sup>
CycB1;1-GFP, 2,5 mM	0,009	0,89	0,01	0,44	0,017	0,88
CycB1;1-GFP, 10 mM	0,006	0,72	0,017	0,69	0,017	0,83
C24 Wildtyp, 10 mM	0,006	0,91	0,005	0,22	0,015	0,90
C24 Linie 145-3, 10 mM	0,005	0,77	0,006	0,28	0,012	0,76

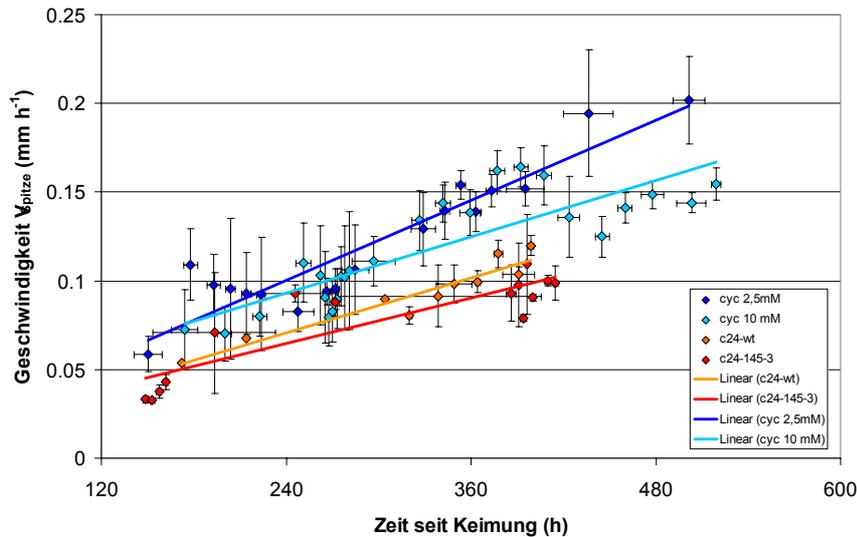


Abb. 5.24: Verlauf von  $V_{\text{Spitze}}$  aufgetragen gegen die Zeit seit Keimung im Mikrorhizotron für *Arabidopsis* CycB1;1-GFP, C24-wt und C24-145-3 Pflanzen. (Einteilung der Werte in Kategorien + SD)

Die maximale REGR liegt bei allen untersuchten *Arabidopsis*-Pflanzen 7 Tage nach der Keimung zwischen 20 und 30 %  $\text{h}^{-1}$  und steigt bis etwa 15 Tage auf 35 bis 45 %  $\text{h}^{-1}$  an (Abb. 5.25). *Arabidopsis* C24-Pflanzen erreichen im Mittel geringere  $\text{REGR}_{\text{max}}$  als die CycB1;1-GFP-Pflanzen.

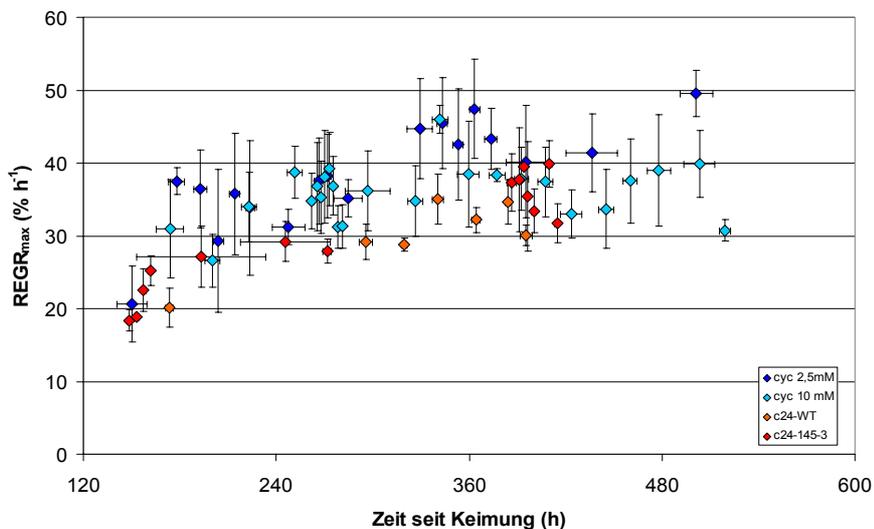


Abb. 5.25: Verlauf von  $\text{REGR}_{\text{max}}$  über die Zeit seit Keimung im Mikrorhizotron bei den *Arabidopsis*-Pflanzen CycB1;1-GFP, C24-wt und C24-145-3. (Einteilung der Werte in Kategorien + SD)

Die Halbwertsbreite der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  liegt sieben Tage nach der Keimung bei allen untersuchten Pflanzen zwischen 0,12 und 0,25 mm (Abb. 5.26). In der Folge vergrößert sich die REGR-Halbwertsbreite bei den Pflanzen des C24-Genotypes nur gering, während sie bei den CycB1;1-GFP-Pflanzen stärker ansteigt. Im Durchschnitt liegen die Halbwertsbreiten der Linie 145-3 deutlich niedriger als bei den Wildtyp-Pflanzen zu vergleichbaren Zeitpunkten.

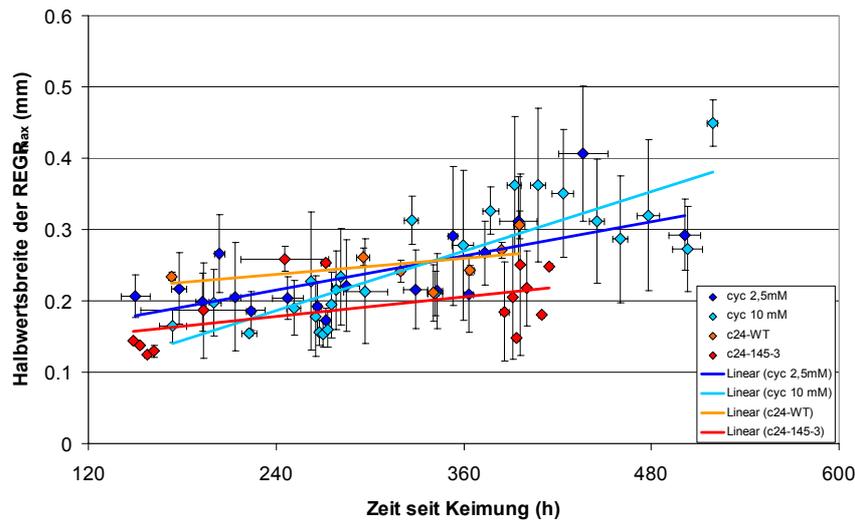


Abb. 5.26: Verlauf der REGR<sub>max</sub>-Halbwertsbreite über die Zeit seit Keimung im Mikrorhizotron für *Arabidopsis* CycB1;1-GFP, C24-wt und C24-145-3 Pflanzen. (Einteilung der Werte in Kategorien + SD)

Auch die **Länge der Wachstumszone** nimmt über die Zeit bis etwa 10 (C24) bzw. 15 Tage (CycB1;1) seit der Keimung zu (Abb. 5.27). Bei den CycB1;1-GFP Transformanten nimmt die Länge der Wachstumszone von durchschnittlich 0,8 mm nach 7 Tagen auf durchschnittlich 1,2 mm ab 15 Tagen nach Keimung zu. Die Wachstumszonenlänge der C24-Pflanzen hingegen liegt nach 7 Tagen zwischen 0,5 mm und 0,7 mm und steigt auf 0,8 mm nach 10 Tagen.

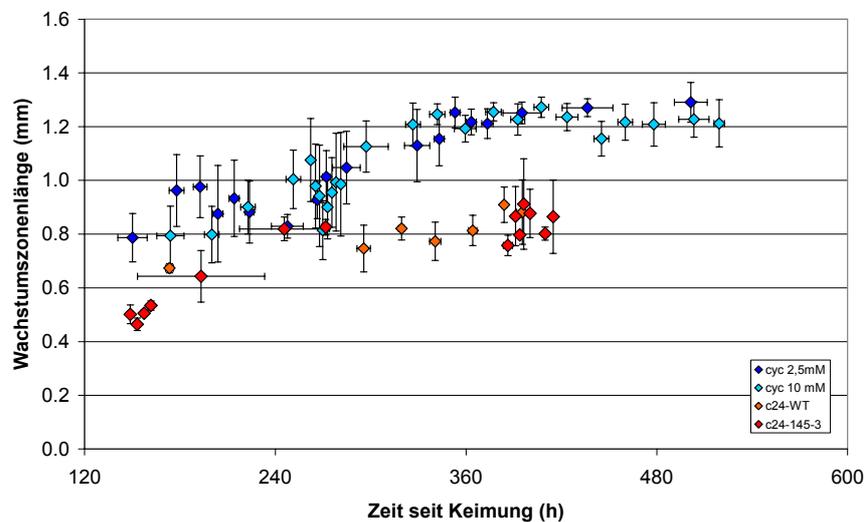
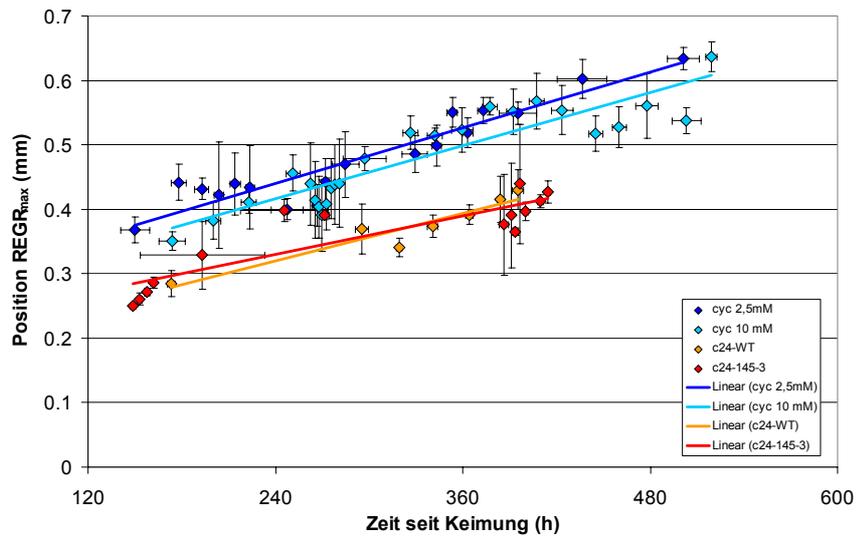


Abb. 5.27: Verlauf der Wachstumszonenlänge über die Zeit der *Arabidopsis*-Primärwurzeln seit Keimung im Mikrorhizotron für CycB1;1-GFP, C24-wt und C24-145-3 Pflanzen. (Einteilung der Werte in Kategorien + SD)



**Abb. 5.28: Verlauf der  $REGR_{max}$ -Position** (Abstand von der Wurzelspitze) aus über die Zeit seit Keimung im Mikrorhizotron für die *Arabidopsis*-Pflanzen CycB1;1-GFP, C24-wt und C24-145-3 Pflanzen. (Einteilung der Werte in Kategorien + SD)

Der Abstand der **Position der  $REGR_{max}$**  von der Wurzelspitze steigt während der gesamten Beobachtungszeit relativ linear an. Dabei lassen sich die Werte der Ecotypen klar voneinander trennen. Zwischen den Pflanzen des selben Ecotypes ist kein deutlicher Unterschied zu erkennen. Die Fitlinien der CycB1;1-GFP-Pflanzen bei unterschiedlichen Nährlösungskonzentrationen sind allerdings leicht zueinander versetzt.

### **Betrachtung verschiedener Wachstumsparameter in Bezug auf $V_{Spitze}$ :**

Die **REGR-Halbwertsbreite** der CycB1;1-GFP-Transformante sowie der C24-Linie 145-3 lässt sich durch eine logistische Funktion ausdrücken, allerdings ist der Verlauf bei höheren  $V_{Spitze}$ -Werten unsicher, da hierfür Werte im Plateaubereich fehlen. Die Werte der einzelnen Parameter sind aber im unteren Bereich von  $V_{Spitze}$  nahezu konstant und steigen dann in etwa linear an, wie es für eine logistische Kurve in diesem Bereich zu erwarten wäre. Der Verlauf der REGR-Halbwertsbreite bei den einzelnen Bedingungen ist sehr unterschiedlich: Bei den CycB1;1-GFP Transformanten liegen die 10 mM Werte anfangs bei 0,16 mm unter der Halbwertsbreite der 2,5 mM-Daten (0,2 mm), steigen aber schneller an als bei Anzucht mit 2,5 mM. Die Halbwertsbreite der bei 10 mM gehaltenen Pflanzen ist daher ab  $V_{Spitze}$ -Werten von etwa  $1,3 \text{ mm h}^{-1}$  größer als bei der 2,5 mM-Bedingung.

Die Werte der C24-Wildtyp-Pflanzen sind im gemessenen Bereich etwas höher als die der CycB1;1-GFP Pflanzen. Allerdings fehlen Werte bei höheren Geschwindigkeiten, um eine Aussage über die weitere Zunahme der Halbwertsbreite treffen zu können. Die Halbwertsbreite

der Pflanzen der Linie 145-3 ist unter  $0,075 \text{ mm h}^{-1}$  relativ konstant und deutlich kleiner als beim Wildtyp. Bei höheren Wachstumsgeschwindigkeiten steigt sie deutlich an.

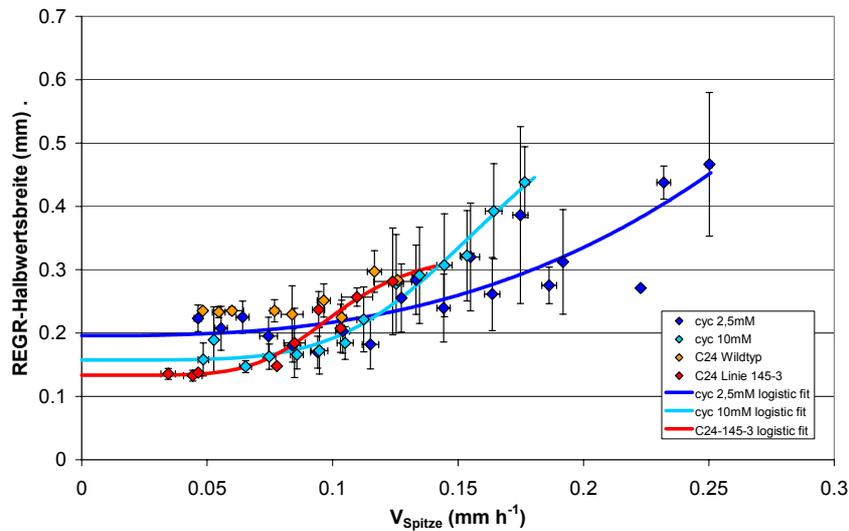


Abb. 5.29: Halbwertsbreite der REGR aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  bei *Arabidopsis* CycB1;1-GFP-Transformanten (2,5 und 10 mM) sowie C24-Wildtyp und Linie 145-3 im Mikrorhizotron (Einteilung der Werte in Kategorien + SD).

Die **Länge der Wachstumszone**, aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$ , (Abb. 5.30) lässt sich bei den CycB1;1-GFP-Pflanzen durch eine logistische Funktion beschreiben ( $R^2 = 0,97$  bzw.  $0,99$ ). Die Fitlinien beider Bedingungen stimmen sehr gut überein. Die Werte der C24-Pflanzen können nicht mit einer logistischen Funktion gefittet werden, da hierzu Werte zu niedrigeren und höheren  $V_{\text{Spitze}}$ -Bereichen fehlen. Lineare Funktionen beschreiben den Verlauf der Wachstumszonenlänge von den C24-Pflanzen sehr gut ( $R^2 = 0,93$  bzw.  $0,94$ ).

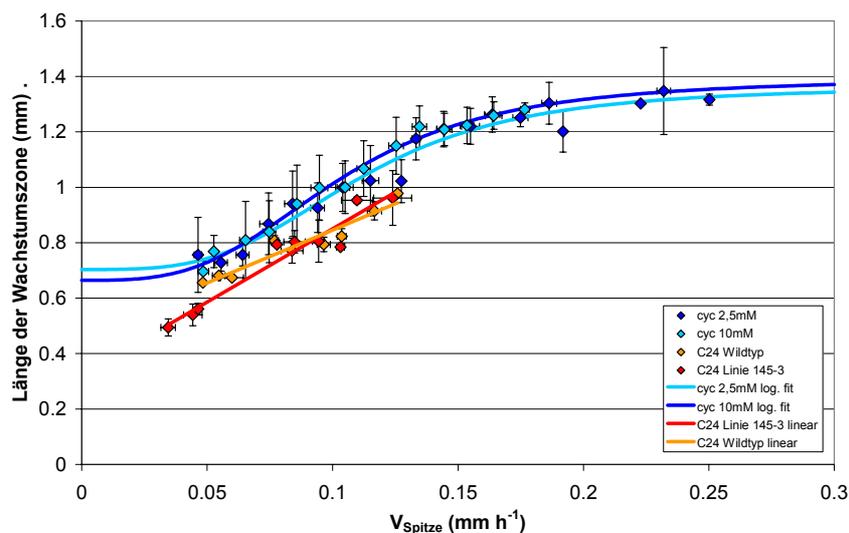


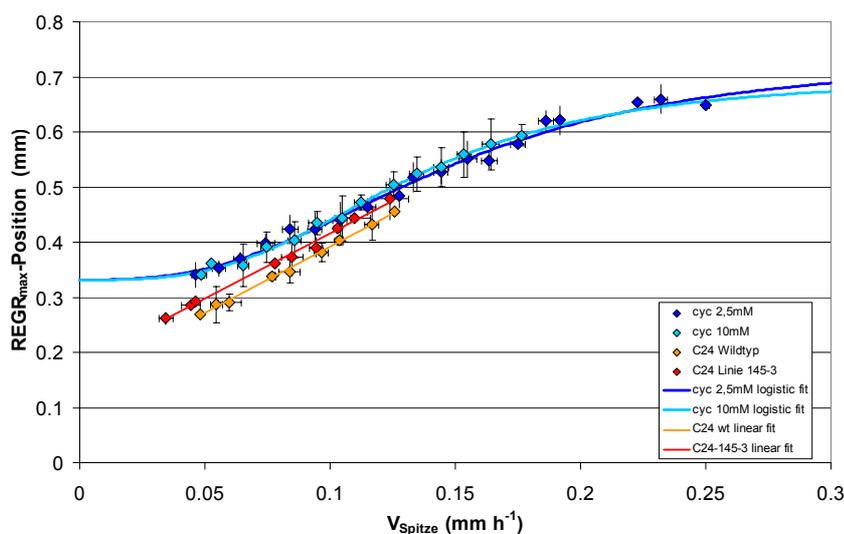
Abb. 5.30: Wachstumszonenlänge aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  bei *Arabidopsis*-Pflanzen im Mikrorhizotron: CycB1;1-GFP-Transformanten (2,5 und 10 mM) sowie C24-Wildtyp und Linie 145-3 (Einteilung der Werte in Kategorien + SD).

Die Wachstumszone der C24-Pflanzen ist im gemessenen Bereich kürzer als die der CycB1;1-GFP-Pflanzen. Bei niedrigen Werten von  $V_{\text{Spitze}}$  ist die Wachstumszonenlänge von Pflanzen der Linie 145-3 kürzer als beim Wildtyp. Die Länge der Wachstumszone nimmt aber bei den Transformanten schneller mit wachsenden  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten zu (Steigung 5,3 im Vergleich zu 3,8 beim Wildtyp). Im gemessenen Bereich vergrößert sich die Wachstumszone bei steigenden  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten bei den C24-Pflanzen linear. Beim Wildtyp vergrößert sie sich von etwa 0,65 mm bei  $0,05 \text{ mm h}^{-1}$  auf 0,98 mm bei der Linie 145-3 von 0,5 mm bei  $0,03 \text{ mm h}^{-1}$  auf 0,95 mm bei  $0,12 \text{ mm h}^{-1}$ .

Der **Abstand der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  von der Wurzelspitze** aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  lässt sich für die CycB1;1-Pflanzen ebenfalls logistisch beschreiben ( $R^2 = 0,99$  bzw.  $0,995$ ), bei den C24-Pflanzen ist die Verteilung im gemessenen Bereich linear ( $R^2 = 0,997$  bzw.  $0,994$ ; Abb. 5.31). Die Fitlinien der CycB1;1-GFP-Pflanzen sind fast identisch. Die Steigung liegt bei beiden C24-Linien bei  $2,4 \text{ mm} / \text{mm h}^{-1}$ . Der Abstand der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  von der Wurzelspitze ist bei den C24-Pflanzen im gemessenen Bereich geringer als bei den Cyclin-GFP-Pflanzen. Die Position des REGR-Maximums ist bei vergleichbarer Geschwindigkeit bei Linie 145-3 im Vergleich zu den C24-Wildtyp-Werten um etwa  $0,03 \text{ mm}$  basalwärts verschoben (Tabelle 5-3).

**Tabelle 5-3: Vergleich der  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position von *Arabidopsis th.* Ecotype C24-Wildtyp und Linie 145-3**

Pflanze	Gleichung des linearen Fits	$R^2$ -Wert
<i>A. thaliana</i> C24- Wildtyp	$y = 2,4x + 0,15$	0,997
<i>A. thaliana</i> C24- Linie 145-3	$y = 2,4x + 0,18$	0,994



**Abb. 5.31: Position der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  im Mikrorhizotron bei CycB1;1-GFP-Transformanten bei 2,5 und 10 mM Nährlösungskonzentration sowie C24-Wildtyp und Linie 145-3 (jeweils 10 mM; Einteilung der Werte in Kategorien + SD).**

Für einen Vergleich der ‚Minimalwerte‘ der  $\text{REGR}_{\max}$ -Position,  $\text{REGR}$ -Halbwertsbreite und Wachstumszonenlänge bei allen untersuchten Arten siehe Tabelle 5-4.

Die  $\text{REGR}_{\max}$  steigt im Bereich bis  $0,1 \text{ mm h}^{-1}$  bei allen untersuchten *Arabidopsis*-Pflanzen stark an und nähert sich bei höheren Geschwindigkeiten der Wurzelspitze einen Plateauwert. Dieser liegt für *CycB1;1-GFP*-Pflanzen bei Anzucht mit  $2,5 \text{ mM}$  bei etwa nahezu  $50 \% \text{ h}^{-1}$ , bei  $10 \text{ mM}$  Kultivierung bei  $40 \% \text{ h}^{-1}$  (Fitfunktion:  $y = a(1 - e^{-bx})$ ;  $R^2 = 0,89$  bzw.  $0,77$ ). Bei den C24-Pflanzen ist keine genaue Aussage über einen Plateauwert zu machen, da hierfür Werte über  $0,14 \text{ mm h}^{-1}$  fehlen.

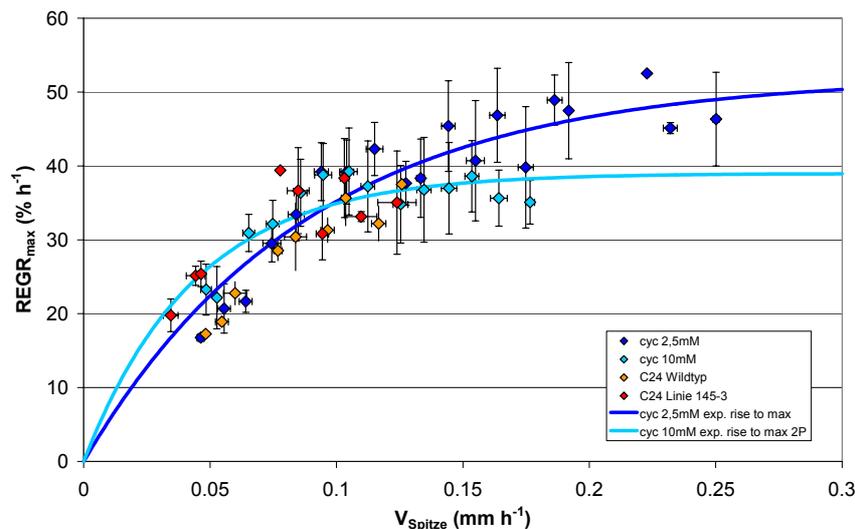


Abb. 5.32:  $\text{REGR}_{\max}$  aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  von *Arabidopsis* *CycB1;1-GFP*-Pflanzen ( $2,5$  und  $10 \text{ mM}$ ) sowie C24-Wildtyp und Linie 145-3 (Einteilung der Werte in Kategorien + SD).

### Vergleich der $\text{REGR}$ - und Geschwindigkeitsverteilung bei C24-Wildtyp und Linie 145-3:

Die  $\text{REGR}$ - und Geschwindigkeitsverteilung im Meristembereich von zwei C24-Wildtyp Pflanzen (Abb. 5.33) ist nahezu identisch, obwohl sich  $V_{\text{Spitze}}$  der beiden Pflanzen um etwa  $20\%$  unterscheidet. Im Gegensatz dazu ist die Verteilung der  $\text{REGR}$  und von  $V_{\text{Spitze}}$  der transformanten Linie 145-3 bereits an der Wurzelspitze deutlich von den Werten der Wildtyp Pflanzen getrennt. Bei dem aufgetragenen Profil der Linie 145-3 ist der Anstieg der Kurven im vorderen Meristembereich deutlich geringer als bei den Wildtyp Pflanzen. Auch die  $\text{REGR}_{\max}$ -Position ist um ca.  $0,03 \text{ mm}$  in basale Richtung verschoben (siehe auch Tabelle 5-3). Etwa  $0,7 \text{ mm}$  von der Wurzelspitze erreicht auch die Pflanze der Linie 145-3 einen  $V_{\text{Spitze}}$ -Wert von  $0,9 \text{ mm h}^{-1}$  wie Pflanze 1 des Wildtyps. Bei  $0,2 \text{ mm}$  hinter der Wurzelspitze unterscheidet sich die  $\text{REGR}$  zwischen den Wildtyp-Pflanzen (Abb. 5.33, roter Pfeil) und der Transformanten (Abb. 5.33, oranger Pfeil) um einen Faktor  $1,5$  bis  $2$ .

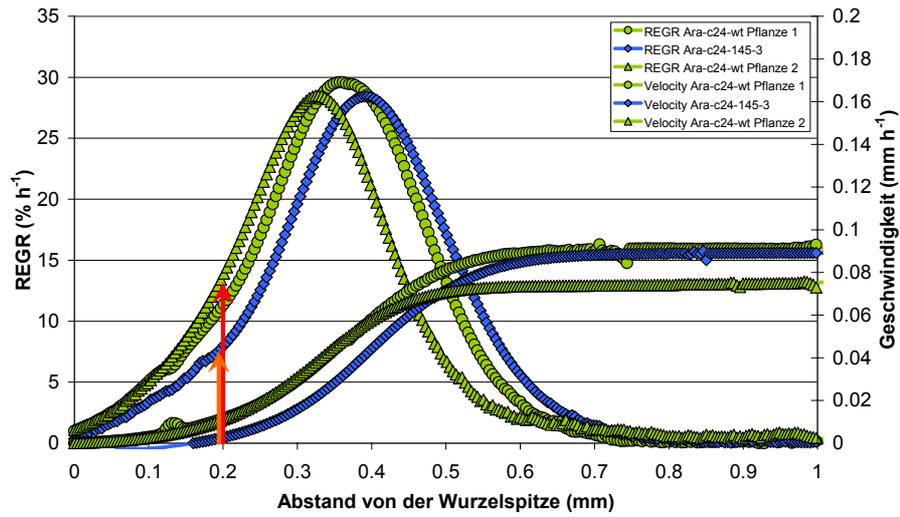


Abb. 5.33 Vergleich des Wachstumsverhaltens von Arabidopsis C24-Wildtyp (grün) mit der Transformante C24-145-3 (blau); dargestellt ist jeweils der Mittelwert über Daten, die in einem Zeitraum von 50 Stunden akquiriert wurden.

### 5.1.3 Tabak

Die Untersuchungen an Tabak-Keimlingen mit dem Mikrorhizotron-Aufbau wurden eine Woche nach der Keimung begonnen und über mehrere Tage fortgeführt.

Als **Standardbedingungen** für die nachfolgend dargestellten Ergebnisse dienen, wenn nicht anders angegeben:

- konstante Temperatur (22 °C)
- konstante Luftfeuchte (50 %  $\pm$  10 %)
- konstantes Lichtregime (12 h hell / 12 h dunkel) bei einer Lichtintensität von ca. 100-150  $\mu\text{mol PAR}$ )

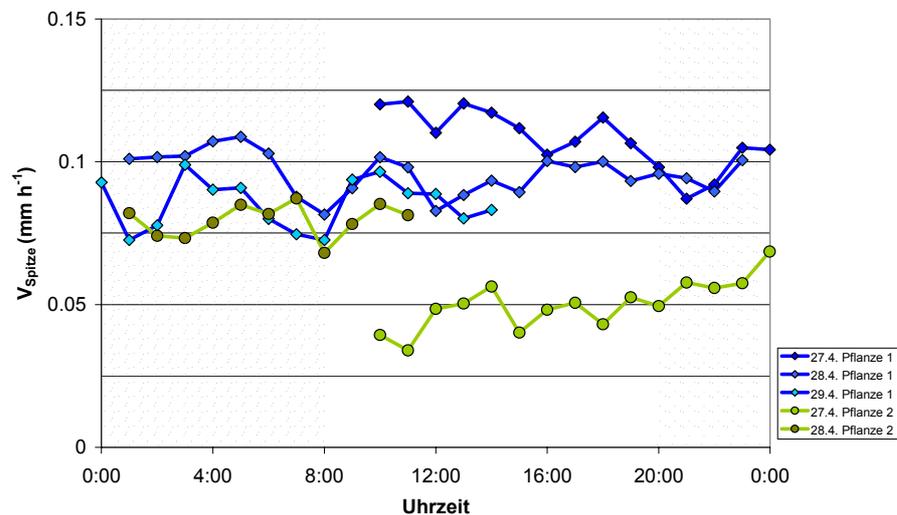


Abb. 5.34: Zeitverlauf von  $V_{\text{Spitze}}$  von zwei Primärwurzeln von Tabak-Pflanzen, die im Mikrorhizotron parallel über mehrere Tage aufgenommen wurden.

#### 5.1.3.1 Konstante Nährlösungskonzentration

Wie bereits weiter oben für Mais- und *Arabidopsis*-Primärwurzeln beschrieben ist auch bei den Primärwurzeln von Tabak bei mehrtätiger Beobachtung kein diurnaler Rhythmus zu erkennen (Abb. 5.34).

Ein typischer REGR-Verlauf einer Tabak-Pflanze bei den verwendeten Standardbedingungen weist REGR-Werte zwischen 2 und 5 %  $\text{h}^{-1}$  auf (Abb. 5.35). Dieser Wert bleibt bis etwa 0,4 mm hinter der Spitze relativ konstant. Im Anschluss steigt die REGR steil auf ein Maximum.

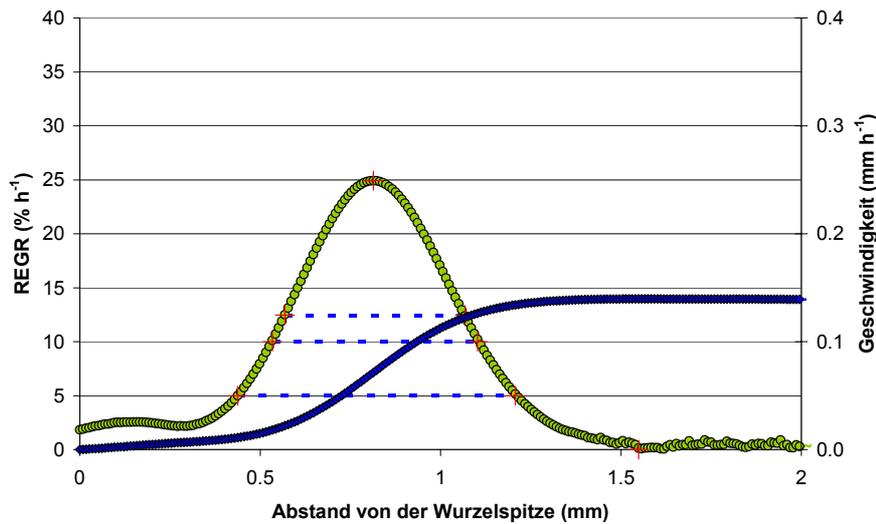


Abb. 5.35: beispielhafter REGR- und Geschwindigkeitsverlauf einer Tabak Wildtyp-Pflanze bei Anzucht mit 10 mM Nährlösung.

### 5.1.3.2 Vergleich der Wachstumsparameter in Abhängigkeit von $V_{\text{Spitze}}$

Die REGR-Halbwertsbreite aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  (Abb. 5.36) steigt tendenziell von 0,45 mm auf 0,6 mm an, lässt sich aber wegen der relativen hohen Schwankungsbreite nicht eindeutig durch eine Funktion beschreiben.

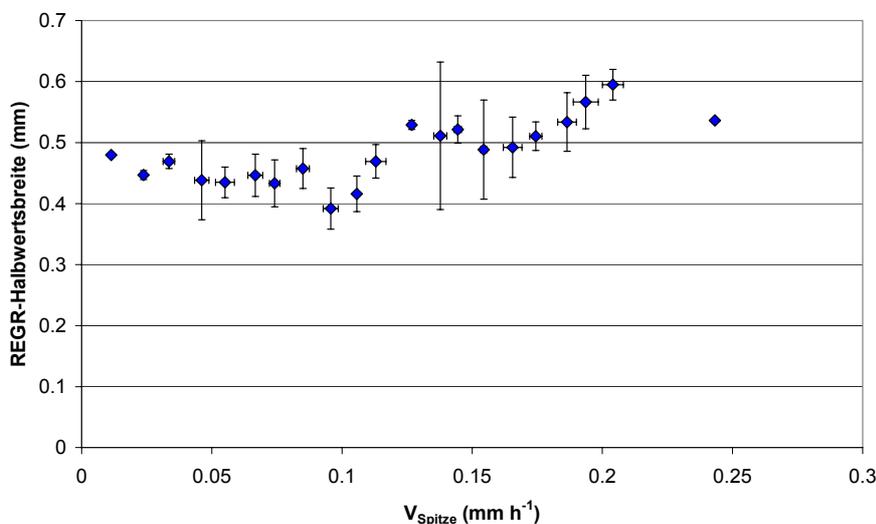


Abb. 5.36: Halbwertsbreite der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  von Tabak Wildtyp bei 10 mM Nährlösungskonzentration im Mikrorhizotron (Einteilung der Werte in Kategorien + SD).

Die Länge der Wachstumszone aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  lässt sich wie bei Mais und *Arabidopsis* durch eine logistische Fitfunktion ausdrücken (Abb. 5.37;  $R^2 = 0,87$ ). Für einen Vergleich der ‚Minimalwerte‘ der  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position, REGR-Halbwertsbreite und Wachstumszonenlänge bei allen untersuchten Arten siehe Tabelle 5-4.

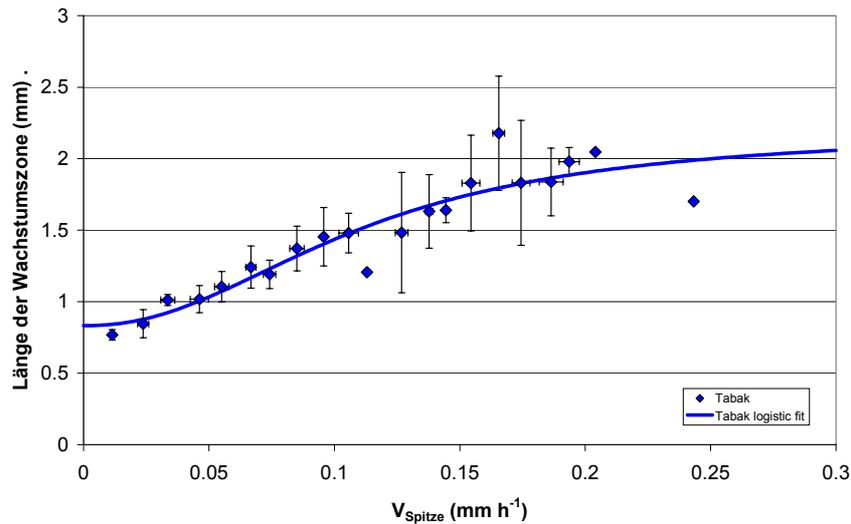


Abb. 5.37: Wachstumszonenlänge aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  von Tabak Wildtyp bei 10 mM Nährlösungskonzentration im Mikrorhizotron (Einteilung der Werte in Kategorien + SD).

Der Abstand der **REGR<sub>max</sub>-Position** steigt zwischen 0,01 und 0,11  $\text{mm h}^{-1}$  linear an (Abb. 5.38), die Steigung wird bei größeren  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten geringer. Durch mehrere Ausreisser lassen sich die Werte nicht eindeutig mit einer Funktion anfiten.

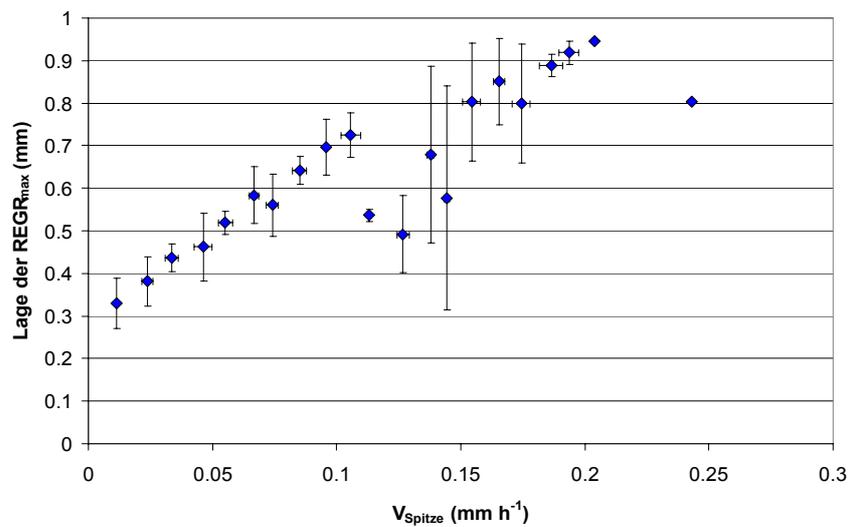


Abb. 5.38: Position der REGR<sub>max</sub> aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  von Tabak Wildtyp bei 10 mM Nährlösungskonzentration im Mikrorhizotron (Einteilung der Werte in Kategorien + SD).

Die  $\text{REGR}_{\max}$  steigt bei Zunahme von  $V_{\text{Spitze}}$  an. Der  $\text{REGR}_{\max}$ -Verlauf über  $V_{\text{Spitze}}$  lässt sich, wie auch bei Mais und *Arabidopsis* mit einer Funktion für ‚begrenzttes Wachstum‘ beschreiben ( $y = a(1 - e^{-bx})$ ;  $R^2 = 0,98$ ; Abb. 5.39). Anders als bei den Werten von Mais und *Arabidopsis* wird im gemessenen Wertebereich kein Plateauwert erreicht.

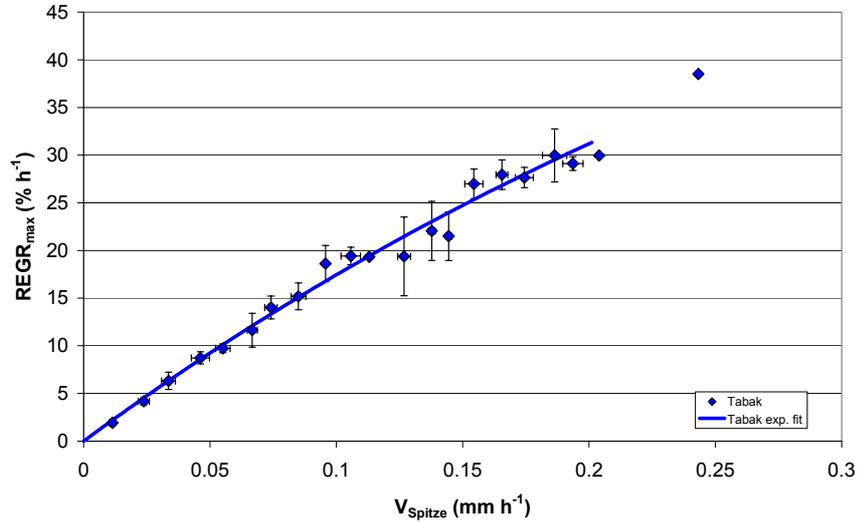


Abb. 5.39:  $\text{REGR}_{\max}$  aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  von Tabak Wildtyp Werten bei 10 mM Nährlösungskonzentration im Mikrorhizotron (Einteilung in Kategorien + SD).

### 5.1.4 Kartoffel

Die durch Micropropagation vermehrten Kartoffelpflanzen wurden nach dem Umsetzen vom Phytatray in Petrischalen auf Agar mit Nährlösung kultiviert, bis die Wurzeln eine ausreichende Länge für die Bildsequenzakquisition hatten (Gasche 2001).

Als **Standardbedingungen** für die nachfolgend dargestellten Ergebnisse dienen, wenn nicht anders angegeben:

- konstante Temperatur (22 °C)
- konstante Luftfeuchte (50 %  $\pm$  10 %)
- konstantes Lichtregime (12 h hell / 12 h dunkel (8-20 Uhr) bei einer Lichtintensität von ca. 100  $\mu$ mol PAR)

Auch bei Kartoffelwurzeln ist bei Betrachtung der Wachstumsparameter über längere Zeit kein diurnaler Rhythmus zu beobachten (Abb. 5.40).

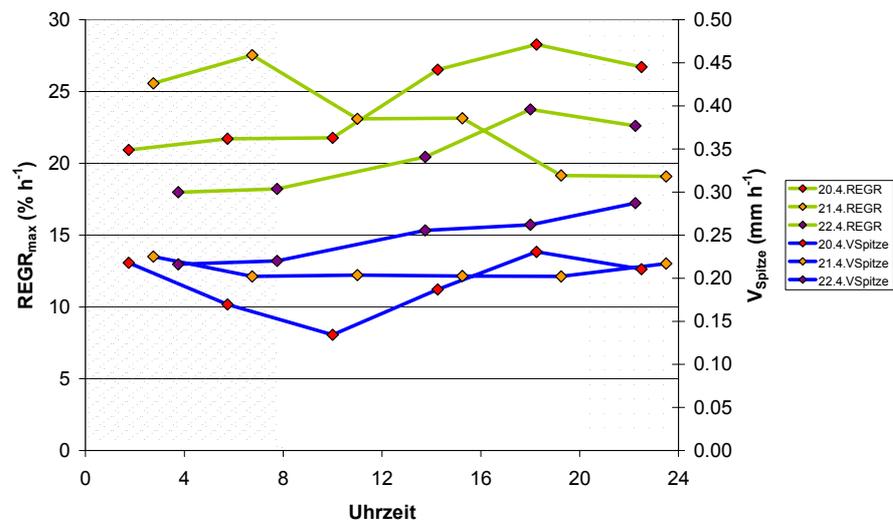


Abb. 5.40: Zeitverlauf von  $REGR_{max}$  (grüne Linien) und  $V_{Spitze}$  (blaue Linien) einer Kartoffelwurzel über 3 Tage, 10 mM im Mikrorhizotron aufgenommen (Mittelwerte über 4 h).

Im Wachstumsprofil liegt die REGR im Meristembereich im Vergleich zu den anderen untersuchten Arten relativ hoch, die  $REGR_{max}$  erreicht geringere Werte als z.B. bei *Arabidopsis*. Die Halbwertsbreite der REGR ist relativ zur  $REGR_{max}$  größer als bei den anderen analysierten Arten (Abb. 5.41).

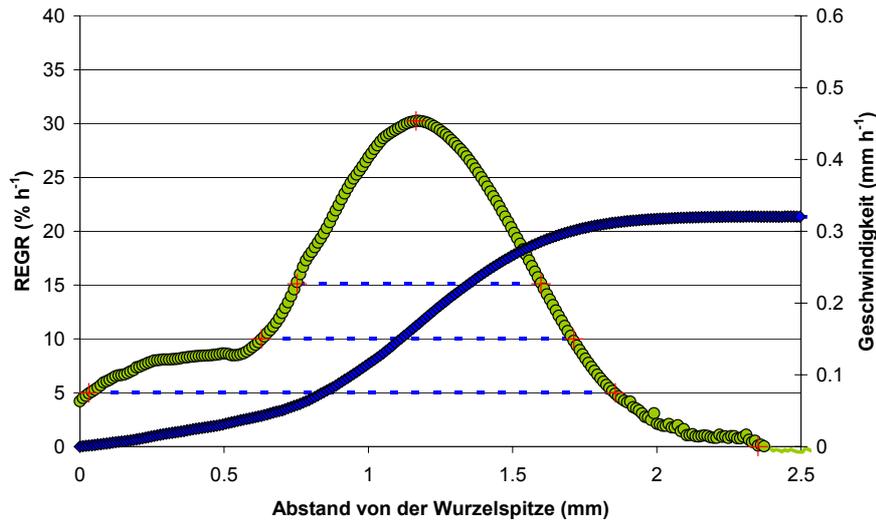


Abb. 5.41: Beispiel für ein Wachstumsprofil einer Kartoffelwurzel kultiviert in 10 mM Nährlösung, Aufgenommen im Mikrorhizotron.

### Betrachtung verschiedener Wachstumsparameter im Bezug auf $V_{\text{Spitze}}$ :

Die **REGR-Halbwertsbreite** lässt sich wie bei Mais und *Arabidopsis* durch eine logistische Funktion anfitten (Abb. 5.42;  $R^2 = 0,94$ ). Die Werte für die REGR-Halbwertsbreite bewegen sich zwischen 0,5 und 1,4 mm

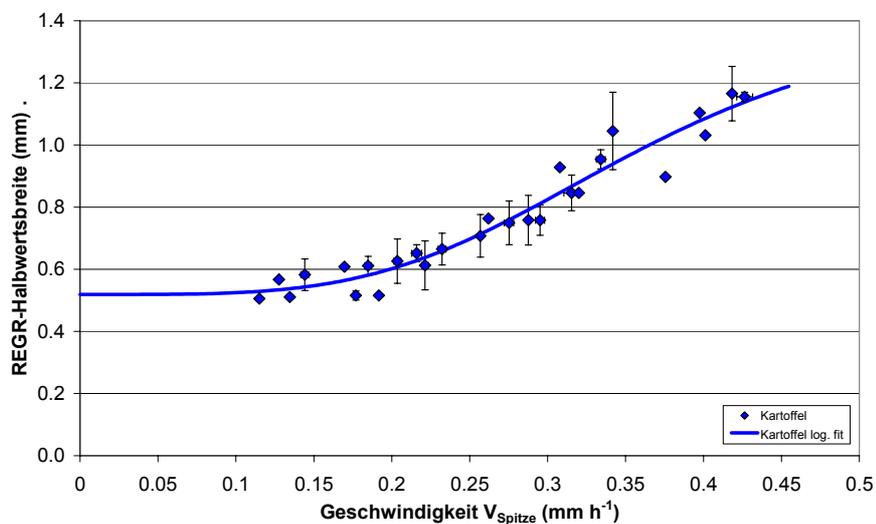


Abb. 5.42: Halbwertsbreite der  $REGR_{\text{max}}$  aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  von Kartoffelwurzeln bei 10 mM Nährlösungskonzentration im Mikrorhizotron (Einteilung in Kategorien + SD).

Die **Länge der Wachstumszone** folgt bei steigenden  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten ebenfalls einer logistischen Funktion, wie auch für die drei anderen untersuchten Arten beschrieben (Abb. 5.43;  $R^2 = 0,88$ ). Die Länge der Wachstumszone liegt im gemessenen Bereich zwischen 1,5 und 3 mm.

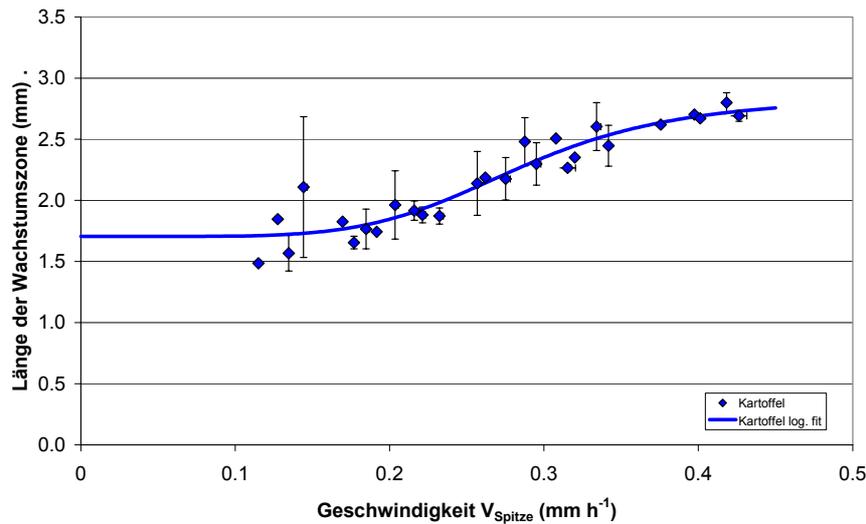


Abb. 5.43: Die Wachstumszonenlänge aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  von Kartoffelwurzeln bei 10 mM Nährlösungskonzentration im Mikrorhizotron (Einteilung in Kategorien + SD).

Der Abstand der **REGR<sub>max</sub>-Position** von der Wurzelspitze wächst von etwa 0,8 mm beim niedrigsten gemessenen  $V_{\text{Spitze}}$ -Wert bis auf 1,5 mm bei 0,4 mm h<sup>-1</sup> an (Abb. 5.44). Die Werte lassen sich ebenfalls durch eine logistische Funktion wiedergeben ( $R^2 = 0,87$ ).

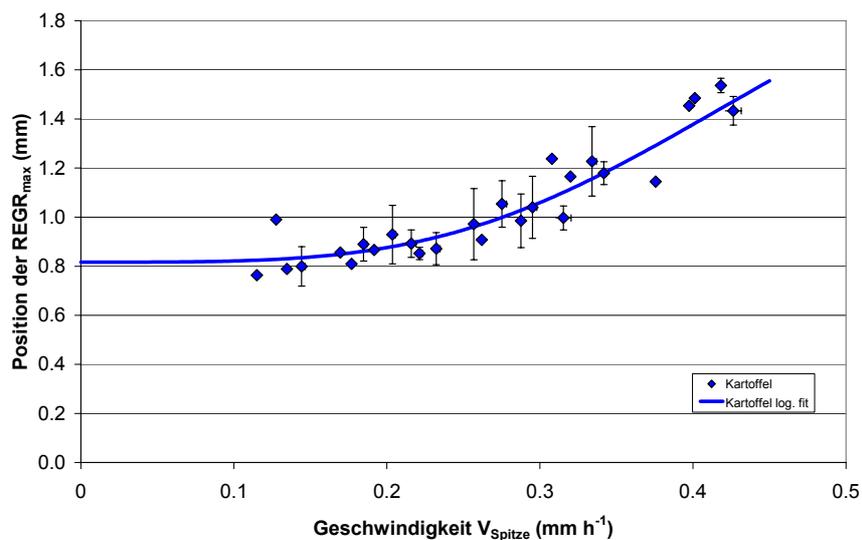


Abb. 5.44: Position der REGR<sub>max</sub> aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  von Kartoffelwurzeln bei 10 mM Nährlösungskonzentration im Mikrorhizotron (Einteilung in Kategorien + SD).

Der Verlauf der **REGR<sub>max</sub>** über die  $V_{\text{Spitze}}$ -Werte lässt sich auch bei den Kartoffelpflanzen mit einer Funktion zum ‚begrenztem Wachstum‘ anfitten, die Werte steigen zuerst schnell an und nähern sich dann asymptotisch einem Maximum an (Abb. 5.45;  $y = a(1 - e^{-bx})$ ;  $R^2 = 0,63$ ).

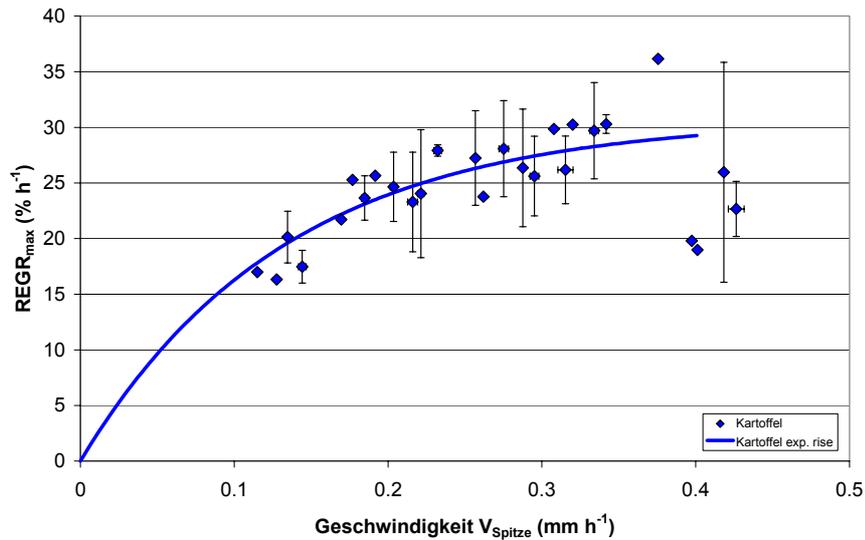


Abb. 5.45:  $REGR_{max}$  aufgetragen gegen  $V_{Spitze}$  von Kartoffelwurzeln bei 10 mM Nährlösungskonzentration im Mikrorhizotron (Einteilung in Kategorien + SD).

Für einen Vergleich der ‚Minimalwerte‘ der  $REGR_{max}$ -Position,  $REGR$ -Halbwertsbreite und Wachstumszonenlänge bei allen untersuchten Arten siehe Tabelle 5-4.

Bei Kartoffelwurzeln sind im NIR-Transmissionbild häufig langgestreckte Strukturen in Richtung der Längsachse zu beobachten, die relativ kurz vor der Spitze enden (Abb. 5.46). Diese Strukturen sind vermutlich Protophloemelemente (Gasche 2001). Der Abstand des vordersten Elementes von der Wurzelspitze steigt proportional zu  $V_{Spitze}$  mit einer Steigung von  $0,4 \text{ mm} / \text{mm h}^{-1}$  an (Abb. 5.47,  $R^2 = 0,63$ ).

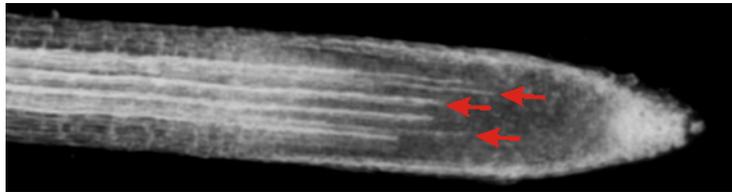


Abb. 5.46: Längsstrukturen in einem NIR-Transmissionbild einer Kartoffel-Wurzelspitze, drei der Längsstrukturen sind durch Pfeile markiert

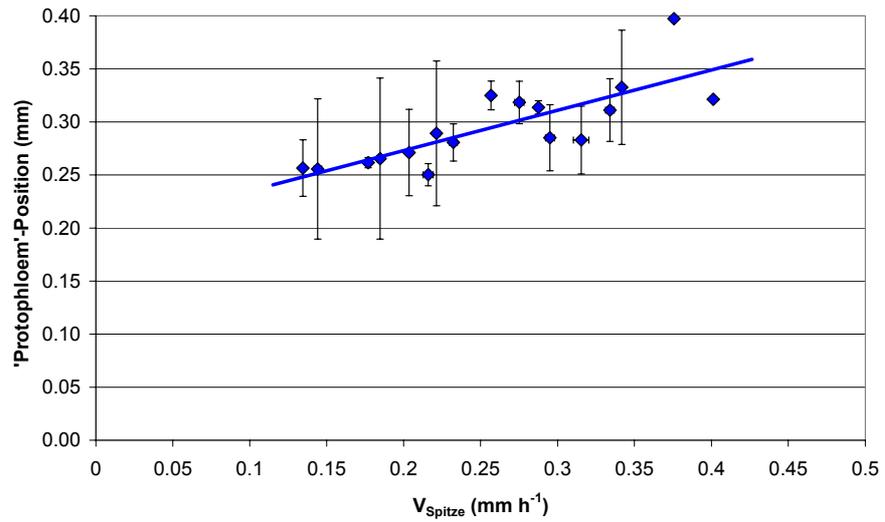


Abb. 5.47: Der Abstand des ersten putativen Protophloemelement von der Wurzelspitze aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  (Einteilung in Kategorien + SD).

### 5.1.5 Artübergreifender Vergleich der Wachstumsparameter

Der Wurzelradius ändert sich bei verschiedenen Arten unterschiedlich über die Zeit. Während der Durchmesser der Primärwurzel von Mais nach Einsatz in das Durchfluss-Rhizotron von anfangs etwa 1,2 mm auf 0,6 bis 0,8 mm abnimmt, wächst der Durchmesser von *Arabidopsis*-Primärwurzeln über mehrere Tage nach der Keimung von 0,08 bis 0,09 mm auf etwa 0,12 mm zu (Abb. 5.48). Dabei ist kein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Nährstoffkonzentrationen zu erkennen.

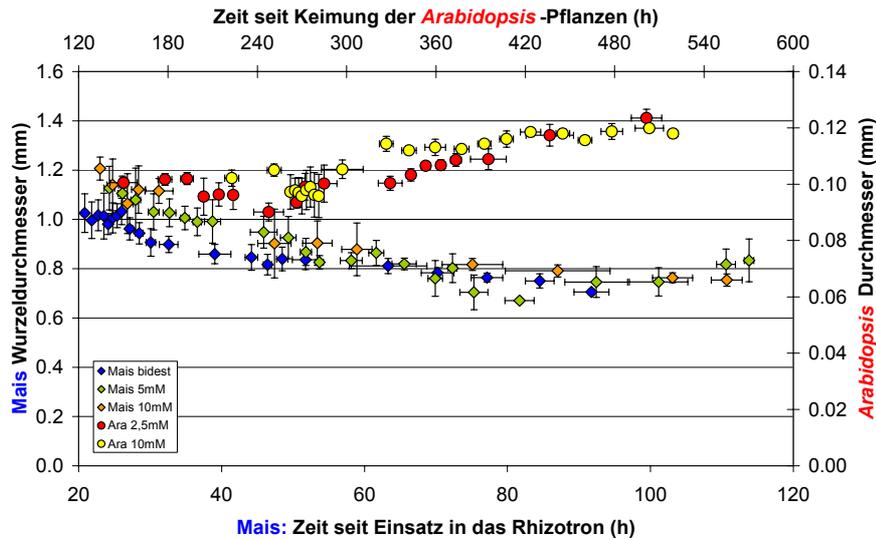


Abb. 5.48: Zeitverlauf des Wurzelradius über die Zeit seit Einsatz in das Durchfluss-Rhizotron (Mais) bzw. seit Keimung (*Arabidopsis*)

Bei Betrachtung der normalisierten Geschwindigkeitsverteilungen (Abb. 5.49) der vier untersuchten Arten fällt auf, dass sich die Verläufe deutlich voneinander unterscheiden. Im Bereich zwischen 20 und 45 % der maximalen Wachstonszonenlänge weichen die normalisierten Werte der Maispflanzen (10 mM) stark von den Werten der drei übrigen Arten ab. Dies ist auch beim Vergleich der normalisierten REGR-Werte erkennbar (Abb. 5.50).

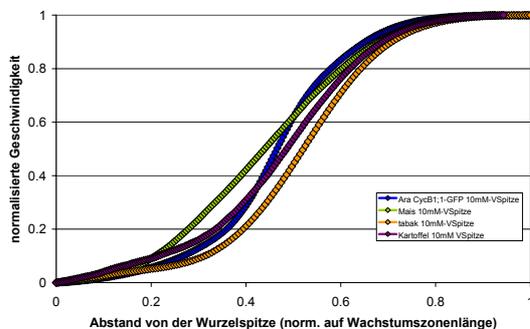


Abb. 5.49: normalisierte Geschwindigkeitsprofile bei Kultivierung in 10 mM Nährlösung von *Arabidopsis*, Kartoffel, Mais und Tabak (jeweils normalisiert auf die Wachstonszonenlänge und  $V_{Spitze}$ ).

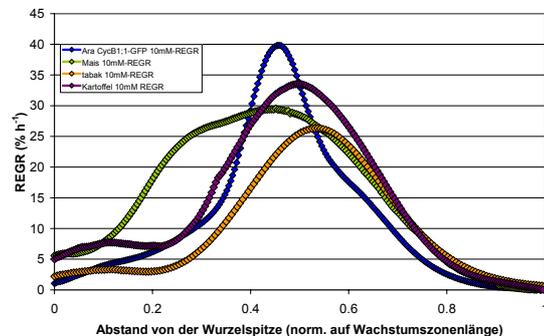


Abb. 5.50: normalisierte REGR-Profile bei Kultivierung in 10 mM Nährlösung von *Arabidopsis*, Kartoffel, Mais und Tabak (jeweils normalisiert auf die Wachstonszonenlänge).

Auch die ‚Minimalwerte‘ der  $REGR_{max}$ -Position, der REGR-Halbwertsbreite und der Wachstumszonenlänge unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Arten (Tabelle 5-4). Die unterschiedliche Verteilung der Wuchsraten bei den verschiedenen Arten lassen sich auch gut beim Vergleich der farbkodierten Overlay-Bilder (Abb. 5.51) vergleichen. Da für die Aufnahme jeweils die gesamte Wachstumszone im Bildbereich enthalten sein sollte, sind die Wurzeln jeweils so vergrößert, dass der Durchmesser auf den ersten Blick sehr ähnlich aussieht.

**Tabelle 5-4: „Minimalwerte“ verschiedener Wachstumsparameter** der Primärwurzelspitze von *Arabidopsis*, Kartoffel, Mais und Tabak (Y-Achsenabschnitt der logistischen Fitkurve)

Wachstumsparameter	Minimalwert (Y-Achsenabschnitt der logistischen Fitkurve) bei					
	Mais		<i>Arabidopsis</i>		Kartoffel	Tabak
	5 mM	10 mM	2,5 mM	10 mM	10 mM	10 mM
Lage der $REGR_{max}$ (mm)	1,7	1,7	0,33	0,33	0,82	-
Wachstumszonenlänge (mm)	4	3,8	0,66	0,7	1,70	0,8
REGR-Halbwertsbreite (mm)	2,0	2,3	0,2	0,16	0,52	-
Durchmesser (mm)	0,6 – 1,4		0,08 – 0,125		0,19 – 0,3	0,21 – 0,28

**Tabelle 5-5: Artübergreifender Wurzelwachstumsvergleich** mit dem Wurzeldurchmesser als Vergleichskriterium: Übersicht über die Steigung bzw. Gleichungen der Fitlinien sowie der zugehörigen  $R^2$ -Werte.

Art, Bedingung	Pos. der $REGR_{max}$		Länge der Wachstumszone		$V_{Spitze}$		Halbwertsbreite der REGR	
	Steigung bzw. Funktion	$R^2$	Steigung bzw. Funktion	$R^2$	Steigung bzw. Funktion	$R^2$	Steigung bzw. Funktion	$R^2$
Mais, bidest	$y = 1,2x + 2,68$	0,10	$y = -0,7x + 11,0$	0,004	$y = -0,8x + 2,4$	0,08	$y = -0,8x + 6,1$	0,01
Mais, 5 mM	$y = 6,5x - 2,6$	0,65	$y = 15,6x - 5,7$	0,61	$y = 3,2x - 1,9$	0,48	$y = 8,6x - 4,0$	0,61
Mais, 10 mM	$y = 7,3x - 3,8$	0,90	$y = 15,4x - 7,2$	0,80	$y = 3,4x - 2,4$	0,85	$y = 8,3x - 4,3$	0,83
Kartoffel, 10 mM	$y = 6,5x - 0,45$	0,59	$y = 9,9x - 0,1$	0,31	$y = 1,6x - 0,1$	0,16	$y = 4,2x - 0,2$	0,40
Tabak, 10 mM	$y = 6,2x - 0,97$	0,52	$y = 13,8x - 2,2$	0,29	$y = 1,8x - 0,4$	0,26	$y = 1,2x + 0,2$	0,19
<i>Arabidopsis</i> , 2,5 mM	$y = 8,0x - 0,35$	0,78	$y = 15,6x - 0,6$	0,55	$y = 4,2x - 0,3$	0,74	$y = 4,6x - 0,2$	0,30
<i>Arabidopsis</i> , 10 mM	$y = 6,6x - 0,22$	0,74	$y = 14,0x - 0,4$	0,64	$y = 2,6x - 0,2$	0,63	$y = 6,7x - 0,5$	0,43
alle Werte außer Mais, bidest	$y = 3,8x - 0,12$	0,88	$y = 9,6x - 0,5$	0,88	$y = 1,3x - 0,67$	0,67	$y = 4,9x - 0,5$	0,87

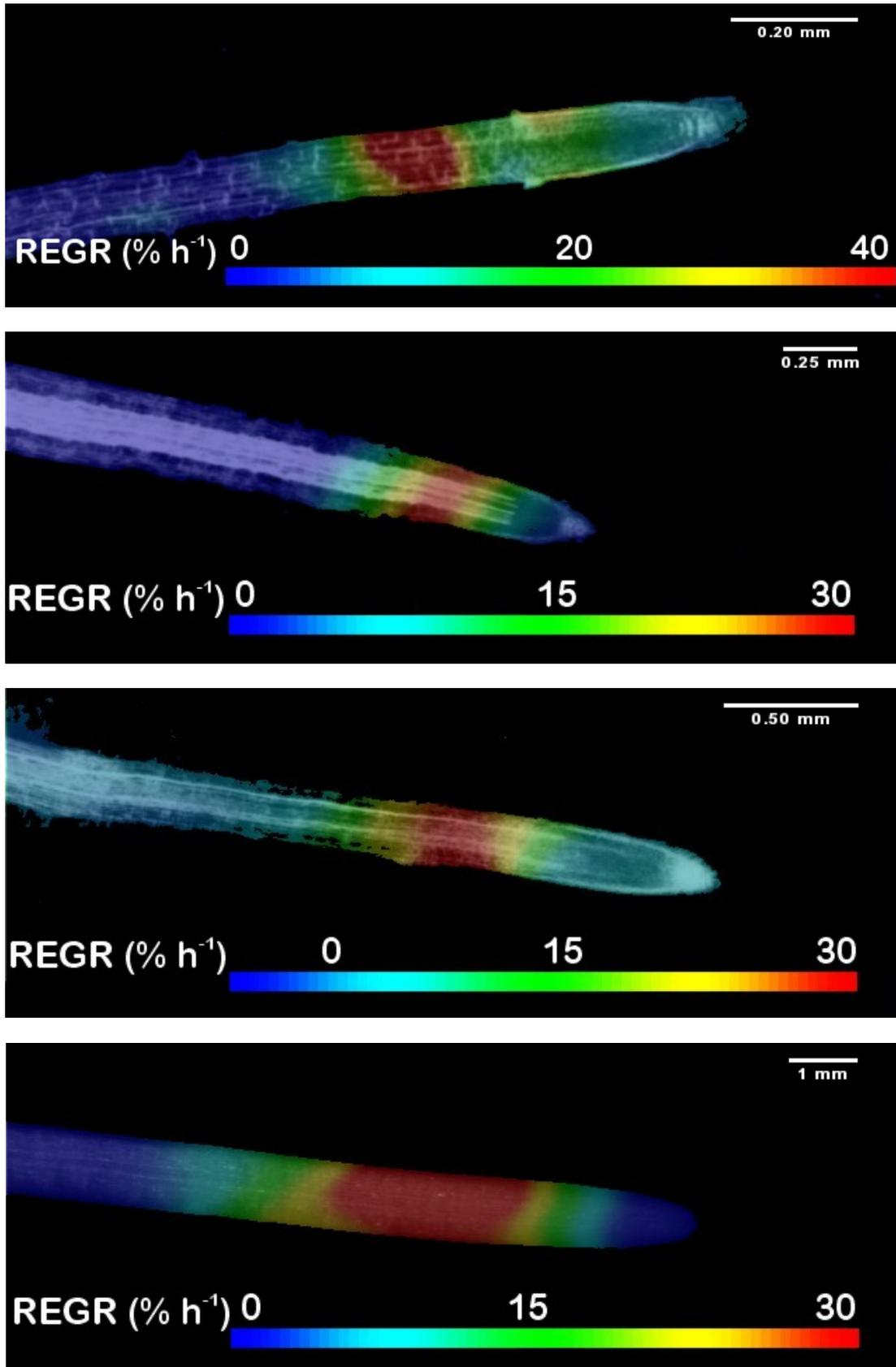
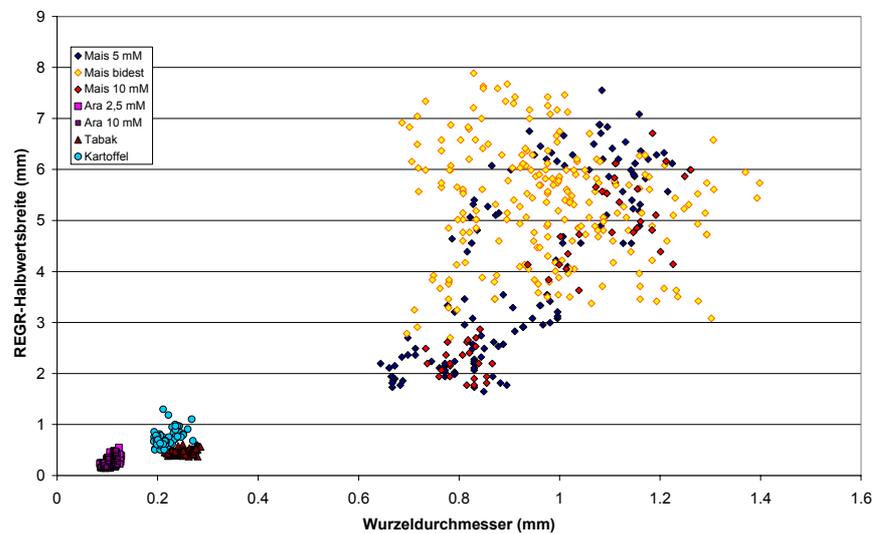


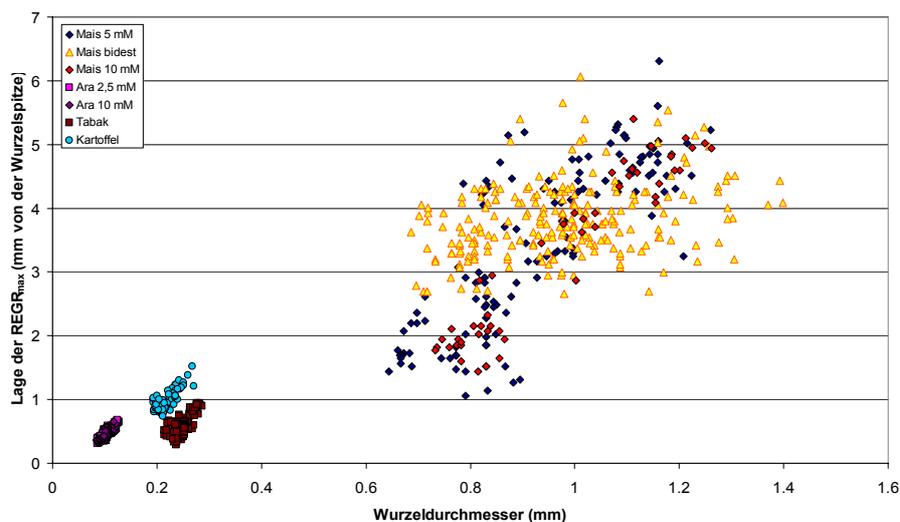
Abb. 5.51: Zusammenstellung von farbkodierten REGR-Profilen, die als Overlay transparent über das Originalbild projiziert werden. Von oben nach unten: *Arabidopsis*, Tabak, Kartoffel und Mais.

Bei allen untersuchten Pflanzen, mit Ausnahme von Mais, der in bidestilliertem Wasser kultiviert wird, steigt die durchschnittliche **REGR-Halbwertsbreite** bei zunehmendem Wurzelradius an (Abb. 5.52). Je nach Pflanzenart und Bedingung besteht eine mehr oder weniger deutliche lineare Abhängigkeit (Tabelle 5-5).



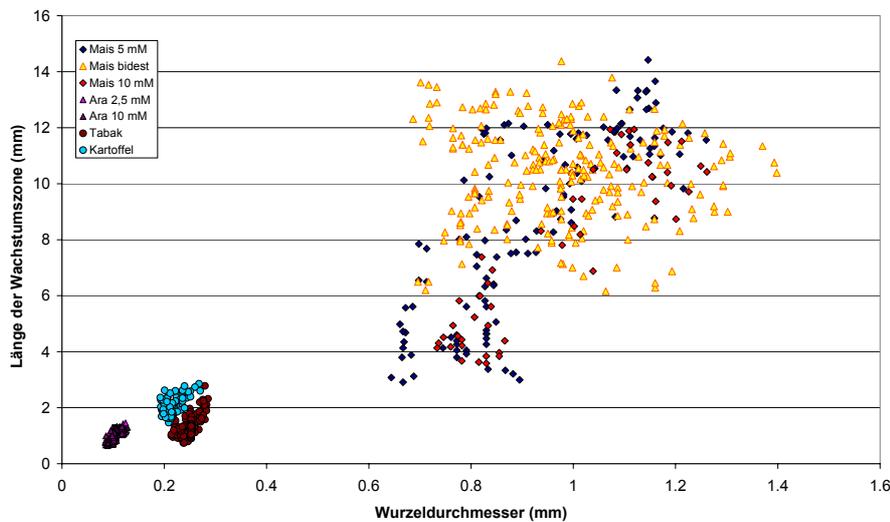
**Abb. 5.52:** REGR-Halbwertsbreite aufgetragen gegen den Wurzelradius für *Arabidopsis*, Tabak, Kartoffel und Mais (jeweils Mittelwerte über 1:30 h (Mais) bzw. 2 h (restliche Arten)).

Eine klare lineare Beziehung besteht auch zwischen der **Position der REGR<sub>max</sub>** und dem Wurzelradius (Abb. 5.53): Die geringste Steigung und lineare Abhängigkeit liegt bei in bidestilliertem Wasser kultiviertem Mais vor (Steigung 1,2 bei  $R^2 = 0,1$ ). Bei allen anderen Pflanzen bzw. Bedingungen liegen die Steigungen zwischen 5,8 (Kartoffel) und 7,3 (Mais, 10 mM) bei  $R^2$ -Werten zwischen 0,52 und 0,9 (Tabelle 5-5).



**Abb. 5.53:** Position der REGR<sub>max</sub> aufgetragen gegen den Wurzelradius für *Arabidopsis*, Tabak, Kartoffel und Mais (jeweils Mittelwerte über 1:30 h (Mais) bzw. 2 h (restliche Arten)).

Auch die **Länge der Wachstumszone** weist eine klare Beziehung zum Durchmesser der jeweiligen Wurzel auf (Abb. 5.54). Eine Ausnahme stellt auch hier Mais bei Anzucht in bidestilliertem Wasser dar, da die Werte der Wachstumszonenlänge über den gesamten gemessenen Durchmesserbereich streuen. Tendenziell nimmt die Länge der Wachstumszone bei Mais in bidestilliertem Wasser bei steigenden Durchmessern eher ab. Bei allen anderen Bedingungen bzw. Pflanzenarten hingegen wächst die Länge der Wachstumszone proportional zum Wurzelradius mit relativ ähnlichen Steigungen der linearen Fits an (Tabelle 5-5).



**Abb. 5.54: Länge der Wachstumszone aufgetragen gegen den Wurzelradius** für *Arabidopsis*, Tabak, Kartoffel und Mais (jeweils Mittelwerte über 1:30 h (Mais) bzw. 2 h (restliche Arten)).

$V_{\text{Spitze}}$  steigt ebenfalls linear bei zunehmendem Wurzelradius (mit Ausnahme von Mais in bidestilliertem Wasser) an (Abb. 5.55). Bei den an Mais in bidestilliertem Wasser gewonnenen Werten sinkt der Durchschnitt der Werte für  $V_{\text{Spitze}}$  leicht bei steigenden Durchmessern ab. Die Steigungen bei den anderen Bedingungen bzw. Pflanzenarten liegen relativ dicht beieinander (Tabelle 5-5).

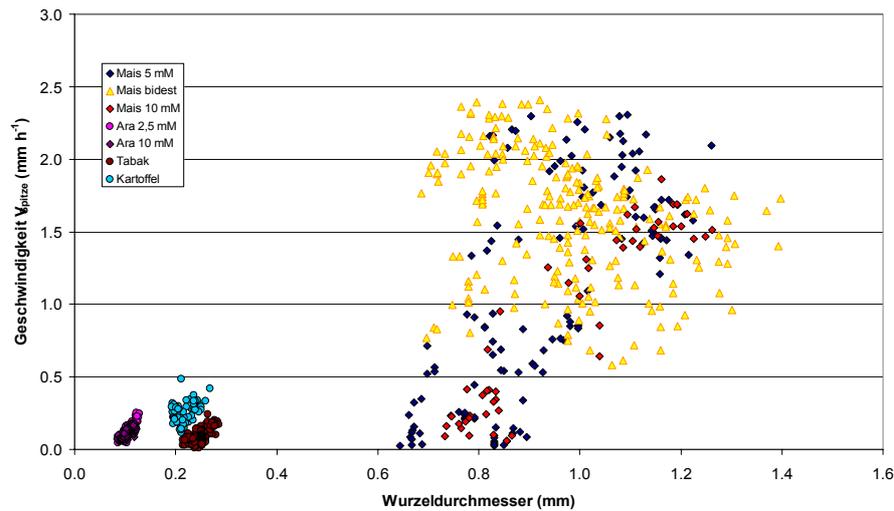


Abb. 5.55:  $V_{\text{Spitze}}$  aufgetragen gegen den Wurzeldurchmesser für *Arabidopsis*, Tabak, Kartoffel und Mais (jeweils Mittelwerte über 1:30 h (Mais) bzw. 2 h (restliche Arten)).

Ganz anders sieht die Verteilung der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  bei Auftragung gegen den Wurzeldurchmesser aus (Abb. 5.56). Bei *Arabidopsis* und Kartoffel zeigen die  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Werte keine klare Korrelation mit dem Durchmesser. Bei Tabak sowie bei Kultivierung von Mais in 5 und 10 mM steigen die  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Werte tendenziell mit dem Durchmesser. Im Gegensatz dazu sinkt die  $\text{REGR}_{\text{max}}$  bei wachsendem Durchmesser im Durchschnitt bei Maispflanzen der bidest-Bedingung.

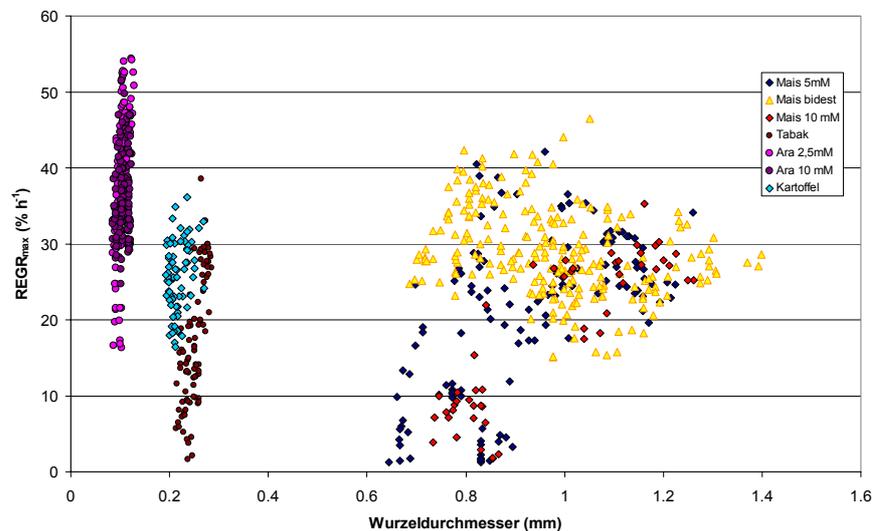


Abb. 5.56:  $\text{REGR}_{\text{max}}$  aufgetragen gegen den Wurzeldurchmesser für *Arabidopsis*, Tabak, Kartoffel und Mais (jeweils Mittelwerte über 1:30 h (Mais) bzw. 2 h (restliche Arten)).

Auch die Wuchsrate an der Wurzelspitze ( $\text{REGR}_{\text{Tip}}$ ) zeigt wie die  $\text{REGR}_{\text{max}}$  keine deutliche Korrelation mit dem Wurzeldurchmesser (Abb. 5.57).

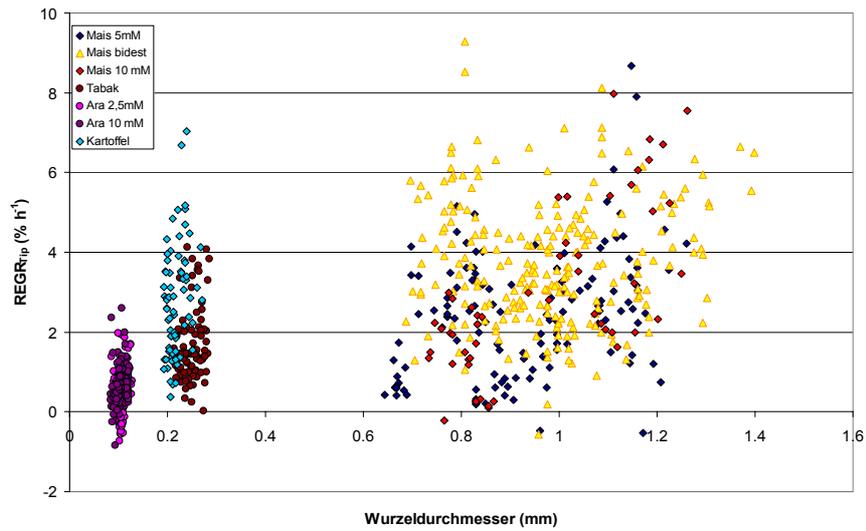


Abb. 5.57:  $REG_{Tip}$  aufgetragen gegen den Wurzeldurchmesser für *Arabidopsis*, Tabak, Kartoffel und Mais (jeweils Mittelwerte über 1:30 h (Mais) bzw. 2 h (restliche Arten)).

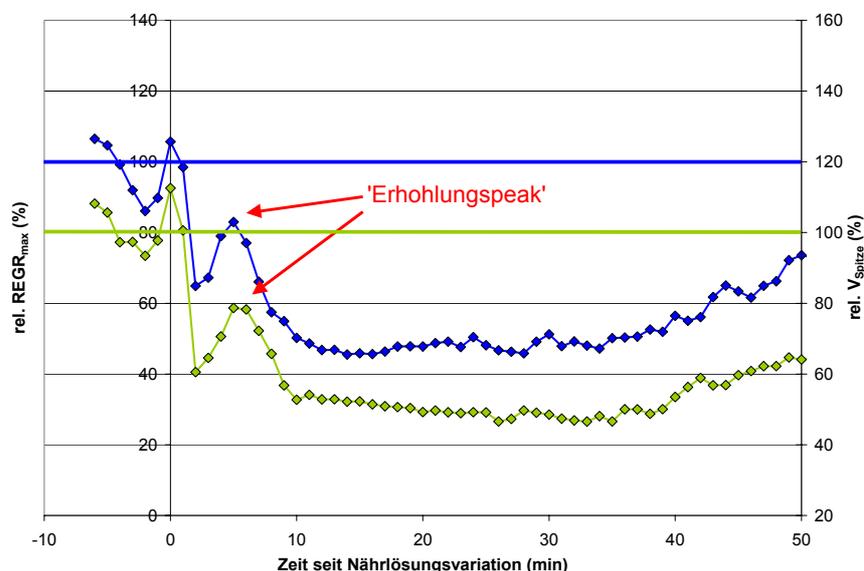
## 5.2 Einfluss variierteter Umweltbedingungen auf die Zellstreckung

### 5.2.1 Mais

Um die Anpassungsreaktion der Primärwurzeln von Mais auf veränderte Bedingungen studieren zu können, wurden Maiswurzeln unter konstanten Bedingungen mit der DISP-Methode untersucht (Kap. 5.1.1) und anschließend während der Aufnahme einer Bildsequenz die Zusammensetzung der Nährlösung verändert. Für jede Bedingung wird bei der Beschreibung jeweils ein Durchschnitt – über die absoluten und relativen –  $REGR_{max}$  und  $V_{Spitze}$ -Werte verwendet. Die relativen  $REGR_{max}$ - und  $V_{Spitze}$ -Werte werden in Relation zum Durchschnitt vor der Nährlösungsvariation (entspricht 100 %) gesetzt und anschließend der Mittelwert aus den relativen Werten der Einzelversuche gebildet. Zusätzlich werden am Ende des Kapitels die Zeitverläufe von jeweils zwei einzelnen Versuchen pro Experiment verglichen (Abb. 5.79, Abb. 5.80).

#### 5.2.1.1 Bidest $\rightarrow$ 5 mM

Bei schneller Veränderung der umspülenden Nährlösung im Durchfluss-Rhizotron von bidestilliertem Wasser auf 5 mM Nährlösung verringert sich sowohl die  $REGR_{max}$  als auch  $V_{Spitze}$  schlagartig (Abb. 5.58 bis Abb. 5.60). Die relative  $REGR_{max}$  fällt innerhalb von 3 Minuten vom Ausgangswert 100 % (Durchschnittswert über 100 Minuten vor der Variation entspricht 100 %) auf 73 %, erholt sich kurzfristig für 3 Minuten auf 80 % („Erholungspeak“) um anschließend in 5 Minuten auf ein Minimum von 45 % des Ausgangswertes zu sinken (Abb. 5.58).

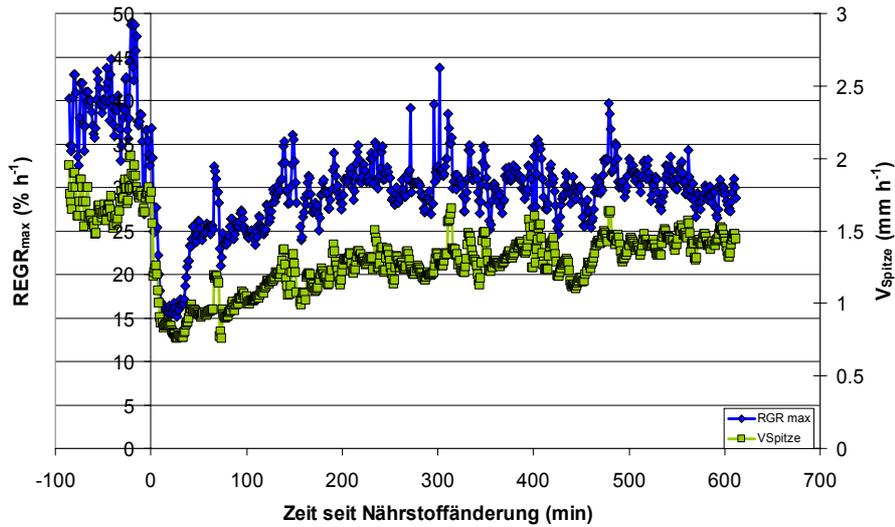


**Abb. 5.58: Bidest auf 5 mM** - Dynamik der relativen Werte von  $V_{Spitze}$  und  $REGR_{max}$  bei schneller Änderung der externen Nährstoffverfügbarkeit von 0 auf 5 mM Nährlösung (relativ zum Durchschnitt vor der Variation). Dargestellt ist ein Ausschnitt der Versuchsdaten bis 50 Minuten nach der Nährlösungsvariation. Deutlich ist ein ‚Erholungspeak‘ und ein Minimum über etwa 30 Minuten zu erkennen.

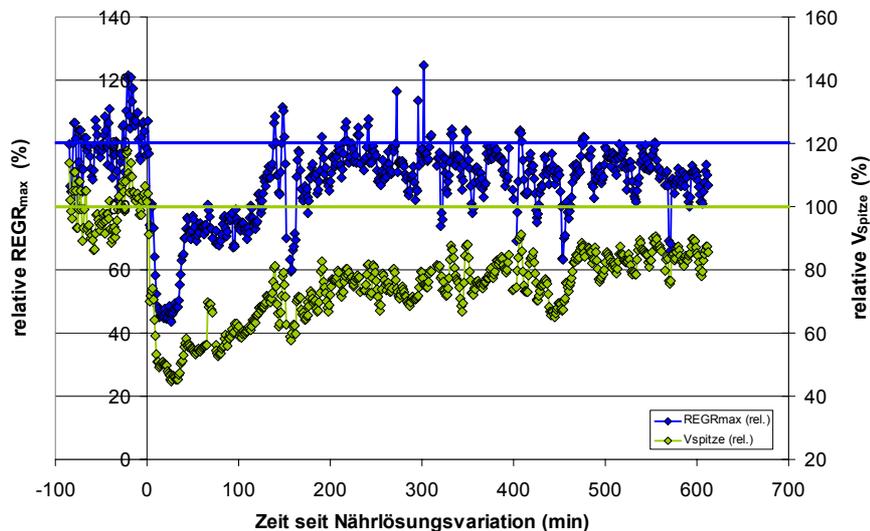
Dieses Minimum dauert ca. eine halbe Stunde, darauf folgt ein schneller Anstieg auf 70 %, die etwas mehr als eine Stunde gehalten werden. Fast zwei Stunden nach der Nährlösungsvariation

erreicht die relative  $\text{REGR}_{\max}$  wieder etwa 90 % den Ausgangswertes. Dieser Wert bleibt für die nächsten Stunden erhalten.

Sehr ähnlich ist der Verlauf von  $V_{\text{Spitze}}$  nach der Nährstoffzugabe: In 3 Minuten nach Zugabe sinkt  $V_{\text{Spitze}}$  auf 70% des Ausgangswertes, steigt auch kurz für 3 Minuten auf 74% an und fällt anschließend für eine halbe Stunde auf ein Minimum bei 45% des Ausgangswertes.  $V_{\text{Spitze}}$  erreicht im Folgenden nicht die hohen Werte wie  $\text{REGR}_{\max}$ , steigt aber zu vergleichbaren Zeitpunkten.



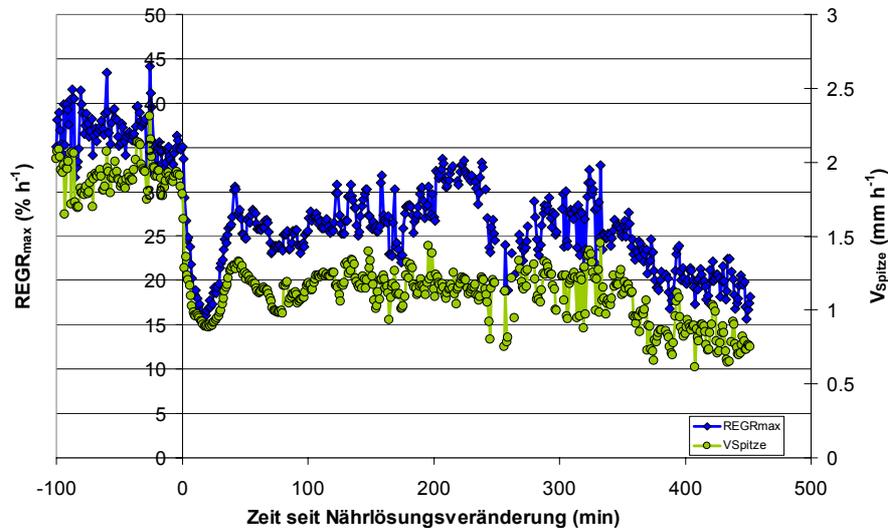
**Abb. 5.59: Bideist auf 5 mM:** Dynamik von  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\max}$  bei schneller Änderung der externen Nährstoffverfügbarkeit von 0 mM auf 5 mM Nährlösung. Dargestellt ist der Mittelwert aus 2 Versuchsansätzen. (Die Skalen von  $\text{REGR}_{\max}$  und  $V_{\text{Spitze}}$  sind so gewählt, dass sich die Datenpunkte möglichst wenig überlagern).



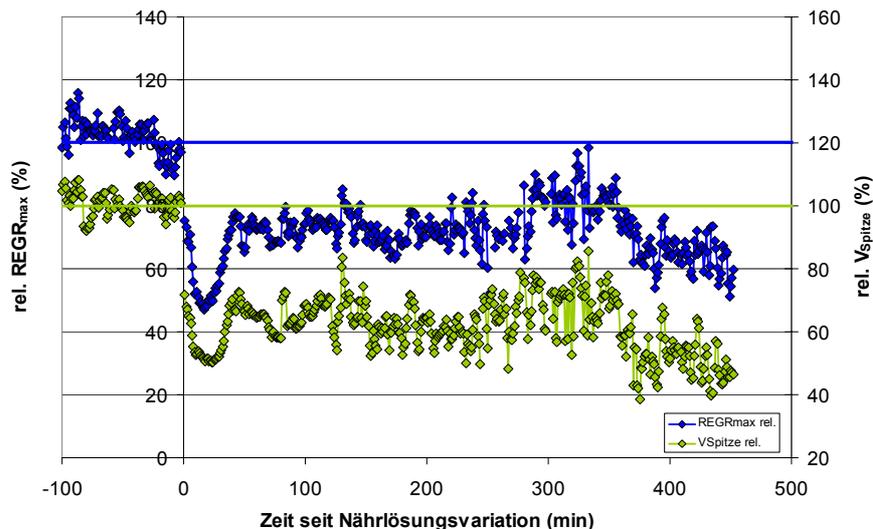
**Abb. 5.60: Bideist auf 5 mM:** Dynamik der relativen  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\max}$ -Werte (relativ zum Durchschnittswert vor der Nährlösungsvariation) bei schneller Änderung der externen Nährstoffverfügbarkeit von 0 mM auf 5 mM Nährlösung. Dargestellt ist der Mittelwert aus 2 Versuchsansätzen. (Die Skalen von  $\text{REGR}_{\max}$  und  $V_{\text{Spitze}}$  sind so gewählt, dass sich die Datenpunkte möglichst wenig überlagern, die blaue Linie markiert die 100%-Marke der relativen REGR-Werte, die grüne Linie die  $V_{\text{Spitze}}$ -100%-Marke).

### 5.2.1.2 Bidest $\rightarrow$ 10 mM

Bei rascher Zugabe von Nährlösung in das mit bidestilliertem Wasser gefüllte Durchfluss-Rhizotron auf eine Gesamtkonzentration von 10 mM Nährlösung ändern sich  $\text{REGR}_{\max}$  und  $V_{\text{Spitze}}$  schnell (Abb. 5.61, Abb. 5.62). Wie bei der Variation von bidest auf 5 mM sinken beide Werte in wenigen Minuten von 100 auf 45 % ( $\text{REGR}_{\max}$ ) bzw. 50 % ( $V_{\text{Spitze}}$ ) ab. Dabei ist kein „Erholungspeak“ wie bei dem bidest  $\rightarrow$  5 mM Versuch zu erkennen. Auch die Erholung vom etwa 30 Minuten andauernden Minimum ist vergleichbar mit dem oben beschriebenen Versuch:  $\text{REGR}_{\max}$  erreicht 75 % und  $V_{\text{Spitze}}$  70 % des Ausgangswertes. Im Gegensatz dazu wird dieses Niveau über etwa fünf Stunden relativ konstant gehalten.



**Abb. 5.61: Bidest auf 10 mM:** Dynamik von  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\max}$  bei rascher Änderung der externen Nährstoffverfügbarkeit von 0 mM auf 10 mM Nährlösung. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Versuchsansätzen. (Die Skalen von  $\text{REGR}_{\max}$  und  $V_{\text{Spitze}}$  sind so gewählt, dass sich die Datenpunkte möglichst wenig überlagern).

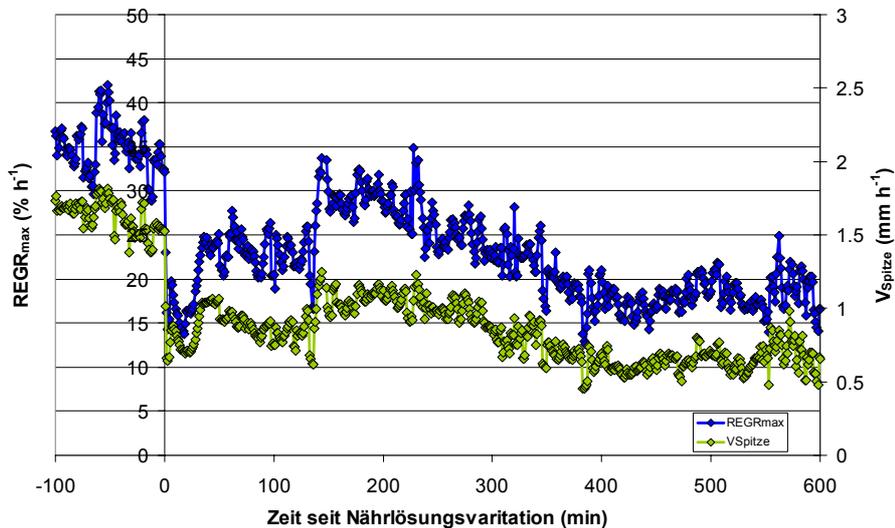


**Abb. 5.62: Bidest auf 10 mM:** Dynamik der relativen  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\max}$ -Werte (relativ zum Durchschnitt vor der Nährlösungsveränderung) bei rascher Änderung der externen Nährstoffverfügbarkeit von 0 mM auf 10 mM Nährlösung. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Versuchsansätzen. (Die Skalen von  $\text{REGR}_{\max}$  und  $V_{\text{Spitze}}$  sind so gewählt, dass sich die Datenpunkte möglichst wenig überlagern, die blaue Linie markiert die 100%-Marke der relativen REGR-Werte, die grüne Linie die  $V_{\text{Spitze}}$ -100%-Marke).

### 5.2.1.3 Bidest $\rightarrow$ 20 mM

Bei rascher Erhöhung der Nährstoffkonzentration von 0 auf 20 mM Nährlösung im Durchfluss-Rhizotron sinken die relativen  $REGR_{max}$  und  $V_{Spitze}$ -Werte schneller als bei Variation von bidest auf 5 bzw. 10 mM Nährlösung (Abb. 5.63, Abb. 5.65). Bereits nach 3 Minuten ist ein Minimum von 40 % des Ausgangswertes bei der  $REGR_{max}$  bzw. 38 % bei  $V_{Spitze}$  erreicht. Dieser Wert wird nur für eine Minute gehalten, darauf folgt ein „Erholungspeak“ auf 55 % bei der  $REGR_{max}$  bzw. 52 % bei  $V_{Spitze}$ . Dieser „Erholungspeak“ dauert etwas länger (ca. 6 Minuten) als beim „Nährstoffsprung“ von bidest auf 5 mM. Ein länger andauerndes Minimum wird etwa 15 Minuten nach Zugabe der Nährlösung erreicht,  $REGR_{max}$  und  $V_{Spitze}$  sinken dabei wieder für etwa 20 Minuten auf 40 % des Ausgangswertes ab. In der folgenden ca. halbstündigen Erholungsphase erreicht  $REGR_{max}$  etwa 70 %,  $V_{Spitze}$  60 %. Anders als bei den Versuchen mit den Endkonzentrationen von 5 und 10 mM sinken  $REGR_{max}$  (auf 65 %) und  $V_{Spitze}$  (auf 50 %) etwa ein dreiviertel Stunde um im Anschluss ein Maximum bei 80 % ( $REGR_{max}$ ) bzw. 60 % ( $V_{Spitze}$ ) zu erreichen. Etwa vier Stunden nach der Nährstoffaddition beginnt ein langsames Absinken der  $REGR_{max}$  auf 50 % bzw. von  $V_{Spitze}$  auf 40 % des Ausgangswertes.

Auch bei dieser Nährlösungsvariation verändert sich die ‚Symmetrie‘ der REGR-Verteilung: Vor der Erhöhung der Nährstoffkonzentration lag die  $REGR_{max}$  in apikale Richtung relativ zum Mittelpunkt der Wachstumszone. Nach der Nährlösungsvariation rückt die  $REGR_{max}$ -Position näher an den Mittelpunkt heran bzw. liegt sogar etwas weiter basalwärts (Abb. 5.66).



**Abb. 5.63: Bidest auf 20 mM:** Dynamik von  $V_{Spitze}$  und  $REGR_{max}$  bei schneller Änderung der externen Nährstoffverfügbarkeit von 0 mM auf 20 mM Nährlösung. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Versuchsansätzen. (Die Skalen von  $REGR_{max}$  und  $V_{Spitze}$  sind so gewählt, dass sich die Datenpunkte möglichst wenig überlagern).

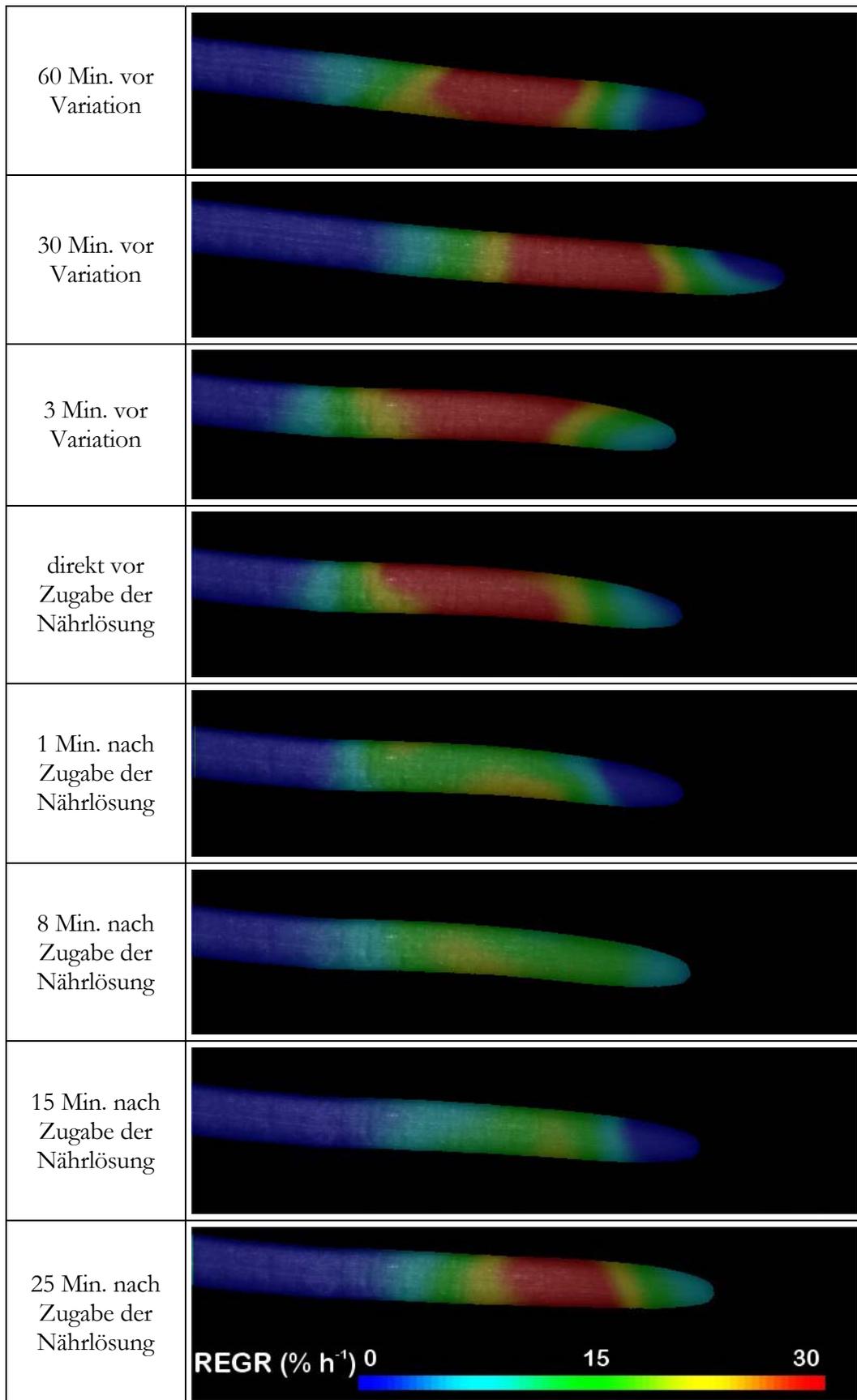
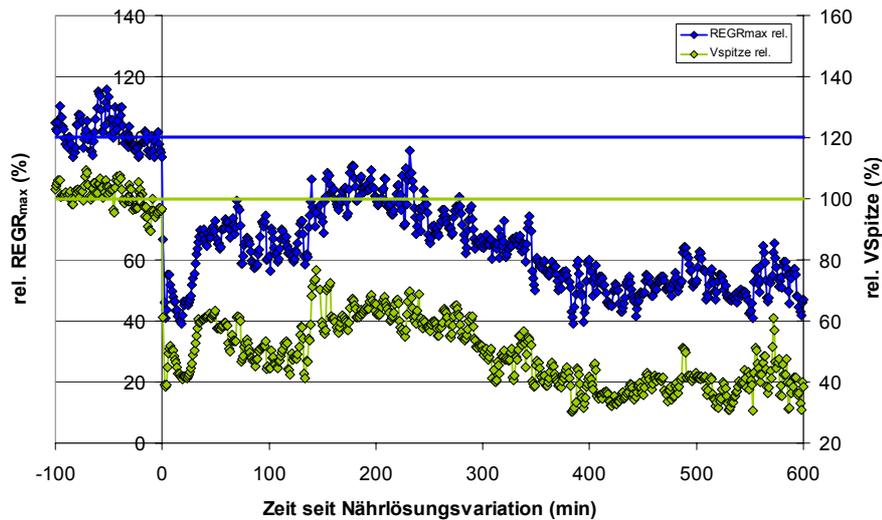
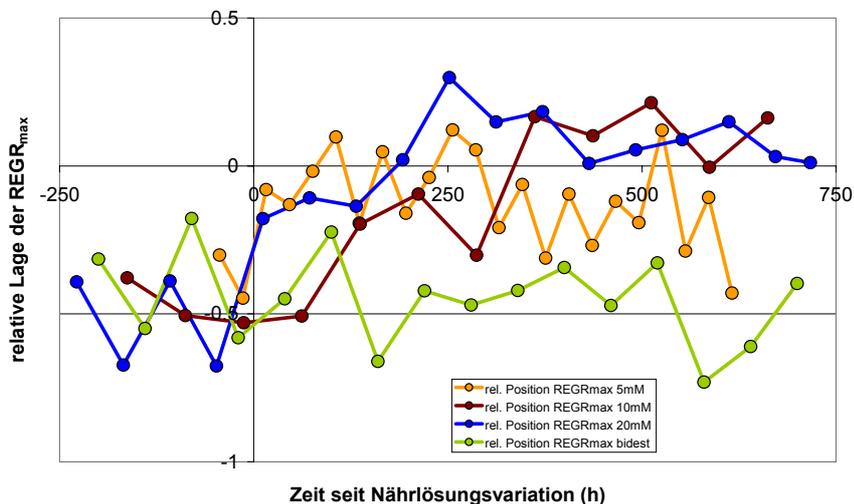


Abb. 5.64: **Farbkodierte Darstellung der REGR-Veränderungen** als transparentes Overlay auf den Originalbildern der Maiswurzel während Variation des Umgebungsmediums von **bidestilliertem Wasser auf 20 mM Nährlösung**.



**Abb. 5.65: Bidest auf 20 mM:** Dynamik der relativen  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Werte (relativ zum Durchschnitt vor der Nährlösungsvariation) bei schneller Änderung der externen Nährstoffverfügbarkeit von 0 mM auf 20 mM Nährlösung. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Versuchsansätzen. (Die Skalen von  $\text{REGR}_{\text{max}}$  und  $V_{\text{Spitze}}$  sind so gewählt, dass sich die Datenpunkte möglichst wenig überlagern, die blaue Linie markiert die 100%-Marke der relativen  $\text{REGR}$ -Werte, die grüne Linie die  $V_{\text{Spitze}}$ -100%-Marke).

Nach der Nährlösungsvariation verändert sich auch die relative Lage der  $\text{REGR}_{\text{max}}$ : Bei Wachstum in nährstofffreiem Medium ist die  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position relativ zum Mittelpunkt der Wachstumszone in apikale Richtung (negative Werte) verschoben. Nach Zugabe der Nährlösung rückt die relative  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position wie auch bei der Nährlösungsvariation von bidest auf 20 mM näher an den Mittelpunkt der Wachstumszone heran (Abb. 5.66).



**Abb. 5.66: Relative  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position bei raschen Nährlösungsvariationen** – je negativer der Relativwert, desto näher liegt die  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position an der Wurzelspitze. Die Daten für Anzucht in bidestilliertem Wasser (grün) sind als Referenz eingezeichnet, ohne dass eine Nährlösungsvariation durchgeführt wurde.

Die anderen Parameter  $\text{REGR}$ -Halbwertsbreite, Wachstumszonenlänge und Position der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  bleiben im Verlauf der Nährlösungsvariation im Gegensatz zu  $\text{REGR}_{\text{max}}$  und  $V_{\text{Spitze}}$

relativ konstant und nehmen langfristig ab, daher werden an dieser Stelle stellvertretend nur die Zeitverläufe bei der Variation von bidest auf 5 mM sowie von bidest auf 20 mM verglichen (Abb. 5.67, Abb. 5.68). Dabei ist zu erkennen, dass die langfristige Abnahme der Parameter bei Veränderung der Nährlösung von bidest auf 20 mM ausgeprägter ist.

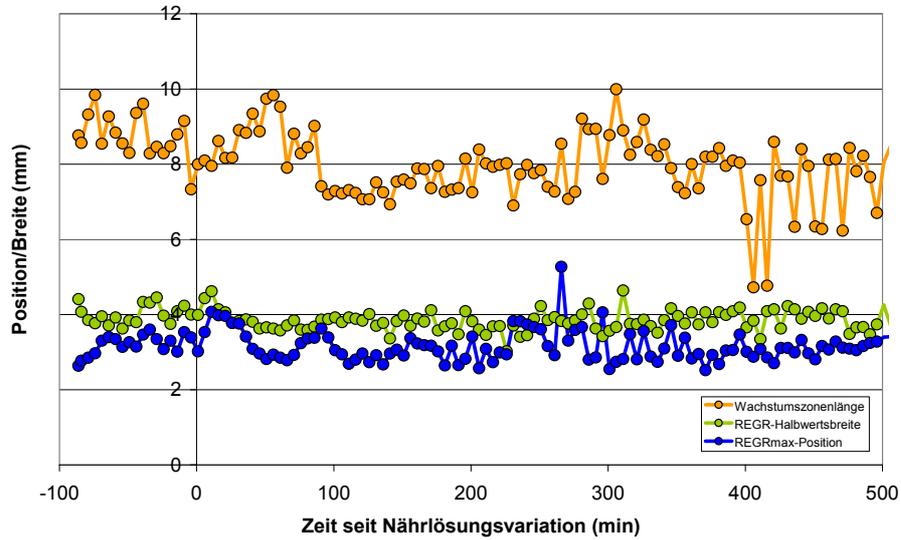


Abb. 5.67: Nährlösungsvariation von bidest auf 5 mM, Zeitverlauf der REGR-Halbwidth, REGR<sub>max</sub>-Position sowie der Wachstumszonenlänge (jeweils Mittelwerte über 5 Minuten).

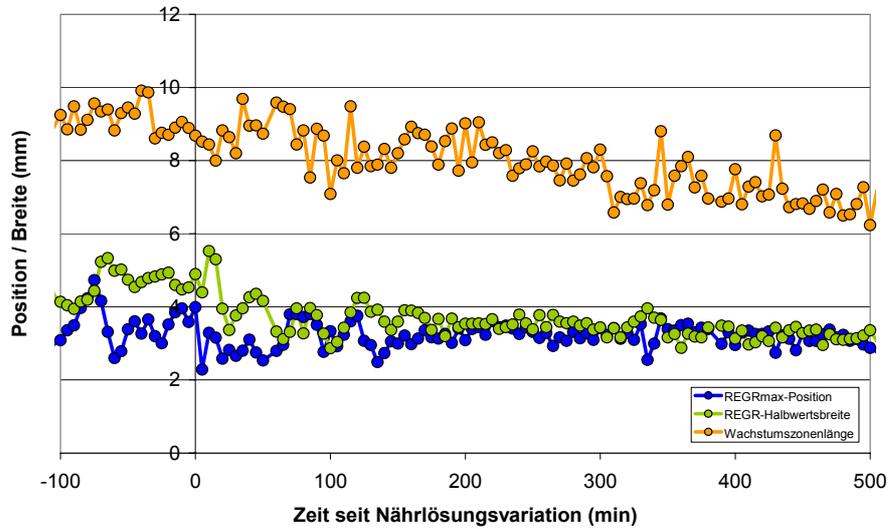
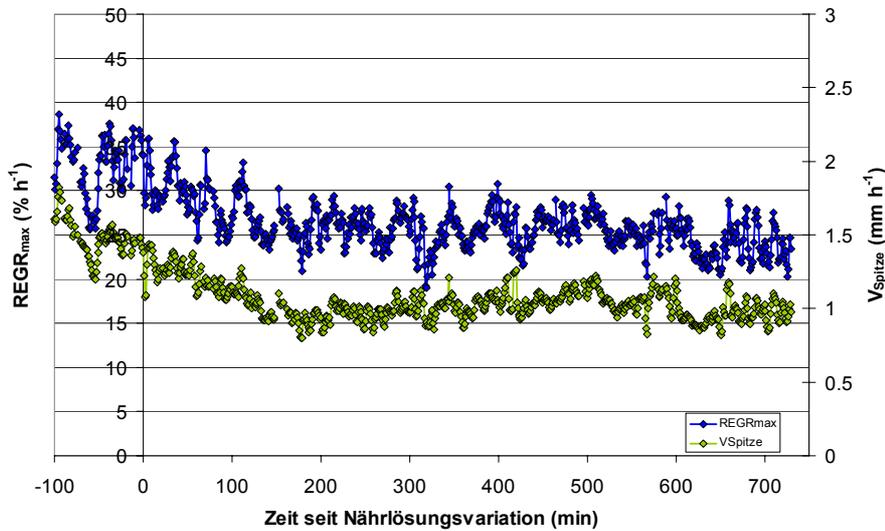


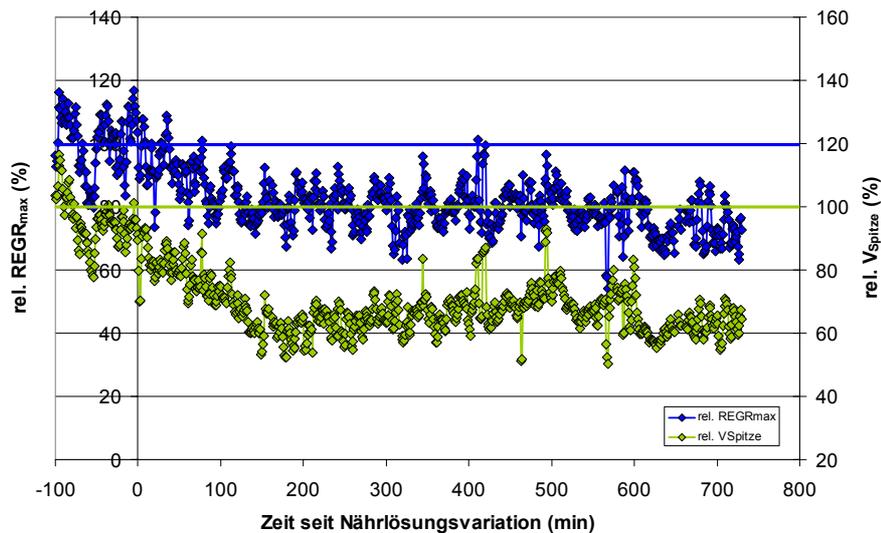
Abb. 5.68: Nährlösungsvariation von bidest auf 20 mM, Zeitverlauf der REGR-Halbwidth, REGR<sub>max</sub>-Position sowie der Wachstumszonenlänge (jeweils Mittelwerte über 5 Minuten).

### 5.2.1.4 5 mM → 10 mM

Die Reaktion der Maiswurzelspitze auf die Veränderung der Konzentration der umgebenden Nährlösung von 5 auf 10 mM unterscheidet sich deutlich von denen mit bidestilliertem Wasser als Ausgangsmedium.  $REGR_{max}$  und  $V_{Spitze}$  sinken direkt nach der Erhöhung der Nährlösungskonzentration in zwei Minuten zwar auch auf 89 % ( $REGR_{max}$ ) bzw. 70 % ( $V_{Spitze}$ ) des Ausgangswertes ab (Abb. 5.69, Abb. 5.70). Sofort nach Erreichen dieses Minimums steigen die Werte wieder fast auf den Ausgangswert (langer „Erholungspeak“). Im Folgenden sinken  $REGR_{max}$  und  $V_{Spitze}$  über zwei Stunden nahezu linear auf 80 % des Ausgangswertes im Falle der  $REGR_{max}$  und auf 60 % bei  $V_{Spitze}$ . Diese Werte werden für die nächsten Stunden relativ konstant gehalten.



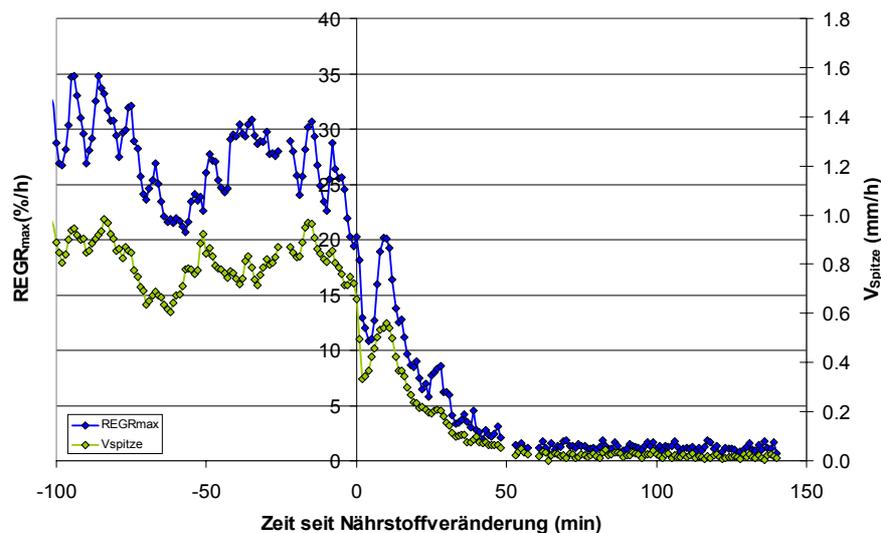
**Abb. 5.69: 5 auf 10 mM:** Dynamik von  $V_{Spitze}$  und  $REGR_{max}$  bei schneller Änderung der externen Nährstoffverfügbarkeit von 5 mM auf 10 mM Nährlösung. Dargestellt ist der Mittelwert aus 2 Versuchsansätzen.



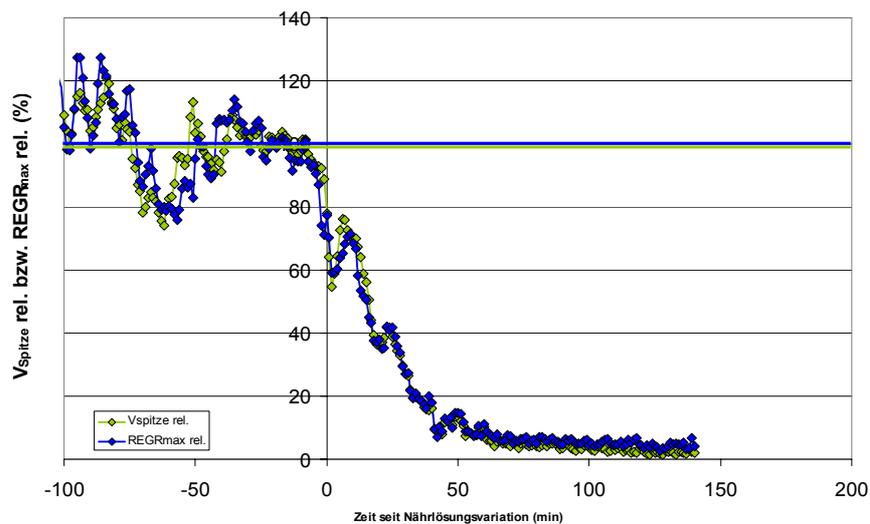
**Abb. 5.70: 5 auf 10 mM:** Dynamik der relativen  $V_{Spitze}$  und  $REGR_{max}$ -Werte (relativ zum Durchschnitt vor der Nährstoffvariation) bei rascher Änderung der externen Nährstoffverfügbarkeit von 5 mM auf 10 mM Nährlösung. Dargestellt ist der Mittelwert aus 2 Versuchsansätzen. Die blaue Linie markiert die 100%-Marke der relativen  $REGR$ -Werte, die grüne Linie die  $V_{Spitze}$ -100%-Marke.

### 5.2.1.5 bidest → Mannose

Um die dynamische Reaktion der Wurzelspitze auf die Zugabe von inhibierenden Substanzen zu untersuchen, wurde bei diesem Versuch statt 10 mM Nährlösung Mannose mit der gleichen Osmolarität (0,018 Osm.) eingesetzt. Von Mannose ist bekannt, dass sie von Hexokinase zu Mannose-6-Phosphat umgewandelt wird, dieses aber in der Maiswurzel nicht weiter metabolisiert wird und dadurch Phosphatmangel entstehen kann (Brouquisse et al. 2001). Daher soll in diesem Versuch untersucht werden, in welcher Dynamik sich induzierter Phosphatmangel auf die Wachstumsleistung der Wurzel auswirkt.



**Abb. 5.71: bidest auf 0,018 Osm. Mannose:** Dynamik von  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$  bei rascher Änderung der Durchflusslösung von bidest auf 0,018 Osm. Mannose ( $\sim$ Osmolarität von 10 mM Nährlösung). Dargestellt ist der Mittelwert aus 2 Versuchsansätzen.

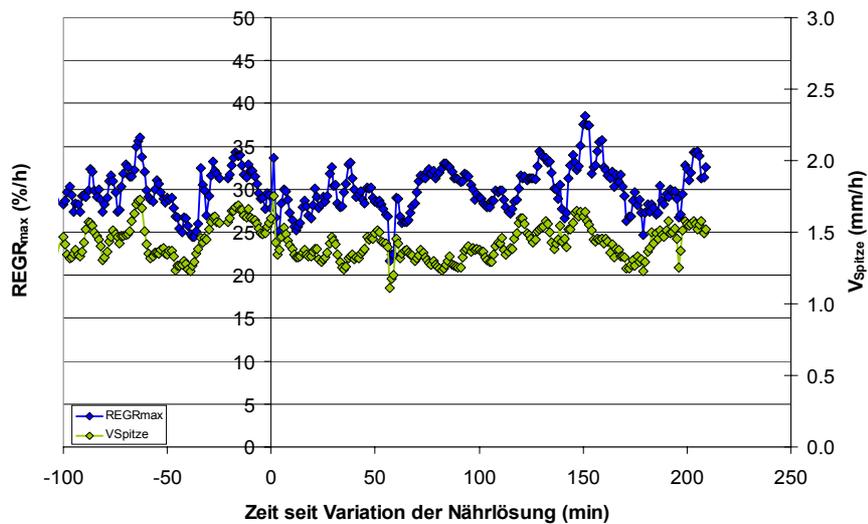


**Abb. 5.72: 0 mM auf 0,018 Osm Mannose:** Dynamik der relativen  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Werte (relativ zum Durchschnitt vor der Nährlösungsvariation) bei rascher Änderung der externen Nährstoffverfügbarkeit von 0 mM auf 0,018 Osm Mannose. Dargestellt ist der Mittelwert aus 2 Versuchsansätzen. Die blaue Linie markiert die 100%-Marke der relativen REGR-Werte, die grüne Linie die  $V_{\text{Spitze}}$ -100%-Marke.

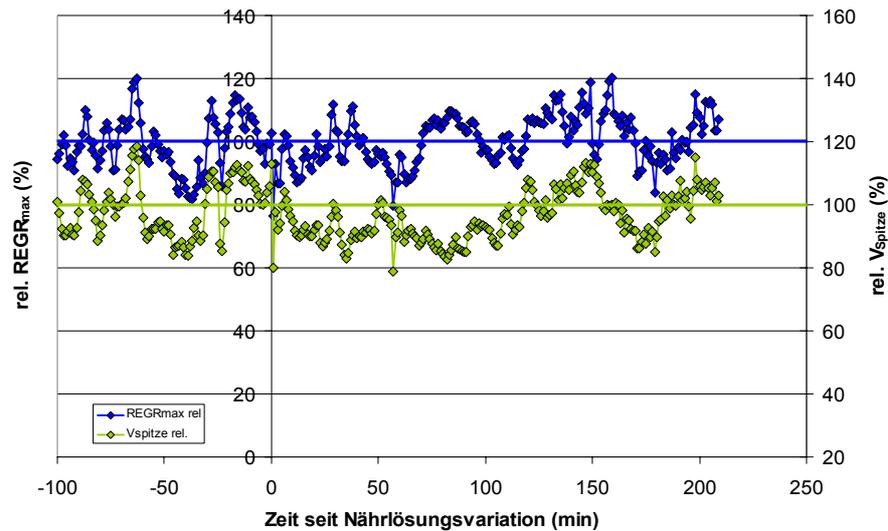
Nach Zugabe der Mannose zu bidestilliertem Wasser als Durchflussmedium auf insgesamt 0,018 Osm. sinken  $REGR_{max}$  und  $V_{Spitze}$  wie bei den oben beschriebenen Experimenten schnell ab (nach 5min  $REGR_{max}$ : 59 %;  $V_{Spitze}$ : 55 %). Auf dieses Minimum folgt ein längerer „Erholungspeak“ von 10 Minuten Dauer ( $REGR_{max}$ : 71 %;  $V_{Spitze}$ : 76 %). Eine Viertelstunde nach der Mannosezugabe fallen  $REGR_{max}$  und  $V_{Spitze}$  exponentiell bis die Wurzeln nach etwas mehr als zwei Stunden nicht mehr nennenswert zuwachsen.

### 5.2.1.6 bidest $\rightarrow$ PEG6000

Bei diesem Versuch wird die zu 10 mM Nährlösung äquivalente Osmolarität durch Zugabe der entsprechenden Konzentration von Polyethylenglykol (mittlere Molekülmasse 6000 g mol<sup>-1</sup>; PEG6000) erreicht. Die Erhöhung der Osmolarität von 0 auf 0,018 Osm. durch PEG6000 hat nahezu keinen Einfluss auf den Verlauf der  $REGR_{max}$  und  $V_{Spitze}$ -Werte (Abb. 5.73, Abb. 5.74). Nur direkt nach Zugabe der PEG6000-Lösung ist ein zweiminütiges Minimum mit einer Absenkung von  $REGR_{max}$  und  $V_{Spitze}$  um 20% (Abb. 5.74) zu erkennen.



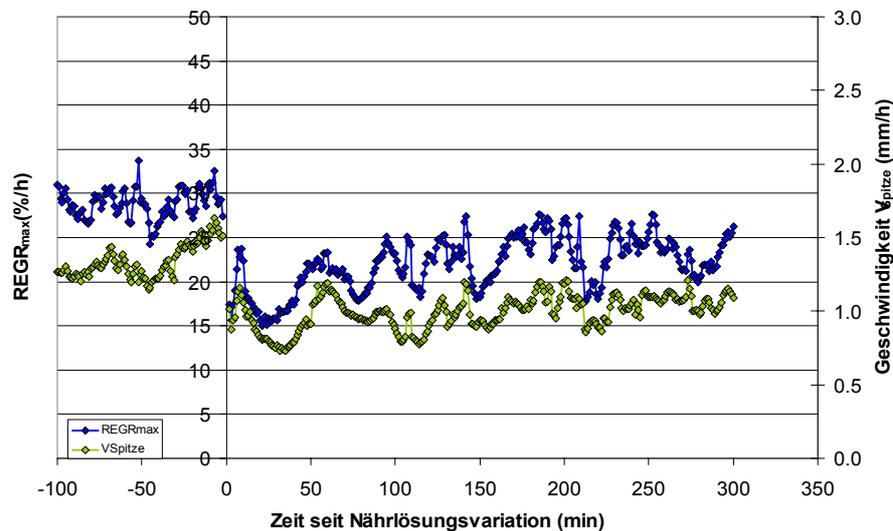
**Abb. 5.73: bidest auf 0.018 Osm PEG6000:** Dynamik von  $V_{Spitze}$  und  $REGR_{max}$  bei schneller Änderung der Durchflusslösung von bidest auf 0.018 Osm PEG6000 (~Osmolarität von 10 mM Nährlösung). Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Versuchsansätzen.



**Abb. 5.74: bidest auf 0.018 Osm PEG6000:** Dynamik der relativen  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Werte (relativ zum Durchschnitt vor der Nährlösungsvariation) bei rascher Änderung der externen Nährstoffverfügbarkeit von 0 mM auf 0,018 Osm PEG6000. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Versuchsansätzen. Die blaue Linie markiert die 100%-Marke der relativen REGR-Werte, die grüne Linie die  $V_{\text{Spitze}}$ -100%-Marke.

### 5.2.1.7 bidest $\rightarrow$ 10 mM Nährlösung + PEG6000

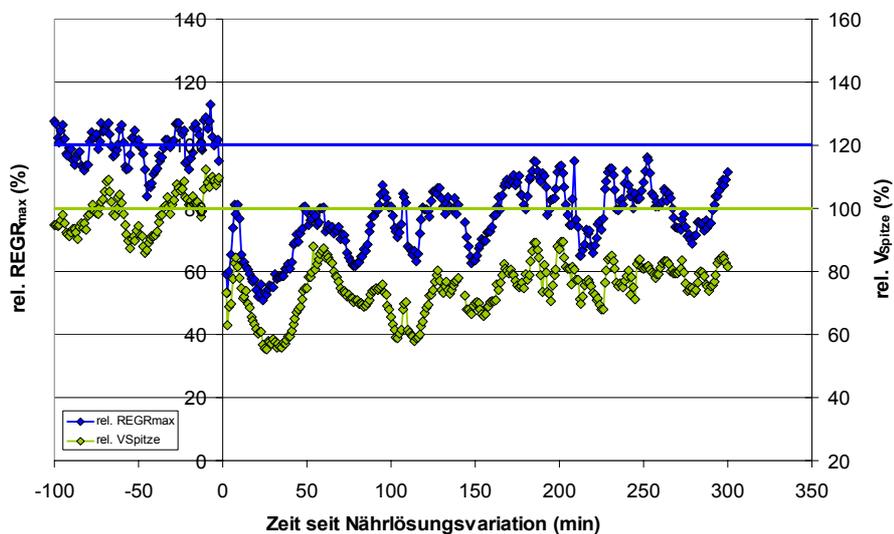
Auch bei diesem Versuch soll der Einfluss von Nährstoff- bzw. Osmotikakonzentration auf die Anpassungsreaktion der Wurzel auf veränderte Umweltbedingungen untersucht werden. Hierzu wird zu nährstofffreiem Ausgangsmedium eine Mischung aus Nährlösung (entspricht einer Endkonzentration von 10 mM) und PEG6000 hinzugefügt, um eine mit 20 mM Nährlösung vergleichbare Osmolarität zu erreichen.



**Abb. 5.75: bidest auf 10 mM Nährlsg + 0.018 Osm PEG6000:** Dynamik von  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$  bei schneller Änderung der Durchflusslösung von bidest auf 10 mM Nährlösung mit Zusatz von 0.018 Osm PEG6000 ( $\sim$ Gesamtosmolarität von 20 mM Nährlösung). Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Versuchsansätzen.

Bei der Variation der Nährlösung von 0 auf diese Mischung ist der Verlauf von  $\text{REGR}_{\text{max}}$  und  $V_{\text{Spitze}}$  eher mit den Werten des bidest  $\rightarrow$  10 mM Versuchs als mit dem bidest  $\rightarrow$  20 mM Versuch

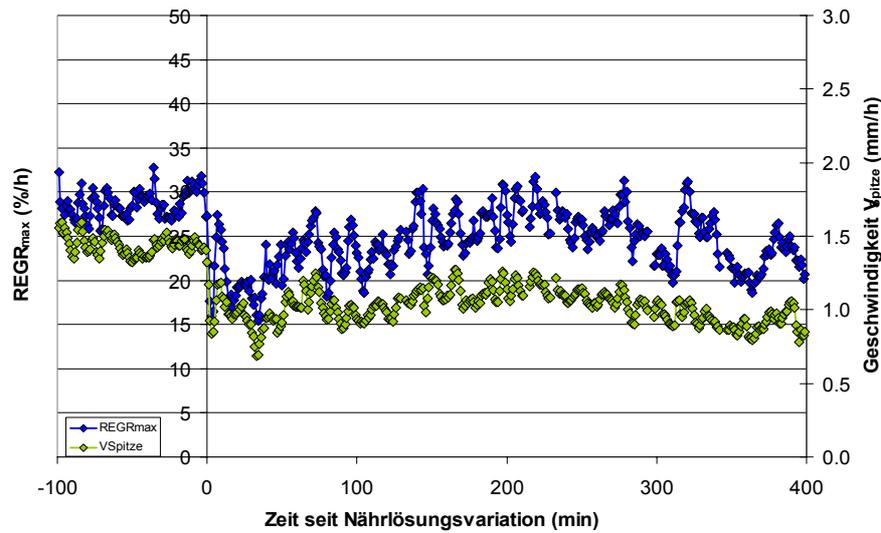
vergleichbar. Im Gegensatz zum  $\text{bidest} \rightarrow 10 \text{ mM}$  Versuch ist nach der schnellen Abnahme von  $\text{REGR}_{\text{max}}$  und  $V_{\text{Spitze}}$  ein deutlicher „Erholungspeak“ zu erkennen. Das anschließende Minimum ( $\text{REGR}_{\text{max}}$  50 % und  $V_{\text{Spitze}}$  55 % des Ausgangswertes) und die darauf erreichten Plateauwerte ( $\text{REGR}_{\text{max}}$  75 % und  $V_{\text{Spitze}}$  75 % des Ausgangswertes) entsprechen den Werten bei dem  $\text{bidest} \rightarrow 10 \text{ mM}$  Versuch relativ gut.



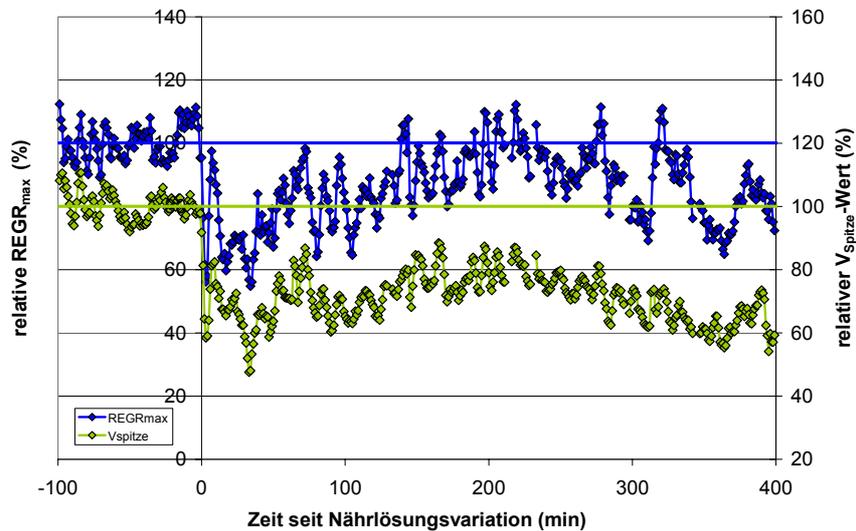
**Abb. 5.76:  $\text{bidest}$  auf 10 mM Nährlsg + 0.018 Osm PEG6000:** Dynamik der relativen  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Werte (relativ zum Durchschnitt vor der Nährlösungsvariation) bei schneller Änderung der externen Nährstoffverfügbarkeit von 0 mM auf 10 mM Nährlösung mit Zusatz von 0.018 Osm PEG6000 (~Gesamtosmolarität von 20 mM Nährlösung). Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Versuchsansätzen. Die blaue Linie markiert die 100%-Marke der relativen REGR-Werte, die grüne Linie die  $V_{\text{Spitze}}$ -100%-Marke.

### 5.2.1.8 $\text{bidest} \rightarrow \text{stickstoffreduzierte Nährlösung}$

In diesem Versuch soll der Einfluss von Nitrat auf die Anpassungsreaktion der Wurzel untersucht werden. Zu diesem Zweck wird stickstoffreduzierte Nährlösung verwendet, die der 10 mM Nährlösung bis auf Ammoniumnitrat und Kaliumnitrat entspricht (Kap. 4.2). Die dadurch verringerte Osmolarität wird durch PEG6000 ausgeglichen. Direkt nach Zugabe dieser Nährlösungsmischung ist ein schneller Abfall der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  und  $V_{\text{Spitze}}$ -Werte auf 60 % der Ausgangswerte zu beobachten (Abb. 5.77, Abb. 5.78). Auf dieses kurze Minimum folgt direkt ein „Erholungspeak“ ( $\text{REGR}_{\text{max}}$  95 %;  $V_{\text{Spitze}}$  80 %). Das anschließende Minimum ist weniger ausgeprägt als in den  $\text{bidest} \rightarrow 5, 10$  bzw. 20 mM Versuchen ( $\text{REGR}_{\text{max}}$  55 %;  $V_{\text{Spitze}}$  55 %). Nachfolgend erreicht die  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Rate nahezu den Ausgangswert, die  $V_{\text{Spitze}}$ -Werte steigen wieder auf 80 % (vergleichbar zum  $\text{bidest} \rightarrow 5 \text{ mM}$  Versuch).



**Abb. 5.77: bidest auf stickstoffreduzierte Nährlösung:** Dynamik von  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$  bei rascher Änderung der Durchflusslösung von bidest auf stickstoffreduzierte Nährlösung ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  und  $\text{KNO}_3$  durch PEG6000 gleicher Osmolarität ersetzt). Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Versuchsansätzen.



**Abb. 5.78: bidest auf stickstoffreduzierte Nährlösung:** Dynamik der relativen  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Werte (relativ zum Durchschnittswert vor der Nährlösungsvariation) bei schneller Änderung der Durchflusslösung von bidest auf stickstoffreduzierte Nährlösung ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  und  $\text{KNO}_3$  durch PEG6000 gleicher Osmolarität ersetzt). Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Versuchsansätzen. Die Skalen sind leicht gegeneinander versetzt, zur einfacheren Ablesbarkeit der Werte. Die blaue Linie markiert die 100%-Marke der relativen REGR-Werte, die grüne Linie die  $V_{\text{Spitze}}$ -100%-Marke.

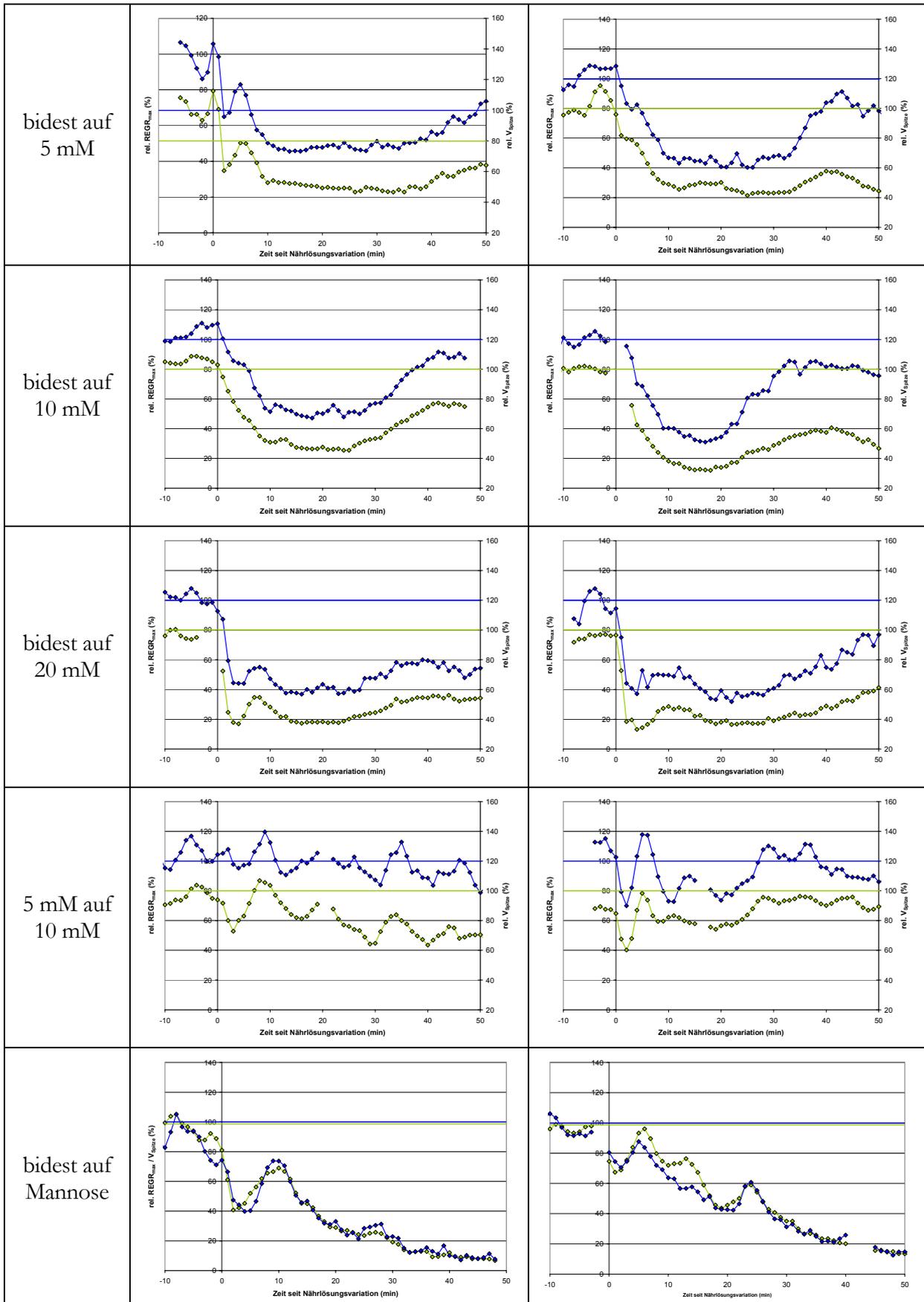


Abb. 5.79: Zusammenstellung der unmittelbaren Veränderungen der Wachstumseigenschaften auf Nährungsvariation, Teil 1: bidest auf 5, 10 bzw. 20 mM, 5 auf 10 mM und bidest auf Mannose (0,018 Osm).

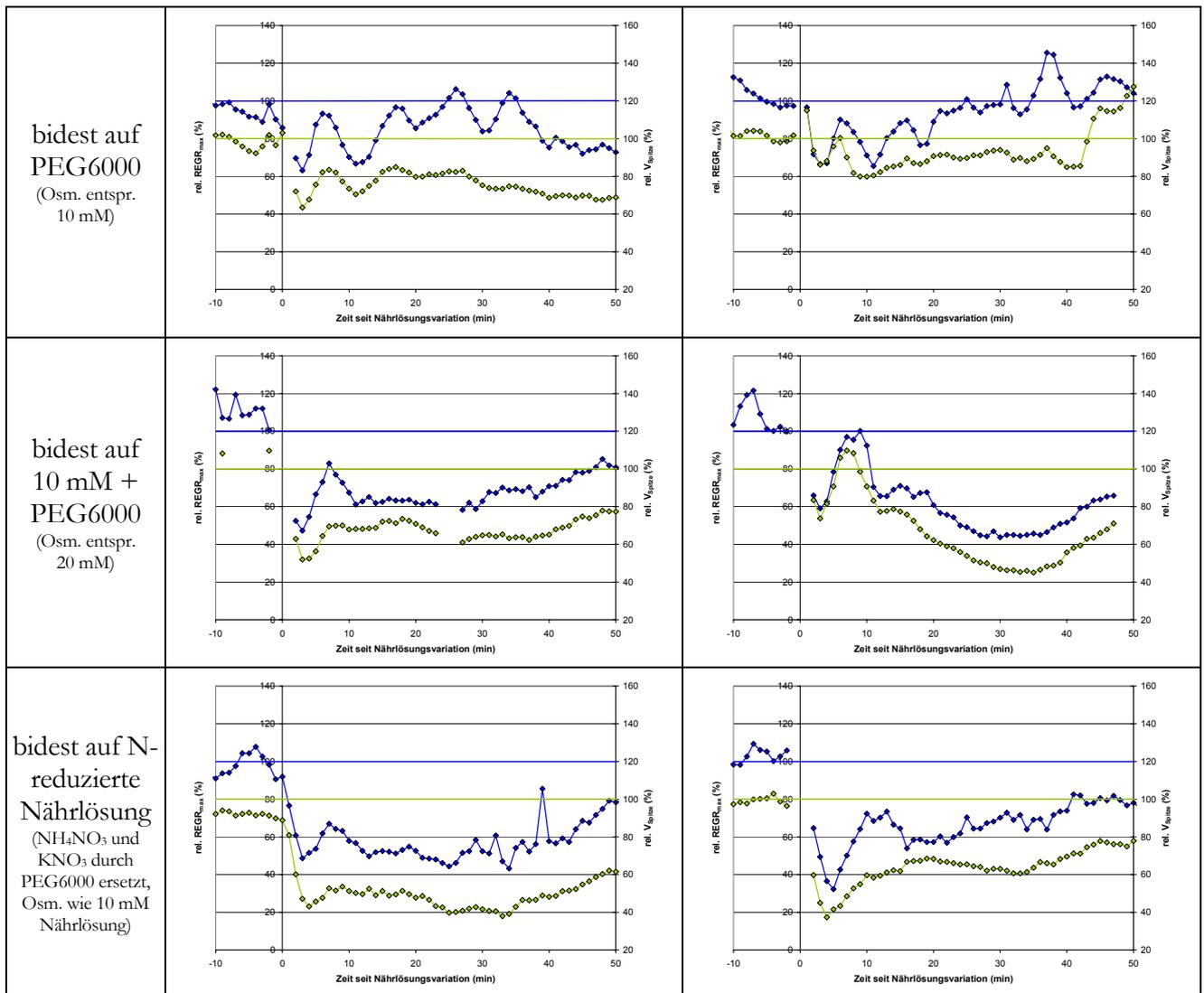


Abb. 5.80: Zusammenstellung der unmittelbaren Veränderungen der Wachstumseigenschaften auf Nährungsvariation, Teil 2: bidest auf PEG6000 (0,018 Osm), 10 mM mit Zusatz von PEG6000 (entspricht Osmolarität von 20 mM Nährlösung), bzw. auf N-reduzierte Nährlösung (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> und KNO<sub>3</sub> von '10 mM Nährlösung' sind durch PEG6000 gleicher Osmolarität ersetzt).

## 5.3 Zellteilungsdynamik unter konstanten Bedingungen

### 5.3.1 *Arabidopsis* – konstante Nährlösungskonzentration

*Arabidopsis*-Pflanzen mit dem CycB1;1-Konstrukt wurden jeweils bei konstant 2,5 und 10 mM Nährlösung angezogen und mit 4D-Timelapse Aufnahmen mit dem CLSM auf die Dynamik der CycB1;1-GFP-Expression und damit auf die Zellteilungsaktivität untersucht (Abb. 5.83, Abb. 5.84). Die hiermit gewonnenen Daten werden mit der in Kapitel 4.4 beschriebenen Auswertung verarbeitet (Abb. 5.81).

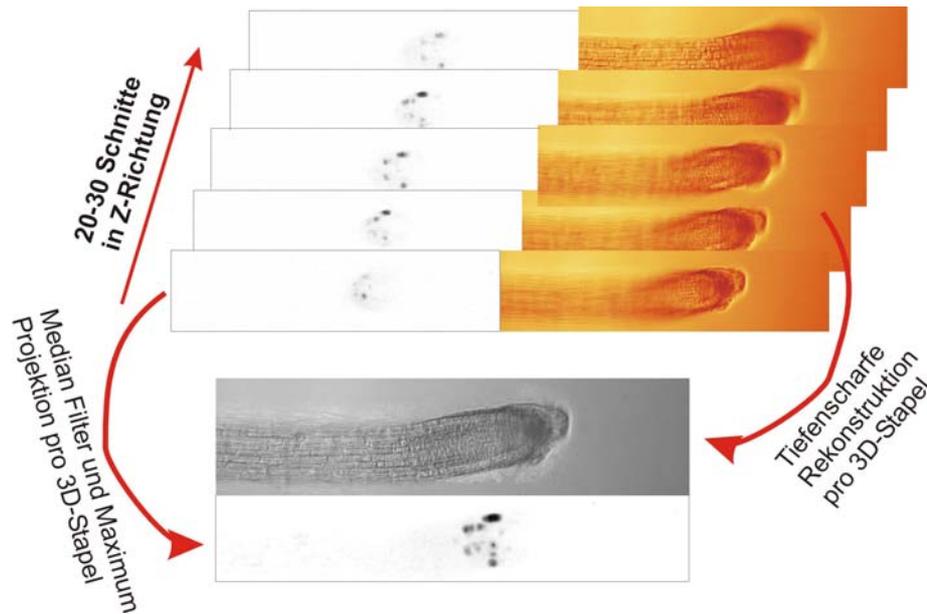


Abb. 5.81: Verarbeitung der dreidimensional aufgenommenen Bilderstapel mit den in Kap. 4.4.3 Methoden zu tiefenscharfen bzw. Maximumprojektionen verarbeitet werden (Fluoreszenzbilder invertiert).

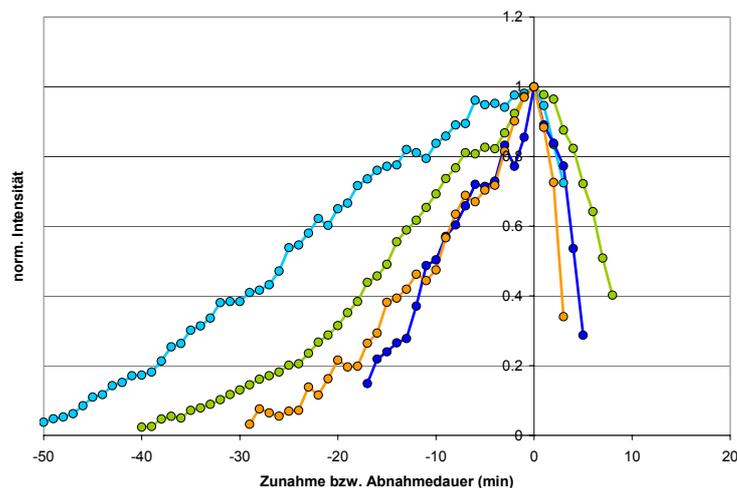
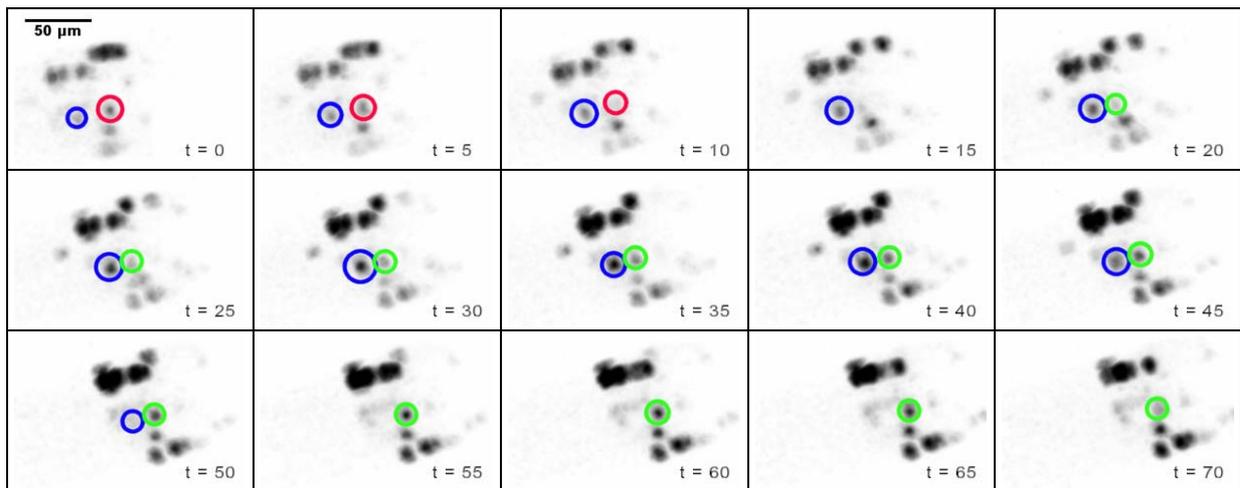


Abb. 5.82: Akkumulations- und Abnahmekinetiken der CycB1;1-GFP-Fluoreszenz von beispielhaft ausgewählten Zellen in den *Arabidopsis*-CycB1;1-GFP-Transformanten.

Dabei werden Daten der einzelnen CycB1;1-GFP-Spots in einer geordneten Liste (Zeitpunkt, Koordinaten und Gesamtintensität) ausgegeben. Daraus lässt sich nicht nur die Anzahl der zu

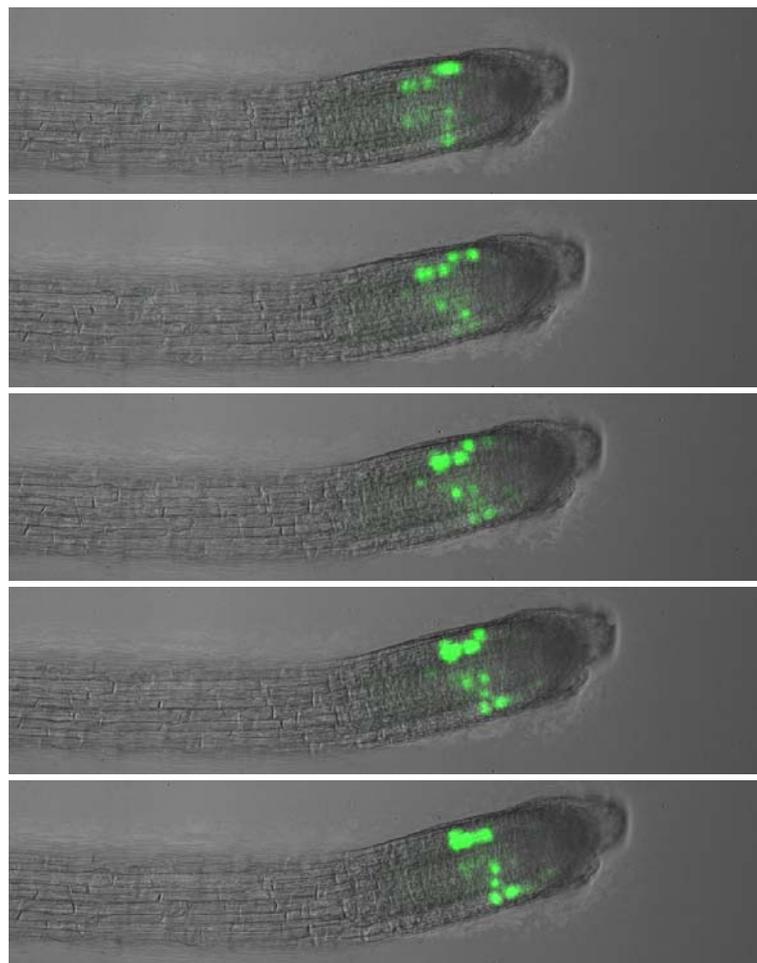
dem entsprechenden Zeitpunkt aktiven Zellen, sondern auch andere Parameter, wie z.B. die Akkumulations- bzw. Abbaudauer herleiten.



**Abb. 5.83: Montage von Maximumprojektionen der CycB1;1-GFP-Fluoreszenz einer 4D-Timelapse-Sequenz** (Ausschnittsvergrößerung, invertiert). Der Abstand zwischen den Bildern beträgt jeweils 5 Minuten. Drei verschiedene Zellen während ihrer CycB1;1-Aktivität durch einen farbigen Kreis markiert.

Die **Akkumulations- und Abbaudauer** der CycB1;1-GFP-Fluoreszenz (und damit vermutlich auch von CyclinB1;1) unterscheidet sich zwischen verschiedenen Zellen (Abb. 5.82). Die Ver-

ringerung der detektierten Fluoreszenz und damit vermutlich auch der Abbau des CycB1;1-GFP-Konstruktes ist deutlich schneller als die Akkumulation (Abb. 5.83, Abb. 5.85). Die Verteilung der Abbaudauern hat ein Maximum zwischen sechs und zehn Minuten (Mittelwert  $12 \pm 14$  Minuten). Die Verteilung der Akkumulation weist kein offensichtliches Maximum auf, überwiegend liegt die CycB1;1-GFP Akkumulationsdauer zwischen 11 und 35 Minuten (Mittelwert  $32 \pm 22$  Minuten). Auch die Gesamtdauer, in der CycB1;1-GFP in den Zellen detektiert wird, hat



**Abb. 5.84: Serie von Overlay-Bildern** (Abstand 10 Min.) aus den Bildstapeln für jeden Zeitpunkt in tiefscharfe bzw. Maximums-Projektionen zusammengefasst.

kein klares Maximum. Bei der Mehrzahl der Zellen beträgt die Gesamtdauer zwischen 16 und 45 Minuten (Mittelwert  $44 \pm 26$  Minuten).

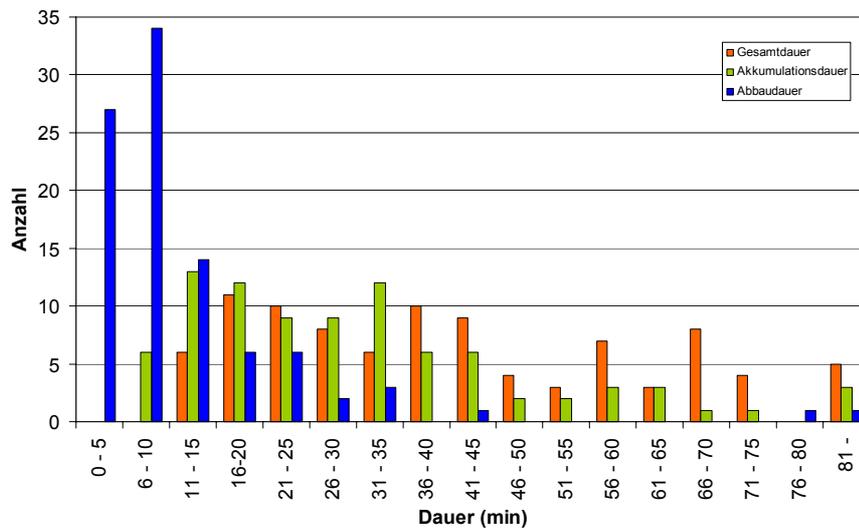


Abb. 5.85: Verteilung der Akkumulations-, Abnahme- und Gesamtaktivitätsdauer der CycB1;1-GFP-Expression.

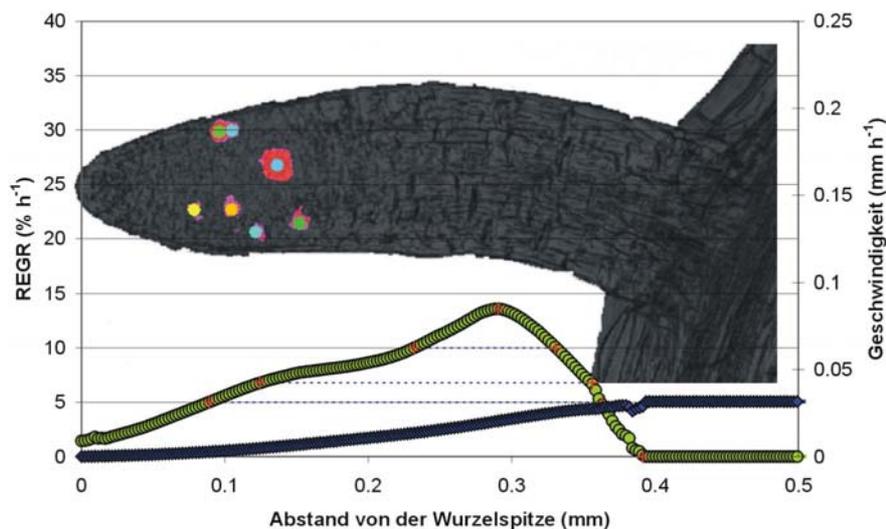
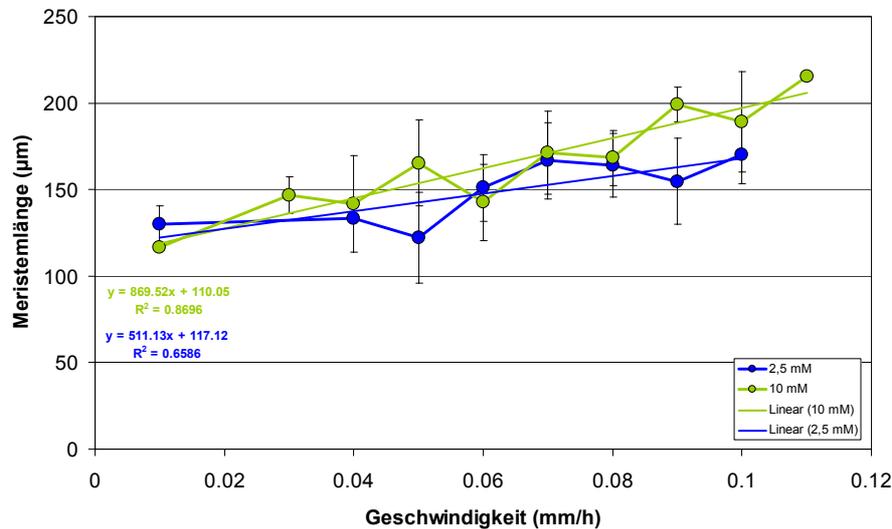


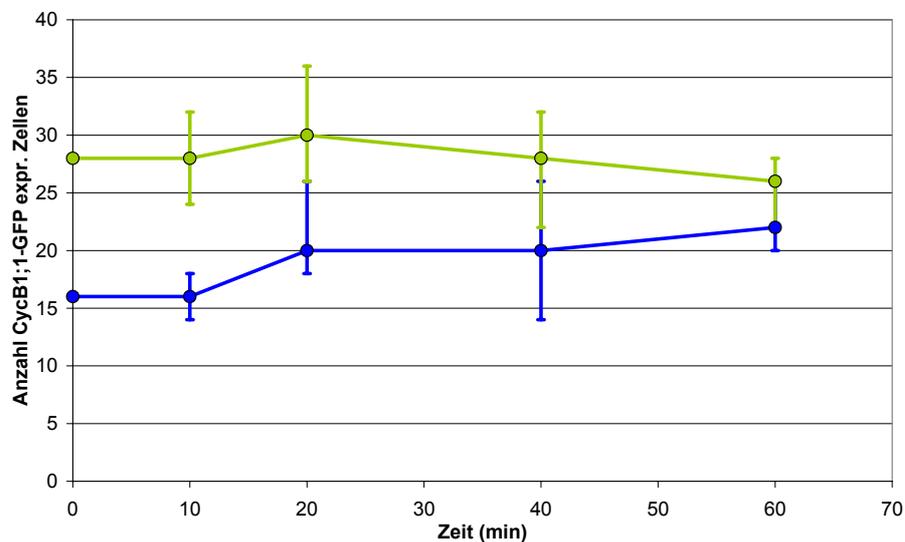
Abb. 5.86: Gleichzeitige Auswertung der Zellteilungsaktivität und Zellstreckungsrate: Das Wachstumsprofil wurde mit der DISP-Methode berechnet und ein Overlay-Bild wurde mit dem Programm ‚Visubild‘ aus Transmissionbild (dunkelgrau), GFP-Fluoreszenz (rot) und getrackten ‚Spots‘ (z-Ebene farbkodiert: blau außen bis orange weiter innen, etwa in der Wurzelmitte) erzeugt und in der richtigen Skalierung als Hintergrund verwendet.

Prinzipiell lässt sich die **DISP-Methode** mit der Analyse der Zellteilungsaktivität der CYCB1;1-GFP-Pflanzen kombinieren (Abb. 5.86). Allerdings führt die ungeordnete Bewegung der Zellorganellen zu fehlerhaften Wuchsraten-Berechnung der DISP-Methode. Diese Fehler werden noch durch das relativ hohe Rauschen von Laser und Photomultiplier verstärkt, so dass DISP-Auswertungen nur auf wenigen Sequenzen möglich waren.

Die **Länge des Meristems** ist bei den CycB1;1-GFP Transformanten linear abhängig von  $V_{\text{Spitze}}$  (Abb. 5.87). Dabei ist die Steigung bei Anzucht mit 10 mM ( $870 \mu\text{m}/\text{mm h}^{-1}$ ;  $R^2 = 0,87$ ) größer als bei 2,5 mM Nährlösung ( $510 \mu\text{m}/\text{mm h}^{-1}$ ;  $R^2 = 0,66$ ). Beide Fitlinien haben einen Y-Achsenabschnitt bei  $110 \mu\text{m}$ . Bei Anzucht mit 10 mM ist das Meristem im untersuchten Geschwindigkeitsbereich häufig länger als bei Kultivierung in 2,5 mM.



**Abb. 5.87: Abhängigkeit der Meristemlänge von  $V_{\text{Spitze}}$**  (hier definiert als der Abstand der am weitesten vom ruhenden Zentrum entfernten CycB1;1-GFP exprimierenden Zelle) der *Arabidopsis* CycB1;1-Pflanzen bei Anzucht in 2,5 und 10 mM Nährlösung.



**Abb. 5.88: CycB1;1-GFP-Aktivität von zwei einzelnen Individuen**, bei Anzucht in 10 mM. Die Anzahl der aktiven Zellen bleibt relativ konstant. Die Zu- bzw. Abnahme an CycB1;1-GFP-aktiven Zellen wird durch die Balkengröße dargestellt: der obere Wert steht für die Anzahl neu aktiver Zellen, der untere Balken für die Anzahl der Zellen, die keine CycB1;1-Fluoreszenz mehr aufweisen.

Die **Anzahl der CycB1;1-GFP exprimierenden Zellen** liegt bei beiden Bedingungen im Durchschnitt bei 25-26 Zellen pro Wurzelspitze (Abb. 5.89). Die Anzahl variiert in beiden Fällen zwischen den einzelnen Pflanzen stark und hängt im untersuchten Geschwindigkeitsbereich linear (254 Zellen/mm h<sup>-1</sup> Steigung bei beiden Bedingungen, R<sup>2</sup> = 0,81 bzw. 0,56) von V<sub>Spitze</sub> ab (Abb. 5.90). Die CycB1;1-GFP-Aktivität auf der Ebene der einzelnen untersuchten Pflanzen ist ebenfalls relativ konstant. Kleinere Schwankungen beruhen auf nicht synchronisierter Aktivierung bzw. Abbau des CycB1;1-GFP-Konstrukts in den verschiedenen Zellen (Abb. 5.88).

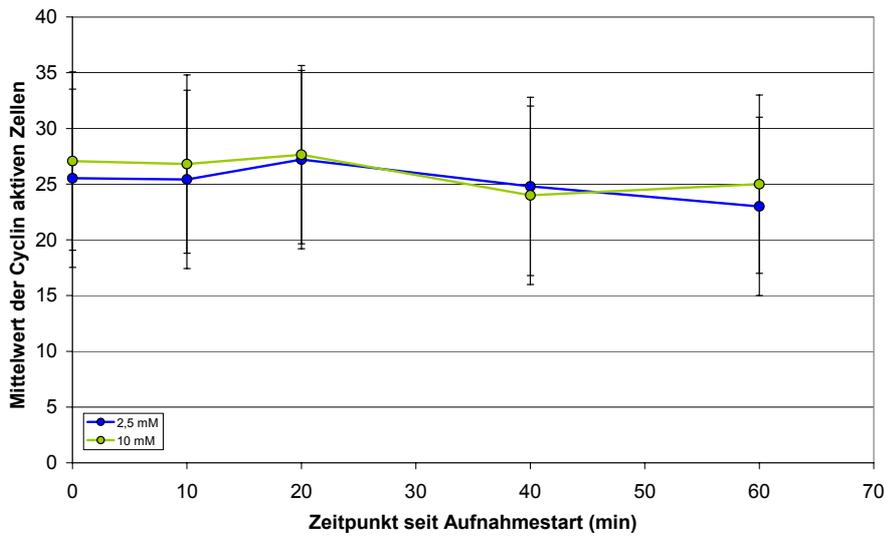


Abb. 5.89: Mittelwert der Anzahl CycB1;1-GFP exprimierender Zellen von *Arabidopsis* CycB1;1-Pflanzen bei Anzucht mit 2,5 bzw. 10 mM Nährlösung.

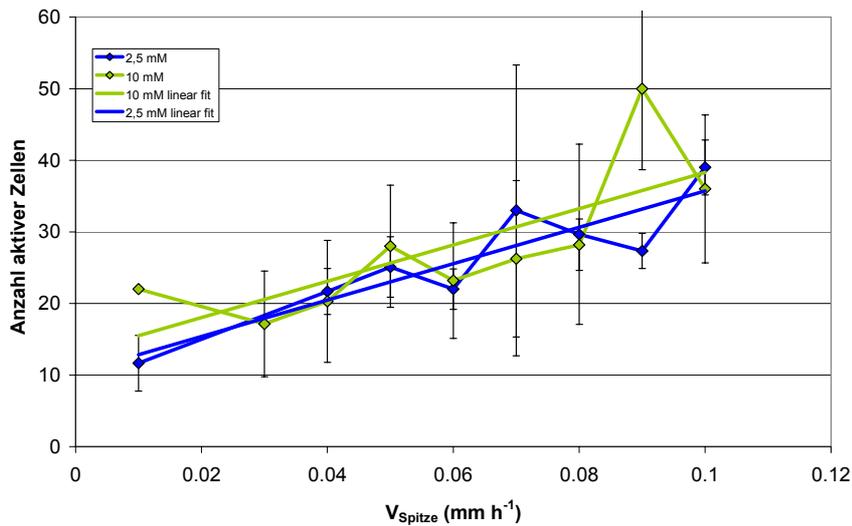


Abb. 5.90: Anzahl CycB1;1-GFP exprimierender Zellen aufgetragen gegen V<sub>Spitze</sub> in *Arabidopsis* CycB1;1-GFP-Pflanzen bei Anzucht in 2,5 bzw. 10 mM Nährlösung.

## 5.4 Zellteilungsdynamik bei Variation von Außenbedingungen

### 5.4.1 *Arabidopsis* - Nährlösungsvariation

Nach der Aufnahme mindestens einer 4D-Timelapse Serie unter konstanten Bedingungen (siehe Kap. 5.3.1) zur Bestimmung des Ausgangszustandes der betrachteten Wurzel, wird die umgebende Nährlösungskonzentration von 2,5 auf 10 mM bzw. von 10 auf 2,5 mM verändert und es werden weitere 4D-Timelapse Akquisitionen durchgeführt. Anschließend kann der Einfluss der veränderten Nährlösungskonzentration auf die Anzahl der CycB1;1-GFP exprimierenden Zellen untersucht werden (Abb. 5.91). Wie bei konstanten Nährlösungsverhältnissen (s.o.) ist die Varianz zwischen den einzelnen Pflanzen sehr groß. Bei der Nährlösungsvariation von 2,5 auf 10 mM bleibt die Zahl der CycB1;1-GFP enthaltenden Zellen 40 Minuten lang auf dem Ausgangswert, nimmt dann bis auf 130 Minuten nach der Variation auf durchschnittlich 12 Zellen ab. Anschließend steigt die Zahl der aktiven Zellen wieder leicht an. Bei der Variation der Nährlösungskonzentration von 10 auf 2,5 mM sinkt die Zahl der fluoreszierenden Zellen direkt nach Verringerung der Konzentration im Rahmen der Standardabweichung leicht ab. Nach 40 Minuten steigt die Anzahl wieder auf den Ausgangswert von 20 Zellen an.

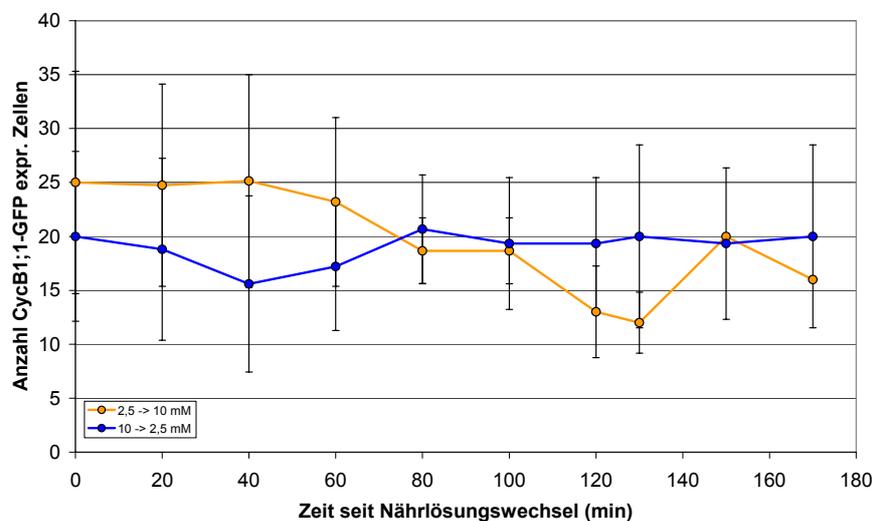


Abb. 5.91: Anzahl der CycB1;1-GFP-exprimierenden Zellen bei Nährlösungsvariation in den *Arabidopsis*-Transformanten von 2,5 auf 10 mM bzw. von 10 auf 2,5 mM.

## 6 Diskussion

Obwohl Pflanzenwachstum dynamisch auf Änderungen von internen und externen Stellgrößen durch raum-zeitliche Variation der Wachstumsparameter angepasst wird, wurde das Wurzelwachstum bisher hauptsächlich entweder räumlich („steady state“) oder zeitlich (z.B. nur Spitzengeschwindigkeit mit LVDTs) analysiert. Um Wurzelwachstum mit den hochdynamischen molekularen und biochemischen Mechanismen, die die Grundlage für das Wachstum bilden, korrelieren zu können, ist jedoch eine hohe raum-zeitliche Auflösung notwendig.

Pflanzenwachstum beruht auf einem Zusammenspiel zwischen Zellstreckung und Zellteilung. Streng genommen trägt Zellteilung zwar nicht zum Zuwachs bei, da ‚lediglich‘ die DNA repliziert und auf zwei Tochterzellen verteilt wird, die im Anschluß an die Zellteilung bis zur nächsten Mitose wieder etwa auf die Ausgangsgröße der Mutterzelle zuwachsen. Die Vervielfältigung von Zellen ist aber die Grundlage für Wachstumsprozesse, weil die Zellgröße bei den meisten Organismen nur bis zu einem art- und gewebespezifischen maximalen Volumen anwachsen kann (Neufeld & Edgar 1998). Besonders deutlich ist dieser Zusammenhang in der Wachstumszone von Wurzelspitzen zu erkennen. Denn die lineare Organisation des Wachstums in einen Meristembereich und die anschließende Streckungszone trennt die Prozesse der Zellteilung und Zellstreckung weitgehend: Zellteilungen in der Wurzelspitze sind auf das Meristem beschränkt. Zellstreckung findet hauptsächlich in der Streckungszone statt, im Meristem dient sie fast ausschließlich dem Ausgleich des verringerten Volumens nach der Mitose (die Zellen brauchen eine Mindestgröße für die Teilung; Strasburger 1998). Die gemessenen  $REGR_{TIP}$ -Werte liegen meist zwischen 3 und 6 %  $h^{-1}$  und korrelieren gut mit typischen Zellzyklusdauern in Wurzeln: Eine Zelle verdoppelt Ihre Länge bei einer  $REGR$  von 3 %  $h^{-1}$  in etwa 24 Stunden, dies liegt im Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte (Tabelle 6-1).

**Tabelle 6-1: Übersicht über in der Literatur beschriebene Zellzyklusdauer im Wurzelmeristem bei verschiedenen Arten**

Art	Zellzyklusdauer im Wurzelmeristem (h)	Quelle
<i>Arabidopsis thaliana</i>	18,6 ± 0,7	Beemster & Baskin 1998
	20-25	Baskin et al. 1995, Fujie et al. 1993
	von 19 bei Ecotype Tsu-1 bis 48 bei Ecotype NW108	Beemster et al. 2002
<i>Zea mays</i>	7,4 bis 11,3	Sacks et al. 1997
<i>Lycopersicon esculentum</i>	21 bis 22	Barlow et al. 1991
<i>Allium cepa</i>	10°C: 63h, 15°C: 33h, 25°C: 14h	Carmona & Cuadrado 1986

Im Rahmen dieser Arbeit konnten raum-zeitlich hochaufgelöste Wachstumsprofile von Primärwurzeln sowohl unter konstanten als auch unter variierten Umweltbedingungen kartiert werden. Diese Daten zur Zellstreckung werden in Kapitel 6.2 diskutiert im Hinblick auf:

- Nährstoffabhängigkeit der Primärwurzel-Wachstumsleistung unter konstanten Bedingungen (Kap. 6.2.1)
- Invarianten des Wurzelwachstums bei vier verschiedenen Arten (Kap. 6.2.2)
- Untersuchung auf diurnale Rhythmen des Wurzelwachstums (Kap. 6.2.3)
- Einfluss veränderter Genaktivität auf das Streckungswachstum (Kap. 6.2.4)
- Dynamische Anpassung an variierte Umweltbedingungen (Kap. 6.2.5)

Zellstreckung kann nur stattfinden, wenn dafür ausreichend neue Zellen im Meristem gebildet werden. Die Dynamik des G2/M-Übergangs (Einleitung der Mitose) konnte durch ein innovatives labiles Reporter-gen-Konstrukt (CycB1;1-GFP; P. Dörner, Edinburgh) *in vivo* ohne Applikation externer Farbstoffe mit dem CLSM visualisiert werden. Die Diskussion der Dynamik der Zellteilungsaktivität bei konstanten und variierten Umweltbedingungen erfolgt in Kapitel 6.3.

Schließlich sollen in Kapitel 6.4 mögliche Mechanismen zur Wachstumsregulation auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unter Berücksichtigung von publizierten Ergebnissen und Hypothesen aufgezeigt werden.

Weil die Weiterentwicklung der verwendeten Analysetechniken ein wichtiger Schritt für die Gewinnung der vorgestellten Ergebnisse ist, werden zu Beginn die verwendeten Untersuchungsverfahren mit Methoden aus der Literatur verglichen (siehe Kap. 6.1).

## 6.1 Vergleichende Betrachtung von Wachstumsanalysetechniken

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die **Optimierung** der eingesetzten bildsequenzbasierten **DISP-Methode** (Digital Image Sequencing Processing) zur detailgetreuen Analyse des Streckungswachstums von Wurzeln. Die Auflösung wurde beispielsweise gesteigert, so dass z.B. auch die kleinen Wurzeln von *Arabidopsis* (Durchmesser  $\sim 0,1$  mm) analysiert werden können. Dieses Verfahren ermöglicht sowohl die Untersuchung unter konstanten Bedingungen (Kap. 5.1) als auch bei schnellen Veränderungen der Umgebungsbedingungen (Kap. 5.2).

Ein weiterer Schwerpunkt war der Einsatz eines labilen Reporter-gen-Konstruktes (*Arabidopsis* CycB1;1-GFP), um die Zellteilungsaktivität nichtdestruktiv *in vivo* zu untersuchen (Kap. 6.1.2).

### 6.1.1 *DISP-Methode*

Die DISP-Methode ist ein Verfahren zur Bewegungsschätzung in Bildsequenzen. Dabei werden Trajektorien von konstanten Grauwerten über die Zeit durch ‚Strukturtensor‘-Berechnung ermittelt (Haußecker & Spies 1999). Aus den erhaltenen Geschwindigkeiten kann anschließend die relative elementare Wuchsrate (REGR) durch Divergenzbildung bestimmt werden (Kap. 4.5.1).

#### 6.1.1.1 *Auflösungsvermögen der DISP-Methode*

Die **räumliche Auflösung** der Wachstumsprofile in der vorliegenden Arbeit liegt abhängig von der Wurzelgröße<sup>7</sup> zwischen 2  $\mu\text{m}$  (*Arabidopsis*-Wurzel im Mikrorhizotron) und 20  $\mu\text{m}$  (Maiswurzel im Durchfluss-Rhizotron). Die verwendete **zeitliche Auflösung** beträgt 20 Sekunden<sup>8</sup>. Diese Kombination aus hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung ist bisher in keiner Veröffentlichung erreicht worden. Diese Auflösung wird ohne Applikation von Partikeln oder anderen Markierungen, die in den meisten Publikationen verwendet werden, allein durch die Analyse der Wurzelstruktur erreicht. Erste Ergebnisse mit der DISP-Methode zum Wurzelwachstum von Mais (Walter 2001, Walter et al. 2002, Walter et al. 2003) zeigen die Stärken der Methode auf und erreichen bereits eine hohe raum-zeitliche Auflösung (50  $\mu\text{m}$  bei Wachstumsprofilen mit 30 Minuten zeitlicher Auflösung). In der vorliegenden Arbeit ist einerseits die Auflösung dieser Methode erhöht worden (bis auf 2  $\mu\text{m}$  bei *Arabidopsis*, 20 s zeitlich), andererseits wird durch Abtastung des berechneten Geschwindigkeitsprofils entlang der Wurzelmittellinie (siehe Kap. 2.6.4, Kirchgessner 2003) eine höhere Genauigkeit, besonders bei stark oszillierenden Wurzeln, erreicht. Zur Verringerung von Fehlern trägt ebenso die optimierte Regularisierung bei (Schar 2000).

#### 6.1.1.2 *Andere Methoden zur Kartierung von Wachstumsprofilen*

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, gibt es eine Vielzahl von Methoden, um Wachstumsprofile von Wurzeln zu erstellen. Sie unterscheiden sich stark in der raum-zeitlichen Auflösung und im benötigten Arbeitsaufwand für Untersuchung und Auswertung. Diese reichen von handgezeichneten Zellgrößen und manueller Vermessung bis zu Verfahren, die wie in der vorliegenden Arbeit, auf Bildsequenzanalyse basieren (siehe Kap. 3.5). Ein Beispiel für eine andere auf Bildverarbeitung beruhende Technik ist eine Variante der DISP-Methode (van der

<sup>7</sup> Da die gesamte Wachstumszone mit dem verfügbaren Bildbereich von 740 x 480 Pixel aufgenommen werden musste, wurde die Vergrößerung jeweils auf die Wurzelgröße angepasst.

<sup>8</sup> Diese wurden hauptsächlich durch die Geschwindigkeit des Aufnahmerechners und der computergesteuerten Verschiebetische limitiert.

Weele et al. 2003). Hierbei werden überlappende Zeitserien der Wachstumszone mit hoher Auflösung aufgenommen und nach Strukturtenorberechnung zusätzlich durch Matching des bestimmten Geschwindigkeitsfeldes mit der tatsächlichen Verschiebung verglichen. Diese Technik erreicht eine vergleichbare räumliche Auflösung, wie die in dieser Arbeit benutzte DISP-Methode. Die Aufnahmedauer ist allerdings auf 9 Zeitpunkte beschränkt, so dass das Ergebnis nur eine Momentaufnahme des Wurzelwachstums darstellt. Daher können damit keine Analysen von dynamischen Anpassungen durchgeführt werden. Zudem dauert die Aufnahme der überlappenden Bilderserien über die gesamte Wachstumszone zwischen 5 und 10 Minuten, so dass bei der späteren Fusion die Wachstumsbewegungen während der Aufnahmedauer rechnerisch korrigiert werden müssen, was eine weitere Fehlerquelle darstellt. Zudem ist bei richtiger Wahl der Auswerteparameter und geeigneter Bildqualität bei der DISP-Methode meist kein zusätzliches Matching notwendig, um die Fehlerrate zu verringern. Die zeitliche und räumliche Auflösung wird bei der DISP-Methode durch die Wahl der Aufnahmeparameter (Kamera-Auflösung und Qualität, Objektiv-Qualität und Vergrößerung, der Beleuchtungsqualität und das Aufnahmeintervall) sowie die Art der Eigenstrukturen des beobachteten Objektes bestimmt.

Ein Nachteil der DISP-Methode ist, dass allein auf der Grundlage des erhaltenen Wachstumsprofils keine Aussage z.B. über Zellgrößen und Meristemlänge gemacht werden können. Daher ist es wichtig die DISP-Methode mit anderen Verfahren zu kombinieren, um möglichst viel Informationen über das Wachstum des betrachteten Organs herauszufinden.

### ***6.1.1.3 Potenzial zur weiteren Optimierung der DISP-Methode***

Die räumliche Auflösung wird beeinflusst durch die benutzte CCD-Kamera (in dieser Arbeit meist 740x480 Pixel), die Vergrößerung und Qualität der Optik (in den beschriebenen Aufbauten werden Standardobjektive verwendet) sowie das Untersuchungsobjekt selbst. Für die bearbeiteten Fragestellungen ist die erreichte räumliche Auflösung völlig ausreichend (sogar geringe Wuchsraten im Meristembereich werden klar aufgelöst, die Wachstumszone ist detailliert durch etwa 400-600 Messpunkte wiedergegeben). Mit der Weiterentwicklung der CCD-Kameratechnik<sup>9</sup> sowie Computergeschwindigkeit und Speicherkapazität<sup>10</sup> ist eine deutliche Verbesserung der räumlichen Auflösung realisierbar. Qualitativ hochwertige Objektive stehen ebenfalls bereits zur Verfügung.

---

<sup>9</sup> Aktuell sind wissenschaftliche CCD-Kameras bereits mit mehr als 4000 x 2000 Pixel (Fa. PCO, Kelheim) verfügbar.

<sup>10</sup> Ein 8-bit Bild mit 4000 x 2000 Pixeln ist unkomprimiert über sieben Megabyte groß

Allerdings lässt sich die räumliche Auflösung der DISP-Technik, nicht unbegrenzt erhöhen, da intrinsische Strukturen der untersuchten Objekte für die Analyse verwendet werden. Wenn notwendig könnten zwar Partikel zur Markierung aufgebracht werden; dadurch wäre aber der Vorteil der markierungslosen Analyse nicht mehr gegeben. Ein weiteres Problem, das eine Aufnahme mit höherer räumlicher Auflösung erschwert, ist die durch die Strukturtenorberechnung vorgegebene Randbedingung, dass sich die Strukturen zwischen aufeinanderfolgenden Bildern um maximal 1,5 Pixel bewegen (Scharr 2000). Dies kann zumindest teilweise durch eine erhöhte Aufnahmefrequenz ausgeglichen werden. Bei Wurzeln sind die Zellwände (senkrecht zur Mittellinie) als intrinsische ‚Markierung‘ für die Bildsequenzanalyse besonders geeignet, da sie sich gleichmäßig von der Wurzelspitze entfernen und einen guten Kontrast bieten. Bei steigender Auflösung sind die Zellwände immer weiter voneinander entfernt und zusätzlich werden Zellorganellen (Mitochondrien, Plastiden, Vakuolen etc.) immer besser aufgelöst. Da sich die Organellen unabhängig von der Streckungsgeschwindigkeit in der Zelle bewegen, können große Fehler in Bezug auf die Analyse des Wurzelwachstums entstehen. Diese könnten durch weiterentwickelte Bildverarbeitungstechniken zwar teilweise ausgeglichen werden, dennoch ist eine Wuchsraten-Berechnung auf Bildsequenzen höherer räumlicher Auflösung nicht ohne großen Aufwand realisierbar.

### **6.1.2 Ansätze zur Analyse der Meristemaktivität**

In der vorliegenden Arbeit konnte an der *Arabidopsis*-Transformante **CycB1;1-GFP**, die GFP mit einem CycB1;1-Fragment zeitgleich zum endogenen Cyclin B1;1 exprimiert (siehe Kap. 2.1), erstmals die Dynamik des G2/M-Übergangs (Beginn der Mitose) ohne Applikation von externen Farbstoffen *in vivo* untersucht werden. Das Cyclin CycB1;1 wird beim G2/M-Übergang gebildet (Colon-Carmona et al. 1999) und reguliert zusammen mit anderen Cyclinen und CDKs (Cyclin Dependent Kinase) die Abfolge der Zellteilung. Durch die auch im GFP-Konstrukt enthaltene ‚Cyclin-Destruction-Box‘ (King et al. 1996) wird gewährleistet, dass das gebildete Fusionsprotein zur gleichen Zeit abgebaut wird, wie das endogene Cyclin. Dies ist auch daran zu erkennen, dass die Zellen im Durchschnitt nur für etwa 45 Minuten fluoreszieren (siehe Kap. 5.3.1), was im Vergleich zur durchschnittlichen Lebensdauer von GFP in Zellen sehr kurz ist (de Ruijter et al. 2003). Dies ermöglicht erst die Beobachtung der Dynamik der Zellteilungsaktivität, da von jeder ‚GFP-aktiver‘ Zelle auch angenommen werden kann, dass sie sich im G2/M-Übergang befindet.

Die für die Timelapse-Serien benutzte Illuminationsintensität wurde stets so niedrig wie möglich gewählt, um das Wachstumsverhalten der Wurzeln so wenig wie möglich zu beeinflussen. Die

CycB1;1-GFP-Aktivität wurde an einzelnen Wurzeln teilweise bis zu 8 Stunden kontinuierlich (bis auf kurze Pausen zwischen den einzelnen Serien) aufgenommen. Dabei wurde kein deutlicher Unterschied in der Wachstumsrate oder der CycB1;1-GFP-Aktivität festgestellt. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die eingesetzte Strahlungsintensität weitgehend harmlos für die Pflanzen ist (Dixit & Cyr 2003).

Im Folgenden soll die Analyse von Zellteilungsparametern durch die CycB1;1-GFP-Methode mit anderen Ansätzen verglichen werden.

### **6.1.2.1 Bestimmung der Zellteilungsaktivität**

Das CycB1;1-Verfahren ist also in der Lage die Anzahl der **in die Mitose eintretenden Zellen *in vivo*** zu bestimmen. Allerdings darf die hierbei bestimmte Anzahl der CycB1;1 exprimierenden Zellen nicht mit dem Mitotischen Index (MI), der oft in der Literatur verwendet wird, gleichgesetzt werden. Da das CycB1;1 bereits kurz nach Einleitung der Mitose abgebaut wird, werden Zellen in späteren Mitosephasen nicht mehr detektiert. Je nach Dauer der Mitose können sich mehr Zellen in Zellteilung als im G2/M-Übergang befinden.

Der Mitotische Index (MI) wird bestimmt, indem die relative Anzahl der Zellen in Pro-, Meta-, Ana- und Telophase der fixierten und DNA-gefärbten Probe ausgezählt wird (De Tullio et al. 1999, Sundblad et al. 1998). Außerdem werden bei der Auszählung des MI Schnitte oder Quetschpräparate benutzt, die teilweise auch aufgehellte wurden, so dass auch die Gesamtzahl der Zellen bestimmt werden kann. Ein Auszählen der Gesamtzellen ist allerdings bei dem in dieser Arbeit verwendeten *in vivo* Verfahren nicht möglich, da auch mit mikroskopischen Kontrastverfahren wie dem Differentiellen Interferenz Kontrast (DIC) nur äußere Zellwände klar aufgelöst werden können.

Daher sind die Werte aus den hier beschriebenen *in vivo* Versuchen nicht direkt mit MI-Werten aus der Literatur vergleichbar. Außerdem sind weder das hier verwendete Verfahren noch der MI ein direktes Maß für die Zellteilungsrate, da nur die relative Anzahl der mitotisch-aktiven Zellen bestimmt wird, die nicht direkt mit der Zellzyklusdauer zusammenhängt. Würde sich z.B. sowohl die Interphase- als auch Mitosedauer in gleicher Weise ändern, so würde sich die Zellteilungsrate verringern, der Mitotische Index bliebe aber unverändert.

Die Zellzyklusdauer und davon abgeleitet die Zellteilungsrate, die sich auf die Aktivität einzelner Zellen beziehen, ließen sich mit der CycB1;1-GFP-Methode bestimmen, wenn die Beobachtungsdauer größer wäre als die Zellzyklusdauer. In diesem Fall könnte die Dauer von

Einleitung der Zellteilung bis zur nächsten gemessen werden und dabei die Zellzyklusdauer erhalten werden. Dazu müsste allerdings eine geeignete Vorrichtung zur Beobachtung von vertikal wachsenden Wurzeln mit dem CLSM vorhanden sein, da die Wurzeln beim Wachstum über ein waagrechtes Deckglas in bestimmten Zeitabständen Dreh- und Spiralisationsbewegungen ausführen (Migliaccio & Piconese 2001).

In der Literatur sind cytologische Methoden zur Bestimmung der Zellzyklusdauer (Webster & MacLeod 1980) sowie die Bestimmung durch kinematische Analyse über Zelllängenprofile und das Profil der Elongationsrate in der Wachstumszone (Baskin 2000) beschrieben.

### ***6.1.2.2 Ermittlung der Meristemlänge***

Die Bestimmung der Meristemlänge mit dem CycB1;1-Konstrukt in dieser Arbeit erfolgte durch Bestimmung des Abstandes zwischen dem ruhenden Zentrum und der am weitesten entfernten CycB1;1-GFP-aktiven Zelle.

Die Meristemlänge wird in der Literatur unterschiedlich ermittelt: Teilweise wird eine bestimmte Zellgröße als Meristemende definiert (Beemster et al. 2002) oder die Stelle, an der die durch kinematische Analyse erhaltene ‚Zelldepositionsrate‘ zuerst auf Null sinkt, wird als Ende des Meristems definiert (Beemster & Baskin 2000). Eine weitere Methode besteht darin DNA-gefärbte Proben mikroskopisch auf Zellteilungsstadien zu untersuchen und den vom Ruhenden Zentrum am weitesten entfernten Abstand eines Mitosestadiums als die Meristemlänge zu definieren (Casero et al. 1989). Die letztgenannte Methode entspricht der CycB1;1-Methode weitgehend. Vorteile der CycB1;1-Methode sind, dass die mitotisch aktiven Zellen leichter erkannt werden (GFP-Fluoreszenz auf dunklem Hintergrund im Vergleich zu unterschiedlicher Form und nur gering erhöhter Intensität bei DNA-Färbung) und kein externer Farbstoff appliziert werden muss.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Werte zur Meristemlänge werden in Kapitel 6.3.1 mit Angaben in der Literatur verglichen (Tabelle 6-3).

## **6.2 Analyse der Zellstreckungsdynamik**

In Kapitel 3.1 sind die Wachstumsparameter von Wurzeln vier verschiedener Arten über einen längeren Beobachtungszeitraum (mehrere Tage) dargestellt. Die Beobachtung des Wachstums bei konstanten Außenbedingungen (oft ‚steady state‘ genannt) über längere Zeit bei der erreichten hohen raum-zeitlichen Auflösung ermöglicht es, auch geringe Veränderungen in diesem Zeitraum zu ermitteln. Im Gegensatz dazu sind in der Literatur zu Wachstumsprofilen meist nur Mittelwerte zu einzelnen Zeitpunkten veröffentlicht (Mullen et al. 1998a, van der Weele et al. 2003). Eine Übersicht über Werte zum Wurzelwachstum in der Literatur ist in Tabelle 6-2 zusammengestellt.

In den folgenden Teilen sollen das Zellstreckungsverhalten der untersuchten Arten unter konstanten Wachstumsbedingungen (Kapitel 6.2.2 bis 6.2.4) und variierten Umweltbedingungen (Kap. 6.2.5) diskutiert und mit Ergebnissen aus der Literatur verglichen werden.

### ***6.2.1 Einfluss der Nährstoffverfügbarkeit auf das ‚steady state‘ Wachstum***

Die Auswirkung der externen Nährstoffverfügbarkeit auf das Wachstum unter konstanten Bedingungen (‚steady state‘) wurde an Maiskeimlingen (nährstofffrei, 5 und 10 mM; Kap. 5.1.1) und *Arabidopsis*-Keimlingen (2,5 und 10 mM, Kap. 5.1.2) über mehrere Tage untersucht. Dabei wurden Unterschiede der Wachstumsparameter im Zeitverlauf seit Keimung bzw. Einsatz in das Durchfluss-Rhizotron sowie der REGR-Verteilung gefunden, die in den folgenden beiden Kapiteln besprochen werden.

Tabelle 6-2: Übersicht über Werte zum Durchmesser,  $V_{\text{Spitze}}$  und der Länge der Wachstumszone der Primärwurzeln bei verschiedenen Arten.

Pflanzenart	Wurzel­durchmesser (mm)	Länge der Wachstumszone (mm)	$V_{\text{Spitze}}$ Maximalwert (mm h <sup>-1</sup> )	Quelle
<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,08 – 1,25	0,6 – 1,5	0,25 (ohne Saccharose)	vorliegende Arbeit
		1,2 – 2,3	0,24 - 0,45 (Hoagland Medium mit Sacch.)	Beemster & Baskin 1998
		0,91±0,14		Mullen et al. 1998
			0,46 (2%), 0,33 (0,5%), 0,21 (0% Saccharose)	Freixes et al. 2002
		1 – 2,5	Landsberg <i>erecta</i> 0,07 bis Wassilewskija 0,34	Beemster et al. 2002 Vergl. von Ecotypes (1x M&S Medium)
	0,1 – 0,15 (3% Sacch.)		0,27 (3% Sacch.)	Baskin et al. 2001
<i>Solanum tuberosum</i>	0,19 – 0,3	1,5 – 2,7	0,5	vorliegende Arbeit
<i>Nicotiana tabacum</i>	0,21 – 0,28	0,8 – 2,3	0,25	vorliegende Arbeit
<i>Lycopersicon esculentum</i>			1,33	Barlow et al. 1991
<i>Triticum vulgare</i>			0,6	Hejnowicz 1959
<i>Allium cepa</i>		9,5	0,53	Carmona & Cuadrado 1986
<i>Pisum sativum</i>	0,8 – 1,3		1,25	Rost & Baum 1988
<i>Phleum pratense</i>		1,5	0,2	Brumfield 1942
<i>Zea mays</i>	0,6 – 1,4	4 – 12	2,5	vorliegende Arbeit
	0,9 – 1,4	5,5 – 9	2,9	Muller et al. 1998
	1,4 (29 °C)	12,15	3	Pahlavanian & Silk 1988
	1,1 (16 °C)	11,49	1	
	1,4 (-0,03 MPa)	12	3	Sharp et al. 1988
	0,7 (-1,6 MPa)	7	1	
	1,0 – 1,4 (-0,03MPa)	12	3	Liang et al. 1997
0,7 – 1,4 (-1,6 MPa)	7,5	1		

### 6.2.1.1 Auswirkung der Nährstoffkonzentration auf die Wachstumsleistung

Bei der Feinanalyse des **Maiswurzelwachstums** über längere Zeit unter konstanten Bedingungen unterscheiden sich die Zeitverläufe der Wachstumsparameter von Maiswurzeln, die entweder nährstofffrei (‚bidestr‘) oder in Nährlösung (5 bzw. 10 mM) kultiviert werden (Kap. 3.1.1), deutlich. Während die Wachstumsrate im Fall der Kultivierung in bidestilliertem Wasser über vier Tage nahezu konstant bleibt bzw. eine flache Parabel (polynomischer Fit 2. Ordnung) beschreibt, lässt sich die abnehmende Wachstumsleistung bei Nährlösungsinkubation mit hoher Zuverlässigkeit ( $R^2$ -Werte zwischen 0,9 und 0,99) durch logistische Funktionen beschreiben<sup>11</sup>. Dabei ist die Abnahme über die Zeit im Durchfluss-Rhizotron proportional zur Nährlösungskonzentration. Ein ähnlicher Verlauf verschiedener Wachstumsparameter über die Zeit, wie für die bidestr-kultivierten Maiswurzeln wurde auch für Erbsenwurzeln (in Vermikulit ohne Angabe von Nährstoffzusätzen) beschrieben (Rost & Baum 1988). Dabei stehen  $V_{\text{Spitze}}$ , die Meristemlänge und der Abstand der Protoxylem-Differenzierung proportional miteinander in Beziehung.

Dies könnte eine Folge der ausreichenden Nährstoffversorgung sein. So ist z.B. für Seitenwurzeln von *Arabidopsis* bekannt, dass die Anzahl der auswachsenden Seitenwurzeln vom C/N-Verhältnis abhängig ist (Scheible et al. 1997, Zhang & Forde 2000). Ein Rezeptor, der bei *Arabidopsis* je nach C/N-Verhältnis spezielle C- und N-Metabolismus-Enzyme wie z.B. Hexokinase 1 (HXK1) reguliert, ist vermutlich der Glutamat-Rezeptor AtGLR1.1 (Kang & Turano 2003). Die Pflanze könnte also als Reaktion auf ausreichende Versorgung das Primärwurzelwachstum verringern, um den Bereich der guten Nährstoffverfügbarkeit durch Seiten- und Nebenwurzeln effektiver zu erschließen.

Eine weitere Möglichkeit, warum die Wachstumsleistung der Primärwurzeln in Nährlösung geringer wird, könnte in unterschiedlichen Zucker-Konzentrationen an der Primärwurzel begründet sein. Das Wurzelwachstum benötigt viel Energie, die in Form von Saccharose aus dem Spross bzw. dem Samenkorn in die Wurzel transportiert wird, wo sie durch Invertasen in Glucose und Fructose hydrolysiert wird (Hellebust & Forward 1962, Xu et al. 1995, Rosenkranz et al. 2001). Vor allem der Hexose-Gehalt beeinflusst das Streckungswachstum und die Frequenz der Seitenwurzelbildung (Freixes et al. 2002). Die Invertaseaktivität ist im Meristem nur sehr gering und nimmt in basale Richtung zu (Toko et al. 1987), was in gegensätzlichen Gradienten von Saccharose und den Hexosen Glucose und Fructose in der Wurzelspitze führt (Sharp et al. 1990). Auch die Nitratkonzentration kann die Elongationsrate der Seitenwurzeln

---

<sup>11</sup> Z.T. ist der Abfall vom oberen Plateauwert auf den unteren bei 10 mM-Daten sehr steil, weil gerade im Bereich der Abnahme sehr wenige Messpunkte vorhanden sind.

beeinflussen (Zhang & Forde 2000, Arredondo & Johnson 1999). Einen Zusammenhang zwischen Inhibierung des Wurzelwachstums bei hohen Stickstoffkonzentrationen und der geringeren Allokation von Kohlenstoffverbindungen an die Wurzel stellen Scheible et al. 1997 her: Akkumulation von Nitrat im Spross beeinflusst den Metabolismus vieler weiterer Substanzen, wie z.B. organischer Säuren und Aminosäuren.

Die in Kap. 5.1.2 für *Arabidopsis* beschriebene Zunahme der Wachstumsparameter (Abb. 5.24 bis Abb. 5.28) über die Zeit nach der Keimung entspricht weitgehend Daten aus der Literatur (Baskin et al. 1995, Beemster & Baskin 1998, Mullen et al. 1998a, Beemster et al. 2002). Veröffentlicht sind meist, auch wegen des hohen Arbeitsaufwandes der üblicherweise benutzten Techniken, nur einzelne Mittelwerte.

Die in der vorliegenden Arbeit erreichten Maximalgeschwindigkeiten für  $V_{\text{Spitze}}$  sind teilweise etwas geringer als in der Literatur angegeben. Das ist wahrscheinlich darin begründet, dass in dem benutzten Medium im Gegensatz zu den meisten Veröffentlichungen keine Saccharose enthalten ist. Saccharose im Medium beschleunigt das Wurzelwachstum von *Arabidopsis* deutlich (Freixes et al. 2002). Es ist möglich, dass diese Wachstumsbeschleunigung der Wurzel nicht durch die Kohlenhydrate als Energielieferant, sondern durch die leichte Verringerung des Wasserpotentials bewirkt wird (van der Weele et al. 2000).

Die Wahl des Kultivierungsmediums hat außerdem auch einen Einfluss darauf, ob *Arabidopsis*-Wurzeln nach der Keimung mehrere Tage lang das Wurzelwachstum beschleunigen (Beemster et al. 2002). Während der von Beemster & Baskin 1998 benutzte ‚Ecotype‘ in Hoagland-Medium (Hoagland & Arnon 1938) in den ersten Tagen nach der Keimung das Wurzelwachstum beschleunigte, war dies mit Murashige & Skoog Medium (Murashige & Skoog 1962; M+S) zusammen mit 14 anderen ‚Ecotypes‘ nicht der Fall (Beemster et al. 2002). Nur drei von 18 ‚Ecotypes‘ zeigten in Murashige & Skoog Medium den oben erwähnten Effekt der Wachstumsbeschleunigung über mehrere Tage nach der Keimung. Die beiden Medientypen unterscheiden sich beispielsweise deutlich in der Stickstoffquelle: Während in M+S-Medium durch  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  und  $\text{KNO}_3$  sowohl  $\text{NH}_4^+$ - als auch  $\text{NO}_3^-$ -Ionen enthalten sind (Murashige & Skoog 1962), enthält Hoagland-Medium nur  $\text{NO}_3^-$ -Ionen in Form von  $\text{KNO}_3$  und  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (Hoagland & Arnon 1938 Baskin & Wilson 1997).  $\text{NO}_3^-$ -Ionen haben in der Pflanze auch direkt und indirekt Signalwirkung (Stitt 1999), die von manchen Autoren sogar mit Hormonwirkung verglichen wird (Trewavas 1983). Daher könnte es sein, dass die unterschiedlichen Wachstumsparameter auf das unterschiedliche Stickstoffangebot zurückzuführen sind.

Bei CycB1;1-GFP unterscheiden sich die beiden Anzuchten (2,5 und 10 mM) in der REGR-Halbwertsbreite und  $REGR_{max}$  bei ähnlichen Geschwindigkeiten: Bei 10 mM steigt die Halbwertsbreite der REGR mit wachsenden  $V_{spitze}$ -Werten deutlich schneller an als bei 2,5 mM Anzucht. Entsprechend steigen die  $REGR_{max}$ -Werte der 10 mM Anzucht geringer an. Die Verteilung der REGR über die Wachstumszone hängt demnach wie bei Mais von der externen Nährstoffverfügbarkeit ab. Dieser Effekt könnte auf ähnlichen Mechanismen beruhen, wie die Abhängigkeit der REGR-Verteilung von der Nährlösungskonzentration bei Mais (Abb. 5.66, Walter et al. 2003).

Die verwendeten *Arabidopsis* ‚Ecotypes‘ (Col-0 bei CycB1;1-Transformante und C24) unterscheiden sich im Wachstumsverhalten nach der Keimung besonders bei  $V_{spitze}$ , Länge der Wachstumszone und der Position der  $REGR_{max}$ . Bei diesen Parametern sind die Werte der C24-Pflanzen (sowohl Wildtyp als auch die Transformanten der Linie 145-3) zu vergleichbarer Zeit nach der Keimung deutlich geringer. Diese Beobachtung deckt sich mit Werten aus der Literatur zu den ‚Ecotypen‘ C24 und Col-0 (Beemster et al. 2002). Zwischen C24-Wildtyp und der transformanten Linie 145-3 treten, betrachtet über die Zeit seit Keimung, nur geringe Unterschiede auf. Wie bei den Maiswurzeln ist die Wachstumsleistung bei den *Arabidopsis*-Primärwurzeln bei niedrigeren Nährstoffkonzentrationen höher (ab etwa 10 Tagen nach der Keimung; Abb. 5.24). Daher scheint nicht nur das Seitenwurzelnwachstum von *Arabidopsis* von der Nährlösungskonzentration abhängig zu sein (Zhang & Forde 2000), sondern langfristig auch die Wachstumsleistung der Primärwurzel.

### 6.2.1.2 Nährstoffabhängigkeit der REGR-Verteilung

Bei **Maispflanzen** ist ein deutlicher Unterschied zwischen Kultivierung in nährstofffreier und nährstoffhaltiger Umgebungslösung bei der Relation zwischen der  $REGR_{max}$ -Position und  $V_{spitze}$  zu erkennen (Abb. 5.18): Die Werte aus der Kultivierung mit 5 und 10 mM Nährlösung lassen sich sehr gut durch eine logistische Funktion mit relativ ähnlichem Verlauf anfitten ( $R^2 = 0,87$  bzw.  $0,89$ ). Für die Kultivierung in bidestilliertem Wasser fehlen für einen mit den Nährlösungsdaten vergleichbaren logistischen Fit Werte unter  $0,5 \text{ mm h}^{-1}$ . Eine stattdessen benutzte polynomische Funktion 2. Ordnung ( $R^2 = 0,47$ ) weicht deutlich von den Werten der in Nährlösung kultivierten Pflanzen ab. Ab einem  $V_{spitze}$ -Wert über etwa  $1 \text{ mm h}^{-1}$  liegen die REGR-Maxima der Nährlösungsanzuchten weiter von der Wurzelspitze entfernt als bei den Pflanzen in bidestilliertem Wasser. Dabei ist die Länge der Wachstumszone bei allen drei Anzuchtbedingungen gleichartig von  $V_{spitze}$  abhängig (Abb. 5.17). Dies zeigt, dass die in bidestilliertem

Wasser wachsenden Pflanzen die  $REGR_{max}$ -Position bei gleichem  $V_{Spitze}$ -Wert im Vergleich zu Nährlösungsanzuchten apikal in Richtung der Wurzelspitze verschoben haben.

Dies ist konsistent mit Beobachtungen in der Literatur (Walter et al. 2003), dass zu vielen Zeitpunkten (bei Mittelung über 1 h) zwei REGR-Maxima zu beobachten sind. Bei Anzucht in bidestilliertem Wasser ist demnach der näher an der Wurzelspitze gelegene ‚Peak‘ stärker ausgeprägt, in Nährlösung der von der Wurzelspitze weiter entfernte. Auch bei den Profilen in der vorliegenden Arbeit kommen teilweise ‚Doppelpeaks‘ bei den REGR-Kurven in der Form, wie in der Literatur beschrieben, vor. Die „Entfernung“ des  $REGR_{max}$  von der Wurzelspitze bei Variation des umgebenden Mediums von bidestilliertem Wasser auf 5, 10 bzw. 20 mM Endkonzentration ist auch an der Zunahme der relativen  $REGR_{max}$ -Position zu erkennen (Abb. 5.66). Dies zeigt, dass die Verteilung der REGR über die Wachstumszone von der umgebenden Nährstoffkonzentration abhängig ist. So ist  $NO_3^-$  das einzige Ion, dass unter diesen Bedingungen von der Wurzel an den Spross exportiert wird (Walter et al. 2003).

Möglicherweise wird die Verteilung der REGR über die Wachstumszone durch die Aufnahme von  $NO_3^-$  und  $NH_4^+$  beeinflusst: Die Aufnahme beider Ionen erfolgt durch  $H^+$ -abhängigen Transport (durch sogenannte ‚high affinity transport systems‘ HATS). Nitrat wird im Symport mit zwei Protonen aufgenommen, während bei der Ammonium-Aufnahme Protonen ausgeschieden werden. Die  $NO_3^-$ -Aufnahme führt demnach zu einer Alkalisierung der Rhizosphäre, während die  $NH_4^+$ -Aufnahme die Rhizosphäre ansäuert (Newman 2001). Daher ist es eventuell möglich, dass die Stickstoffaufnahme die Aktivität von Zellwand-erweichenden Enzymen, bedingt durch Änderung des pH-Wertes, und somit auch die Wachstumsverteilung beeinflusst. Für Maiswurzeln wurde bereits ein hochaffiner Nitrattransporter (*ZmNRT2.1*) beschrieben, der zusammen mit zwei Plasmamembran- $H^+$ -ATPasen (*MHA3* und *MHA4*) durch Nitrat in der Rhizosphäre induziert wird (Santi et al. 2003).

## 6.2.2 Invarianten der Zellstreckungsregulation

Bei der vergleichenden Untersuchung von *Arabidopsis*-, Kartoffel-, Mais- und Tabakwurzeln in Kapitel 5.1 wurden Gemeinsamkeiten zwischen den Arten herausgefunden, die im Folgenden in Bezug auf Ihre Abhängigkeit von  $V_{\text{Spitze}}$  (Kap. 6.2.2.1) und dem Durchmesser (Kap. 6.2.2.2) diskutiert werden.

### 6.2.2.1 Skalierung der Wachstumsparameter mit $V_{\text{Spitze}}$

Bei vielen veröffentlichten Untersuchungen zum Wurzelwachstum wurden jeweils ‚repräsentative‘ Wurzeln (d.h. mit in etwa gleicher  $V_{\text{Spitze}}$ ) für die Auswertung ausgewählt, um keine ‚Verfälschung‘ durch die artspezifische Varianz der Werte zu erhalten (z.B. Beemster & Baskin 1998). Dieses Vorgehen ist sinnvoll, wenn verschiedene Bedingungen oder Arten bzw. ‚Ecotypes‘ verglichen werden sollen, aber die Ermittlung der Werte sehr arbeitsaufwendig ist (Beemster et al. 2002), da sichergestellt wird, dass so jeweils die maximalen Werte verglichen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte die weitgehende Automatisierung der verwendeten DISP-Methode genutzt werden, um aufzuzeigen, dass auch die artspezifische Varianz eine zusätzliche Vergleichsmöglichkeit bietet (Kapitel 5.1). So unterscheiden sich beispielsweise die beiden untersuchten *Arabidopsis*-‚Ecotypes‘ nicht nur in den maximalen Werten für  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$ , sondern auch in der Verteilung der Wachstumsparameter aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$ .

Die Diskussion der Verläufe der Wachstumsparameter über  $V_{\text{Spitze}}$  erfolgt zuerst einzeln für jede Art und anschließend artübergreifend.

#### Maiswurzeln

Obwohl sich die Wachstumsparameter für die Anzucht in nährstofffreier Umgebung (bidest) und Nährlösung (5 und 10 mM) über die Zeit im Durchfluss-Rhizotron betrachtet deutlich unterscheiden, sind die Werte der Wachstumsparameter im Verhältnis zu  $V_{\text{Spitze}}$  sehr ähnlich verteilt (Abb. 5.15 bis Abb. 5.18). Nur bei dem Verlauf der  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position unterscheiden sich die Kurven zwischen nährstofffreier und Nährlösungs-Anzucht deutlich (Abb. 5.16). Die in Nährlösung gewonnenen Werte der  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position, REGR-Halbwertsbreite und Wachstumslänge beschreiben logistische Kurven ( $R^2$  zwischen 0,87 und 0,91) und die  $\text{REGR}_{\text{max}}$  aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  lässt sich durch eine Funktion begrenzten Wachstums beschreiben ( $y = a(1 - e^{-bx})$ ;  $R^2$  zwischen 0,87 und 0,94; die Kurve für die 10 mM-Daten steigt deutlich flacher an). Die unter nährstofffreien Bedingungen gemessenen Ergebnisse liegen (bis auf die  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position, siehe Kap. 6.2.1.2) in den gleichen Bereichen, lassen sich aber nicht zuverlässig mit diesen Funktionen fitten, da hierfür Werte unter  $0,5 \text{ mm h}^{-1}$  fehlen.

### ***Arabidopsis*-Wurzeln**

Bei *Arabidopsis* unterscheiden sich die beiden kultivierten ‚Ecotypes‘ (Col-0 und C24) bei Auftrag verschiedener Wachstumsparameter gegen  $V_{\text{Spitze}}$  (Abb. 5.29 bis Abb. 5.32). Bei äquivalenten  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten ist die REGR-Halbwertsbreite des C24-‚Ecotype‘ größer als die des Col-0-‚Ecotype‘. Bei allen anderen Parametern hat Col-0 höhere Werte. Hinzu kommt, dass bei den REGR-Profilen der CycB1;1-GFP-Pflanzen teilweise eine leichte ‚Schulter‘ basal von  $\text{REGR}_{\text{max}}$  erkennbar ist, die bei den C24-Pflanzen nicht beobachtet wird (Abb. 5.20 bis Abb. 5.23). Wie bei der Betrachtung dieser Parameter über die Zeit seit der Keimung sind kaum Unterschiede innerhalb der ‚Ecotypes‘ (Col-0 (CycB1;1-GFP) 2,5 bzw 10 mM; C24 Wildtyp und Linie 145-3) zu erkennen. Die beiden Linien des C24-‚Ecotypes‘ unterscheiden sich in der Lage der  $\text{REGR}_{\text{max}}$ , dem unterschiedlich schnellen Anstieg der REGR im Meristembereich und der Halbwertsbreite. Bei der DOF14-inhibierten Transformante (Linie 145-3) ist die  $\text{REGR}_{\text{max}}$  im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen durchschnittlich um 0,03 mm in basale Richtung verschoben (Tabelle 5-3, Abb. 5.31). Am Ende des Meristembereiches ist die REGR des Wildtyps um einen Faktor zwischen 1,5 und 2 größer als bei Pflanzen der Linie 145-3 (Abb. 5.33). Die Halbwertsbreite ist bei den Transformanten der Linie 145-3 zumindest bei geringen Werten für  $V_{\text{Spitze}}$  unter  $0,075 \text{ mm h}^{-1}$  deutlich verringert bezogen auf den Wildtyp (Abb. 5.29).

Wie bei Mais lässt sich der Verlauf von  $\text{REGR}_{\text{max}}$  im Verhältnis zu  $V_{\text{Spitze}}$  auch bei *Arabidopsis* mit einer Funktion begrenzten Wachstums beschreiben ( $R^2$  zwischen 0,77 und 0,95). Das Verhältnis der drei anderen Wachstumsparameter zu  $V_{\text{Spitze}}$  kann – wie bei Mais – für die CycB1;1-GFP-Pflanzen (und bei der REGR-Halbwertsbreite auch bei Linie 145-3) durch logistische Funktionen angefüttet werden. Vermutlich fehlen für C24-Wildtyp und Linie 145-3 nur die Werte im Bereich zwischen 0 und  $0,05 \text{ mm h}^{-1}$  und über  $0,15 \text{ mm h}^{-1}$  um auch ihren Verlauf durch eine logistische Funktion ausdrücken zu können. Die lineare Abhängigkeit der  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position bei C24-Pflanzen könnte sich z.B. auch im Bereich des nahezu linearen Anstiegs einer logistischen Funktion befinden. Daher ist es wahrscheinlich, dass auch die Wachstumsparameter von *Arabidopsis*-Pflanzen der verschiedenen ‚Ecotypes‘ in der für Maispflanzen beschriebenen Form von  $V_{\text{Spitze}}$  abhängen.

### **Tabak-Wurzeln**

Auch bei Tabak ist der Verlauf der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  und der Wachstumszonenlänge in gleicher Weise wie bei Mais und *Arabidopsis* von den  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten abhängig: Die  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Verteilung lässt sich durch eine Funktion begrenzten Wachstums ( $y = a (1 - e^{-bx})$ ), der Verlauf der Wachstumszonenlänge durch eine logistische Fitfunktion ausdrücken (Abb. 5.37, Abb. 5.39). Dagegen können die Verteilungen der REGR-Halbwertsbreite und der  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position aufgrund

relativ vieler Ausreißer nicht zuverlässig angefitet werden. Die REGR-Halbwertsbreite nimmt im Gegensatz zu Mais und *Arabidopsis* mit steigenden  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten nur gering zu. Es könnte gut sein, dass sich auch der Verlauf der  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position und REGR-Halbwertsbreite bei weniger Ausreißern und höherer Datendichte bei höheren  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten jeweils mit einer logistischen Funktion beschrieben werden könnte.

### **Kartoffel-Wurzeln**

Die gegen  $V_{\text{Spitze}}$  aufgetragenen Wachstumsparameter der Kartoffelpflanzen (Abb. 5.42 bis Abb. 5.45) können ebenfalls durch die gleichen Funktionen beschrieben werden. Zusätzlich konnten auf den NIR-Transmissions-Aufnahmen der Kartoffelwurzeln langgestreckte Strukturen beobachtet werden, die sehr wahrscheinlich dem Protophloem entsprechen (Gasche 2001). Der Abstand des ersten ‚Protophloem‘-Elementes von der Wurzelspitze aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  kann mit einer linearen Funktion angefitet werden.

### **Artübergreifender Vergleich**

Unter konstanten Bedingungen stehen die drei Wachstumsparameter  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position, REGR-Halbwertsbreite und Wachstumszonenlänge aller Wahrscheinlichkeit nach bei allen vier untersuchten Arten in logistischer Form mit  $V_{\text{Spitze}}$  in Beziehung. Die ‚Minimalwerte‘ der logistischen Fits sind in Tabelle 5-4 zusammengefasst. Nur bei wenigen Ausnahmen lassen sich die ermittelten Werte wegen fehlenden Daten bei niedrigen oder hohen Wachstumsgeschwindigkeiten bzw. wegen Ausreißern nicht mit logistischen Funktionen anfiten. Da sich die Col-0-‚Ecotype‘-Werte logistisch beschreiben lassen, ist es aber sehr wahrscheinlich, dass auch die C24-Werte ähnlich verteilt sind und nur Werte bei geringen und relativ hohen Geschwindigkeiten fehlen, um einen entsprechenden Fit durchführen zu können.

Die  $\text{REGR}_{\text{max}}$  hingegen kann bei allen untersuchten Arten mit einer Funktion begrenzten Wachstums ( $y = a(1 - e^{-bx})$ ) beschrieben werden.

Auch für andere Wachstumsparameter wurde eine Beziehung zu  $V_{\text{Spitze}}$  beschrieben. So ist die Entfernung vom ruhenden Zentrum, in der sich die ersten Protoxylemelemente differenzieren, bei Arten mit schnell wachsenden Wurzeln größer als bei Arten mit langsamerem Wurzelwachstum (Esau 1965, Rost & Baum 1988). Für Wurzeln von *Abies procera* wurde darüber hinaus beschrieben, dass die Differenzierung der Xylem-Elemente weitergeht, auch wenn das Wachstum eingestellt wurde, was in deutlich kleineren Xylemelementen in der Spitze resultiert (Wilcox 1954). Bei Wurzeln, die  $6 \text{ mm d}^{-1}$  wachsen, liegt das erste ausdifferenzierte Protoxylemelement  $7 \text{ mm}$  vom ruhenden Zentrum entfernt, bei dormanten Wurzeln dagegen nur  $0,05 \text{ mm}$ . Dieser Zusammenhang gilt auch bei induzierter Erhöhung der Geschwindigkeit z.B. durch 1-

Prolin oder Phenylborsäure (Barghoorn 1942, Odhnoff 1963) wie auch bei Verringerung von  $V_{\text{Spitze}}$  beispielsweise durch Gibberellin (Odhnoff 1963). Zwischen der Entfernung des ersten Protoxylemelements vom ruhenden Zentrum und der Meristemlänge besteht zumindest bei *Pisum sativum* ein linearer Zusammenhang (Rost & Baum 1988).

Diese Details deuten darauf hin, dass die Differenzierung entweder nach einer bestimmten Zeit, vermutlich nach dem Verlassen des Meristems, oder nach dem Verlassen des aktiven Wachstumsbereichs (und seiner Signalstoffe) einsetzt.

*Es konnte gezeigt werden, dass die Änderung der Wachstumsparameter in Abhängigkeit von  $V_{\text{Spitze}}$  bei Tabak, Kartoffel, Mais und Arabidopsis vermutlich durch vergleichbare Funktionen beschreibbar sind.*

*Auf dieser Grundlage ist es wahrscheinlich, dass*

***die Regulation des Wurzelwachstums bei den vier untersuchten Arten in ähnlicher Weise geschieht, nur je nach Organdurchmesser auf verschiedenen Skalen.***

### ***6.2.2.2 Skalierung des Wurzelwachstums mit dem Durchmesser***

Im Gegensatz zur Wachstumsleistung wird die Veränderung des Wurzeldurchmessers mit der Zeit bei Mais und *Arabidopsis* kaum durch das Nährstoffangebot beeinflusst (Abb. 5.48). Für Mais ist die entwicklungsbedingte Abnahme des Primärwurzel-Durchmessers von der Keimung an sowohl bei ausreichender Wasserversorgung als auch bei Wasserstress bekannt (Fraser et al. 1990). Dabei ist die Abnahme des Durchmessers bei Wasserstress deutlich ausgeprägter, was so gedeutet wird, dass die Pflanze dadurch mit möglichst geringem Energie- und Wasserverbrauch neue Bodenareale erreichen kann (Sharp et al. 1988). Bei Wasserstress wird nicht nur der Durchmesser deutlich verringert, sondern auch  $V_{\text{Spitze}}$ . Trotz verringertem Wurzeldurchmesser ist die Anzahl der Zellen im Querschnitt höher als bei den Kontrollwurzeln. (Liang et al. 1997). Die Aktivität von Zellwand-erweichenden Enzymen hingegen wird erhöht (Wu & Cosgrove 2000).

Auch die Temperatur hat einen Einfluss auf die entwicklungsbedingte Abnahme des Durchmessers von Maiswurzeln: Bei höheren Temperaturen nimmt der Wurzeldurchmesser über die Zeit schneller ab (Nagel 2003). Ein proportionaler Zusammenhang zwischen  $V_{\text{Spitze}}$  und dem Wurzeldurchmesser wurde auch für *Arabidopsis* (van der Weele et al. 2000, Baskin et al. 2001), *Hevea brasiliensis* (Thaler & Pagés 1996) und Erbse (Rost & Baum 1988) beschrieben. Der Durchmesser ist dabei nicht konstant, sondern kann sich entwicklungsbedingt (Liang et al. 1997) oder abhängig von der Assimilatversorgung (Aguirrezabal et al. 1993, Thaler & Pagés 1996) verändern.

Daher bietet sich auch die Betrachtung der verschiedenen Wachstumsparameter der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Arten in Abhängigkeit vom Wurzeldurchmesser an (Kap. 3.1.5). Während  $REGR_{max}$  und  $REGR_{Tip}$  kaum vom Wurzeldurchmesser abhängig sind, ist eine Abhängigkeit für die anderen Wachstumsparameter unterschiedlich deutlich ausgeprägt. Bei allen Arten und Bedingungen, mit Ausnahme von Mais bei Kultivierung in bidestilliertem Wasser, sind die Wachstumsparameter (außer  $REGR_{max}$  und  $REGR_{Tip}$ ) **linear vom Wurzeldurchmesser abhängig**. Dieser Unterschied zwischen der nährstofffreien Kultivierung von Mais und allen anderen, mit Nährlösung durchgeführten Versuchen, verdeutlicht den Einfluss der externen Nährstoffverfügbarkeit auf die Verteilung der Wuchsraten (Kap. 6.2.1). Allerdings ist die Kultivierung in nährstofffreier Umgebungslösung unphysiologisch und tritt in dieser Form in der Natur nicht auf<sup>12</sup>.

In diesem Zusammenhang lässt sich die Verschiebung der  $REGR_{max}$ -Position in apikale Richtung, Verringerung der  $REGR_{max}$ ,  $REGR$ -Halbwertsbreite und Wachstumszonenlänge bei zunehmendem Wasserstress von Maiswurzeln (Sharp et al. 1988, Morris & Silk 1992) nachvollziehen: Bei Wasserstress verringert sich  $V_{Spitze}$  und der Durchmesser, was mit der oben beschriebenen Anpassung der anderen Wachstumsparameter nach den Ergebnissen (Invarianten des Wachstums) dieser Arbeit zusammenhängt (siehe auch Kap. 6.4).

Besonders der Verlauf der  $REGR_{max}$ -Position bei steigendem Wurzeldurchmesser zeigt, wie durch Skalierung der Zellexpansion verschiedenste Wachstumsgeschwindigkeiten erreicht werden können. Sehr interessant ist, dass die Steigungen bei der Position der  $REGR_{max}$  (6,2 – 8,0x) und der Länge der Wachstumszone (9,9 – 15,6) bei den einzelnen Pflanzen bzw. Bedingungen teilweise sehr ähnlich sind, nur die Lage auf dem x-Achsenabschnitt bei zunehmendem Wurzeldurchmesser der zu höheren Werten versetzt ist.

### **6.2.3 Einfluss diurnaler Rhythmen auf das Wurzelwachstum**

Viele physiologische Prozesse von Pflanzen sind diurnal reguliert: Die Lichtreaktion der Photosynthese findet zwangsläufig nur während des Tages statt, das Blattwachstum zeigt deutliche diurnale Wachstumsmuster (Walter 2001). Auch für das Wurzelwachstum wichtige Funktionen werden diurnal gesteuert, wie z.B. die Expression von  $NO_3^-$ ,  $NH_4^+$ - und  $SO_4^{2-}$ -Transportern zur Nährstoffaufnahme (Lejay et al. 2003) und der Zuckereintransport aus dem Spross (Hansen 1977).

---

<sup>12</sup> Denn auch in Regenwasser sind Nährstoffe in z.B. Form von Nitrat und Sulfat enthalten.

Trotzdem ist beim Streckungswachstum der Primärwurzelspitze unter konstanten Bedingungen bei keiner der untersuchten Arten ein diurnaler Rhythmus zu erkennen (vgl. Abb. 5.34, Abb. 5.40, Abb. 5.1 und Abb. 5.19, Walter et al. 2002, van der Weele et al. 2003). Aber gewisse Schwankungen von  $V_{\text{Spitze}}$  (und damit auch der anderen Wachstumsparameter) treten unregelmäßig auf (Beemster & Baskin 1998, van der Weele et al. 2003). Daher gilt der Begriff ‚steady state‘ nicht strikt, da das Wachstum oft nur über kurze Zeiträume betrachtet, z.B. wegen entwicklungsbedingten Veränderungen, gleichmäßig bleibt (vgl. Kap. 5.1.1 + 5.1.2, Liang et al. 1997, Beemster & Baskin 1998).

Um das Wurzelwachstum von den oben beschriebenen diurnalen Rhythmen abzukoppeln, müssen tagsüber z.B. Stärkereserven in der Wurzel aufgebaut werden, damit das Wachstum in der Dunkelheit bei verringertem Zuckereintransport aus dem Spross (Hansen 1977) ohne deutliche Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit fortgesetzt werden kann. Dafür spricht auch die Erkenntnis, dass die Gesamtwachstumsrate des Wurzelsystems abhängig von der täglich absorbierten photosynthetisch-aktiven Strahlungsmenge ist (Aguirrezabal et al. 1994). Unter extremen Bedingungen treten trotzdem diurnale Unterschiede im Wurzelwachstum auf: Wenn dem Maiskeimling das Endosperm entfernt wird, so dass die Wurzel auf die Versorgung durch die Source-Blätter angewiesen ist, nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzel (bei 25 °C) in der Dunkelperiode ab (Nagel 2003). Dieser Unterschied im Wachstum zwischen Licht- und Dunkelperiode ist vermutlich kein circadianer Rhythmus, sondern lediglich eine Folge der verringerten Kohlenhydratverfügbarkeit in der Wurzel.

#### ***6.2.4 Einfluss veränderter Genaktivität auf das Wurzelwachstum***

##### **Vergleich von C24-Wildtyp und Linie 145-3**

Bei der Position der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  in Relation zu  $V_{\text{Spitze}}$  ist ein signifikanter Unterschied zwischen dem C24-Wildtyp und der transformanten Linie 145-3 zu erkennen (Abb. 5.31, Abb. 5.33, Tabelle 5-3): Das Maximum der REGR ist bei den Transformanten bei vergleichbaren  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten etwa 0,03 mm in basale Richtung verschoben. Sowohl die Transformante als auch der Wildtyp erreichen bei dem Vergleich der Wachstumsprofile (Abb. 5.33) den in der Literatur für den C24-‚Ecotype‘ angegebenen  $V_{\text{Spitze}}$ -Wert von 0,1 mm h<sup>-1</sup> (Beemster et al. 2002).

Bei den Werten der Linie 145-3 (Aktivität von DOF14 durch RNAi verringert) ist im Meristembereich ein geringerer Anstieg von  $V_{\text{Spitze}}$  und der REGR zu erkennen, was in einem deutlichen Unterschied der Wuchsrates um einen Faktor zwischen 1,5 und 2 bei 2 mm Abstand von der Wurzelspitze (im Bereich des Übergangs von Meristem in die Streckungszone) resultiert (Abb. 5.33).

Ein weiterer signifikanter Unterschied zwischen C24-Wildtyp und Transformante besteht in der verringerten REGR-Halbwertsbreite der transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 5.29).

Die Inhibierung des DOF14-Transkriptionsfaktors durch ein RNAi-Konstrukt führt im Vergleich zum Wildtyp zu verringerten  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten und erhöhter Seitenwurzelbildung, während Überexpression das Gegenteil bewirkt (persönliche Mitteilung S. Ruzicic, Universität Potsdam). DOF14 wird ausschließlich im Meristembereich von Wurzelspitzen exprimiert und DOF14-Inhibition bewirkt auch symmetrische Zellteilungen der Initialen (persönliche Mitteilung S. Ruzicic, Universität Potsdam). Diese Eigenschaften von DOF14 erklären das besonders im Meristembereich verringerte Wachstum der DOF14-inhibierten Linie 145-3 im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 5.33; für den Vergleich wurden Profile von Wildtyp und Transformante mit gleichen  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten ausgewählt).

Es könnte sein, dass die Wachstumsreduktion im Meristembereich mit einer verringerten Zellteilungsrate zusammenhängt. Diese könnte im weiteren Verlauf der Entwicklung in der Streckungszone durch eine höhere Endgröße der Zellen ausgeglichen werden, da die Gesamtelongationsrate ( $V_{\text{Spitze}}$ ) durch die Zellproduktionsrate und die Endgröße der Zellen bestimmt wird (Beemster et al. 2002). Beim Vergleich des Wachstumsverhaltens des C24-„Ecotypes“ mit anderen *Arabidopsis* „Ecotypes“ zeigt sich, dass z.B. der NW-„Ecotype“ trotz deutlich geringerer Zellproduktionsrate durch eine Verdopplung der Zellendgröße einen höheren  $V_{\text{Spitze}}$ -Wert als C24 erreicht (Beemster et al. 2002). Es könnte sein, dass das auf den ersten Blick kaum veränderte Wachstum der DOF14-inhibierten Transformante im Vergleich zum Wildtyp ein weiteres Beispiel dafür ist, wie flexibel Organismen oft den Ausfall bzw. die Überexpression von „wichtigen“ Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren oder anderer wichtiger Regulatoren ausgleichen können, so dass makroskopisch am Phänotyp nur ein geringer Unterschied zu erkennen ist (z.B. De Veylder et al. 2001a).

### **6.2.5 Dynamische Anpassung an variierte Umweltbedingungen**

Wie z.B. aus der Lockhart-Gleichung (Formel 1) zu erwarten, sinkt die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzel bei einer raschen Erhöhung der externen Osmolarität durch die Zugabe von Nährlösung von nährstofffrei (bidest) auf 5, 10 bzw. 20 mM schnell ab (Kap. 5.2.1). Allerdings ist der kurzfristige Effekt, ein Abfall der  $\text{REGR}_{\text{max}}$  und  $V_{\text{Spitze}}$  auf 40 – 45 % des Ausgangswertes sehr ähnlich bei allen drei Variationen, und damit nahezu unabhängig von der Konzentrationsdifferenz. Es könnte z.B. sein, dass der „yield threshold“ abhängig von der Konzentrations-

differenz schnell genug angepasst wird. Diese Vermutung wird unterstützt durch Messungen an Maiswurzeln bei Erhöhung der Osmolarität durch Zugabe von Mannitol oder KCl auf 0,12 bzw. 0,13 Osm (Frensch & Hsiao 1994): Durch die deutlich höhere Osmolarität im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen, wächst die Wurzel nach der Zugabe solange nicht weiter, bis der ‚yield threshold‘ innerhalb von 10 Minuten angepasst wurde. Dies liegt in etwa im Bereich der beschriebenen ‚Erholungspeaks‘. Da die Osmolaritätsunterschiede bei den in Kapitel 5.2.1 beschriebenen Versuchen deutlich geringer waren, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Turgordifferenz ebenfalls geringer war und damit auch der ‚yield threshold‘ entsprechend weniger angepasst werden müsste. Im Gegensatz zu  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$  sinken die Werte der  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position, Wachstumszonenlänge und  $\text{REGR}$ -Halbwertsbreite nur langfristig ab (Abb. 5.67, Abb. 5.68), was darauf hindeutet, da diese Parameter überwiegend durch Expressionmuster von Zellwand-erweichenden Enzymen und nicht vom Turgor abhängig ist.

Deutlicher wird der Unterschied zwischen den verschiedenen Variationsexperimenten von bidestilliertem Wasser auf Nährlösung erst bei langfristiger Beobachtung: 5 Stunden nach der Nährlösungszugabe sind deutliche Unterschiede zu erkennen, die Wuchsraten haben bei größerem Konzentrationsunterschied stärker abgenommen. Dies zeigt, dass die Wurzel die unterschiedlichen Osmolaritäten relativ schnell ausgleichen kann. Die langfristige Reaktion der Wurzel auf die veränderten Nährstoffkonzentrationen hängt vermutlich nicht von der Osmolarität, sondern von der Nährstoffmenge ab. Dass die veränderten Wuchsraten der Wurzel nicht nur durch ein unterschiedliches osmotisches Potenzial hervorgerufen werden, ist auch daran zu erkennen, dass eine Veränderung um die gleiche Differenz des osmotischen Potenzials unterschiedliche Auswirkungen haben kann: Während bei einer schnellen Variation von bidestilliertem Wasser auf 5 mM Nährlösung ein deutlicher ‚Sprung‘ in den Wuchsraten auftritt (Kap. 5.2.1.1), sinken die  $\text{REGR}_{\text{max}}$  und  $V_{\text{Spitze}}$  nur langsam linear ab bei der Erhöhung von 5 auf 10 mM (Kap. 5.2.1.4). Auch die Änderung der umgebenden Lösung von bidestilliertem Wasser auf 10 mM Nährlösung (Kap. 5.2.1.2) bzw. PEG6000 (Kap. 5.2.1.6) der gleichen Osmolarität bewirkt sehr unterschiedliche Wachstumsmuster: Bei 10 mM nehmen  $\text{REGR}_{\text{max}}$  und  $V_{\text{Spitze}}$  wie beschrieben sprunghaft ab, bei 0,018 Osm. PEG6000 hingegen ist kaum ein Unterschied beim Wachstum zu erkennen, außer einer kurzen und geringen Abnahme. Die Anpassung der Wachstumsleistung bei rascher Variation auf verschiedene Umgebungsbedingungen ist daher bei den verwendeten, keinen Wasserstress bewirkenden, Osmolaritäten primär von der Nährstoffkonzentration des Mediums und dem Versorgungsstatus vor dem Experiment abhängig.

Der deutliche Unterschied zwischen Variation der externen Nährstoffkonzentration von bidest auf 5 bzw. 5 auf 10 mM könnte durch die Umstellung der Nährstoffquelle im Fall des bidest auf 5 mM-Experimentes verursacht sein: In bidestilliertem Wasser muss die Wurzel ausschließlich durch die Reserven im Samenkorn versorgt werden, während die bereits in 5 mM wachsenden Wurzel an das externe Nährstoffangebot angepasst war. Besonders Nitrat wird in Nährlösung aus den Wurzeln exportiert (Walter et al. 2003). Wie in Kapitel 3.1.1 und 3.1.5 beschrieben, befinden sich Maiswurzeln mit bzw. ohne Nährstoffe im umgebenden Medium in zwei verschiedenen ‚Wachstumsmodi‘: Die Wachstumsparameter von Mais in bidestilliertem Wasser verhalten sich deutlich anders als bei Maiswurzeln in Nährlösung.

Eine weitere Möglichkeit, warum die Wachstumsleistung deutlich stärker beim Übergang von bidest auf 5 mM als bei 5 auf 10 mM absinkt, könnte z.B. teilweise auch durch Calcium in der Nährlösung bewirkt werden. Calcium verfestigt durch Komplexierung von negativ geladenen Uronsäuregruppen des Pektin-Netzwerks die Zellwand (Jarvis 1982). Uronsäuren sind besonders in neu gebildeten Zellwänden häufig, die Konzentration von Uronsäuren nimmt in der Wurzelspitze vom Meristem im Laufe der Zellentwicklung ab (Silk et al. 1984). Beispielsweise ist der Calcium-Gehalt von Maiswurzeln, die in niedrigem pH-Milieu kultiviert werden höher als bei Maiswurzeln, die in einer Umgebung mit neutralem pH wachsen (Walter et al. 2000), was ebenfalls mit der Verfestigung der Zellwand in Zusammenhang gebracht wird.

Da bei Anzucht in bidestilliertem Wasser kein Calcium im umgebenden Medium vorhanden ist, könnte es sein, dass die Uronsäuregruppen noch nicht vollständig komplexiert sind. Calcium oder andere zweiwertige Ionen könnten nach erhöhtem Import aus dem Endosperm von der Wurzel sekretiert worden sein. Die Dehnbarkeit der Zellwand könnte in diesem Fall allein durch andere Eigenschaften der Zellwand, wie z.B. Quervernetzung der Fibrillen, eingestellt sein. Durch Zugabe von Calcium-haltiger Nährlösung könnte eine schnelle transiente Wachstumsverringering bewirkt werden.

Die Resultate der Variation des Außenmediums von bidestilliertem Wasser auf verschiedene Nährlösungskonzentrationen mit Zugabe von PEG6000 unterstützen die Hypothese, dass Calcium bei der kurzfristigen Verringerung der Wachstumsrate beteiligt ist: Die schnelle Wachstumsreduktion nach Erhöhung der Osmolarität durch stickstoffreduzierte Nährlösung (Abb. 5.78) ist deutlich ausgeprägter als bei Zugabe von PEG6000 gleicher Osmolarität (Abb. 5.74).

Auch die Stickstoff-Konzentration scheint einen Einfluss auf die Veränderung der Wachstumsrate zu haben. Denn die Wachstumsanpassung an ein Gemisch aus 10 mM Nährlösung und PEG6000

(Gesamtosmolarität entspricht 20 mM Nährlösung) ist weitgehend mit dem Verlauf der Variation von bidest auf 10 mM Nährlösung vergleichbar. Stickstoffreduzierte Nährlösung<sup>13</sup> mit der gleichen Osmolarität wie 10 mM Nährlösung hingegen bewirkt langfristige Änderungen der Wachstumsleistungen, die eher mit dem Einfluss von Nährlösung mit 5 mM Stickstoffgehalt vergleichbar sind, als mit der von 10 mM Nährlösung.

Bei vielen der Variationsexperimente ist ein ‚**Erholungspeak**‘, der unterschiedlich stark ausgeprägt ist, nach dem ersten raschen Absinken des Wachstums zu erkennen. Dieser Peak lässt vermuten, dass die Wurzel durch unterschiedliche Mechanismen auf die veränderten Bedingungen reagiert. So könnte eine schnelle Reaktion, z.B. von Transport-Proteinen in der Plasmamembran (Newman 2001, Santi et al. 2003) oder die Senkung des ‚Yield Threshold‘ durch die Anpassung der Aktivität von bereits in der Zellwand vorhandenen Expansinen und anderen Zellwand-erweichenden Enzymen (Wu & Cosgrove 2000) den ‚Erholungspeak‘ bewirken. Langfristigere ‚Erholung‘ der Wachstumsrate könnte z.B. durch Transport von Nährstoffen im Phloem (Frensch & Hsiao 1994) oder erhöhte Expression von Zellwand-erweichenden Enzymen bewirkt werden.

Mannose wird von Hexokinase zu Mannose-6-Phosphat umgewandelt, das in vielen Pflanzen akkumuliert, weil Mannose Phosphat Isomerase entweder gar nicht oder nur mit sehr geringen Aktivitäten in der Wurzel vorhanden ist (Brouquisse et al. 2001). Dadurch gerät die Pflanze in Phosphat-Mangel und z.B. der ATP-Metabolismus wird gestört. Hierdurch wird das Wachstum stark verringert und schließlich eingestellt. Ebenso ist in diesem Fall ein exponentieller Abfall der verfügbaren Phosphat-Menge zu erwarten, da immer weniger Phosphat von einer gleichbleibenden Konzentration an Hexokinase auf Mannose übertragen wird. Indirekt ist auch zu erwarten, dass das Wurzelwachstum mit exponentieller Kinetik verringert wird, weil der Energieträger ATP auf gleiche Weise reduziert wird. Dieser Effekt kann bei Mais bis etwa 2 mM Mannose durch die 15-fache Phosphat-Menge in der Nährlösung ausgeglichen werden (Brouquisse et al. 2001).

Bei *Arabidopsis*-Wurzeln scheint Mannose auch andere Effekte zu haben, da die stark inhibierende Wirkung bei 0,3 mM Mannose durch 8 mM Phosphat nicht ausgeglichen werden kann. Gleichzeitig hat Mannose bei 0,1 mM Mannose bei nur 0,2 mM Phosphat keine inhibierende Wirkung (Baskin et al. 2001). Es wird vermutet, dass dieser Effekt durch die Beeinflussung des Hexokinase-vermittelten Zucker-Signalweges entsteht (Smeekens 2000). Die

---

<sup>13</sup> Entspricht der Zusammensetzung von 10 mM Nährlösung, bei der  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  und  $\text{KNO}_3$  gegen PEG6000 gleicher Osmolarität ersetzt worden sind (siehe Kap. 4.2).

Kinetik der Reaktion der Maiswurzeln auf Mannose-Zugabe zeigt, dass mit der DISP-Methode schnelle Reaktionen genau visualisiert werden können, denn es ist nicht nur der exponentielle Abfall der Wachstumsleistung bestimmbar, sondern auch der relativ kurze ‚Erholungspeak‘ wird klar aufgelöst. Bei den meisten bisher verwendeten Verfahren wäre die zeitliche Auflösung dafür zu gering gewesen. Auch dieses Resultat zeigt, dass die DISP-Technik zum Screenen von Mutanten bzw. Transformanten auf bestimmte Parameter oder zur Evaluierung von Chemikalien, wie z.B. Herbiziden geeignet ist.

### 6.3 Einfluss der Zellteilungsaktivität auf das Wurzelwachstum

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, wird die Bedeutung der Zellteilungsaktivität für die Gesamtelongationsrate in der Literatur kontrovers diskutiert. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse dieser Arbeit mit Ergebnissen aus der Literatur in Relation gesetzt.

#### 6.3.1 Zellteilungsaktivität bei konstanten Außenbedingungen

Die mit der CycB1;1-GFP-Transformante unter konstanten Bedingungen bestimmte **durchschnittliche Anzahl der im G2/M-Übergang befindlichen** (CycB1;1-GFP enthaltenden) **Zellen** (25-26 Zellen, Abb. 5.89) entspricht den Werten aus der Literatur, die durch destruktive Analyse bestimmt wurden (Colon-Carmona et al. 1999: 24 Zellen). Die hohe Standardabweichung lässt sich durch intraspezifische Varianz, sowie durch die Abhängigkeit der CycB1;1-Aktivität (und damit auch der Mitoseaktivität) von der Wachstumsgeschwindigkeit  $V_{\text{Spitze}}$  (Abb. 5.90) erklären. Die gemessene Gesamtaktivitätszeit des CycB1;1-Konstruktes von  $44 \pm 26$  min liegt im Vergleich zu ‚herkömmlichen‘ GFP in Pflanzen (Proteinhalbwertszeit  $\sim 18$  h; de Ruijter et al. 2003) sehr niedrig und zeigt, dass die ‚destruction box‘ des Konstruktes wirksam ist.

Die **Meristemlänge** wächst ebenso proportional mit steigenden  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten (Abb. 5.87). Dies deutet darauf hin, dass sich nicht die Zellteilungsrate verändert (dies würde mehr mitotische Zellen in der gleichen Meristemgröße bewirken), sondern die Zellproduktionsrate durch längere Verweildauer der Zellen im Meristem und damit insgesamt mehr Zellteilungen gesteigert wird (Baskin 2000). Die mit der CycB1;1-GFP-Methode bestimmte Meristemlänge (definiert als Abstand der letzten CycB1;1-GFP exprimierenden Zelle von ruhenden Zentrum) liegt im Bereich, der in der Literatur für *Arabidopsis* beschrieben Werte (Tabelle 6-3).

**Tabelle 6-3: Übersicht über in der Literatur beschriebenen Meristemgrößen bei *Arabidopsis***

Quelle	Meristemlänge
vorliegende Arbeit	120 – 220 $\mu\text{m}$
Dolan et al. 1993	250 $\mu\text{m}$
Baskin et al. 1995	203 – 411 $\mu\text{m}$
Mullen et al. 1998a	248 $\mu\text{m}$
Beemster & Baskin 1998	440-713 $\mu\text{m}$

Etwas geringere Werte der CycB1;1-GFP bestimmten Meristemgröße können einerseits darin begründet sein, dass die Zelldichte am Ende des Meristems schon stark abgenommen hat (Beemster & Baskin 1998:  $\sim 40 \mu\text{m}$  am Ende des Meristem zu  $\sim 7 \mu\text{m}$  in der mittleren Meristemzone) und daher am Ende des Meristembereichs statistisch weniger Zellteilungen vorkommen, die gleichzeitig bei der Bestimmung mit der CycB1;1-GFP-Methode eine Differenz von bis zu  $40 \mu\text{m}$  bewirken können. Außerdem ist zu erwarten, dass die mit der CycB1;1-Methode bestimmte Länge etwas geringer als die reale Meristemlänge ist, weil die Mitose mit dem Abbau des Reporterkonstruktes noch nicht abgeschlossen ist. Andererseits ist  $V_{\text{Spitze}}$  der beobachteten *Arabidopsis* Pflanzen durchschnittlich geringer als bei den Pflanzen, die in den oben genannten Literaturzitate für die Meristemlängenbestimmung benutzt wurden. Diese geringere maximale Wachstumsgeschwindigkeit ist vermutlich auf unterschiedliche Wachstumsbedingungen zurückzuführen, so wurde z.B. in der vorliegenden Arbeit Medium ohne Saccharose-Zusatz verwendet, was in geringeren  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten resultiert (Freixes et al. 2002). Auch bei Verwendung verschiedener Anzuchtmedien werden unterschiedliche Wachstumsparameter beschrieben (Beemster et al. 2002).

Die oben diskutierten Ergebnisse zu CycB1;1-Aktivität und Meristemlänge deuten darauf hin, dass höhere  $V_{\text{Spitze}}$ -Werte proportional zu einer größeren Anzahl von Zellen sind, die zur gleichen Zeiteinheit in die Zellstreckung eintreten, was einer erhöhten Zellproduktionsrate des Meristems entspricht. Dies steht im Einklang mit manchen Ergebnissen aus der Literatur, die darauf hindeuten, dass die Meristemgröße und Gesamtzellproduktionsrate (‘total cell production rate’; Anzahl der Zellen, die pro Zeiteinheit vom Meristem in die Streckungszone eintreten) proportional zu  $V_{\text{Spitze}}$  ansteigt (Beemster & Baskin 1998, Muller et al. 1998).

In der Literatur ist umstritten, ob Pflanzen ihr Wachstum durch variable Zellteilungsrate anpassen oder nicht. Nach vielen Veröffentlichungen ändert sich die Zellteilungsrate im Vergleich zur Gesamtzellproduktionsrate nur unter extremen Bedingungen, demnach hinge die Zellproduktionsrate hauptsächlich von der Meristemgröße ab (Baskin 2000). Die Ergebnisse der Untersuchungen an den CycB1;1-GFP-Pflanzen können mit dieser Theorie erklärt werden. Ein Vergleich mehrerer *Arabidopsis thaliana* ‚Ecotypes‘ (lokale Populationen mit genetischen

Unterschieden) zeigt, dass Unterschiede in der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit  $V_{\text{Spitze}}$  zwischen den ‚Ecotypes‘ hauptsächlich von zwei Faktoren abhängen: Der Zellproduktionsrate und der Größe der ausdifferenzierten Zellen (Beemster et al. 2002). Innerhalb eines ‚Ecotypes‘ wird  $V_{\text{Spitze}}$  wahrscheinlich deutlich stärker durch die Variation der Zellproduktionsrate reguliert als durch die Endgröße der Zellen: bei Anstieg von  $V_{\text{Spitze}}$  um Faktor 1,8 erhöht sich die Zellproduktionsrate um Faktor 1,6 während sich die Endgröße der Zellen nur 1,2-fach vergrößert (Baskin et al. 1995). Auch Maispflanzen, die bei verschiedenen Lichtverhältnissen kultiviert werden, unterscheiden sich in der Zellproduktionsrate (bei etwa konstanter Zellteilungsrate im Meristem) und der Endgröße der ausdifferenzierten Zellen (Muller et al. 1998).

### ***6.3.2 Zellteilungsaktivität bei Variation der Außenbedingungen***

Die Variation von Umweltparametern, wie z.B. der Nährlösungskonzentration, hat sicher einen langfristigen Einfluss auf die Zellproduktionsrate im Wurzelmeristem. Ob die Anpassung schnell, wie z.B. bei den Nährlösungsvariationen an Maiswurzeln in Kapitel 5.2.1 beschrieben, oder eher im Rahmen von mehreren Stunden bis Tagen abläuft, ist schwer vorhersehbar. Einerseits braucht es einige Zeit bis sich eine veränderte Expressionsrate in den gebildeten Proteinen widerspiegelt, eine schnelle Reaktion wäre demnach nicht zu erwarten. Andererseits könnte es auch sein, dass manche Zellen bereits alle notwendigen Proteine gebildet haben und durch Signale die Zellteilung schnell eingeleitet wird.

Dafür spricht, dass es im Zellzyklus an bestimmten Stellen, wie z.B. bei dem G1/S- und dem G2/M-Übergang, sogenannte ‚checkpoints‘ gibt (De Veylder et al. 2001b, De Veylder et al. 2003). Vor dem Fortschreiten in die nächste Phase des Zellzyklus wird damit sichergestellt, dass z.B. keine Fehler bei der Replikation der DNA entstanden sind. Das Fortschreiten über einen Checkpoint hinweg könnte eventuell durch veränderte Umgebungsbedingungen ausgelöst werden, so werden z.B. bestimmte Cycline durch die Zuckerkonzentrationen beeinflusst (Riou-Khamlichi et al. 2000) und die Meristemaktivität von Seitenwurzeln von lokalen Nitratkonzentrationen beeinflusst (Zhang & Forde 1998).

Erste Hinweise auf, dass eine relativ schnelle Reaktion auf Erhöhung der Nährlösungskonzentration zur Verringerung der Teilungsaktivität führen könnte, bieten die Ergebnisse der Nährlösungsvariation in Umgebung der CycB1;1-Wurzeln (Abb. 5.91). Allerdings ist die Unsicherheit durch die hohe Varianz innerhalb der untersuchten Population von Pflanzen relativ hoch, so dass mit den bereits vorhandenen Daten keine sichere Aussage getroffen werden kann.

## 6.4 Regulation von Wachstumsprozessen in Wurzelspitzen

In der vorliegenden Arbeit wurden **Invarianten des Wachstums** bei der Analyse des Zellstreckungsverhaltens von vier Arten bei 22 °C ermittelt (Kap. 3.1):

- Die **Wachstumsparameter**  $REGR_{max}$ -Position, Wachstumszonenlänge und  $REGR$ -Halbwertsbreite sind in logistischer Form von  $V_{Spitze}$  abhängig.
- $REGR_{max}$  lässt sich aufgetragen gegen  $V_{Spitze}$ -Werten durch eine Funktion begrenzten Wachstums beschreiben.
- Die  **$REGR_{max}$ -Position**, die **Wachstumszonenlänge**,  $V_{Spitze}$  und die  **$REGR$ -Halbwertsbreite** hängen linear vom Wurzeldurchmesser ab. Die Steigungen bei den verschiedenen Arten sind besonders bei der  $REGR_{max}$ -Position und der Wachstumszonenlänge sehr ähnlich, die Fitlinien dieser Parameter sind fast nur gegeneinander versetzt.

Mit den für 22 °C bestimmten Verhältnisse der Parameter des Wurzelwachstums lassen sich durch Modifikation der Kurven an andere Temperaturen z.B. auch die unterschiedliche Verteilung der  $REGR$  bei unterschiedlichem Wasserpotenzial und konstanter Temperatur von 29 °C (Sharp et al. 1988) sowie bei verschiedenen Temperaturen und konstantem Wasserpotential von -0,03 MPa (Pahlavanian & Silk 1988, Morris & Silk 1992) beschreiben (siehe Kap. 6.2.2.2, Abb. 6.1 bis Abb. 6.4). Auch die Werte nach Entfernung des Endosperms bei verschiedenen Temperaturen (Nagel 2003) stimmen mit den modifizierten Kurven gut überein.

### Modifizierung der Wachstumsparameter-Kurven an andere Temperaturen

Die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Beziehung der Wachstumsparameter zu  $V_{Spitze}$  sind bei 22 °C ermittelt worden. Zum Vergleich mit Werten aus der Literatur soll versucht werden die entsprechenden Fitlinien an unterschiedliche Temperaturen anzupassen. Dazu wurde folgendermaßen vorgegangen:

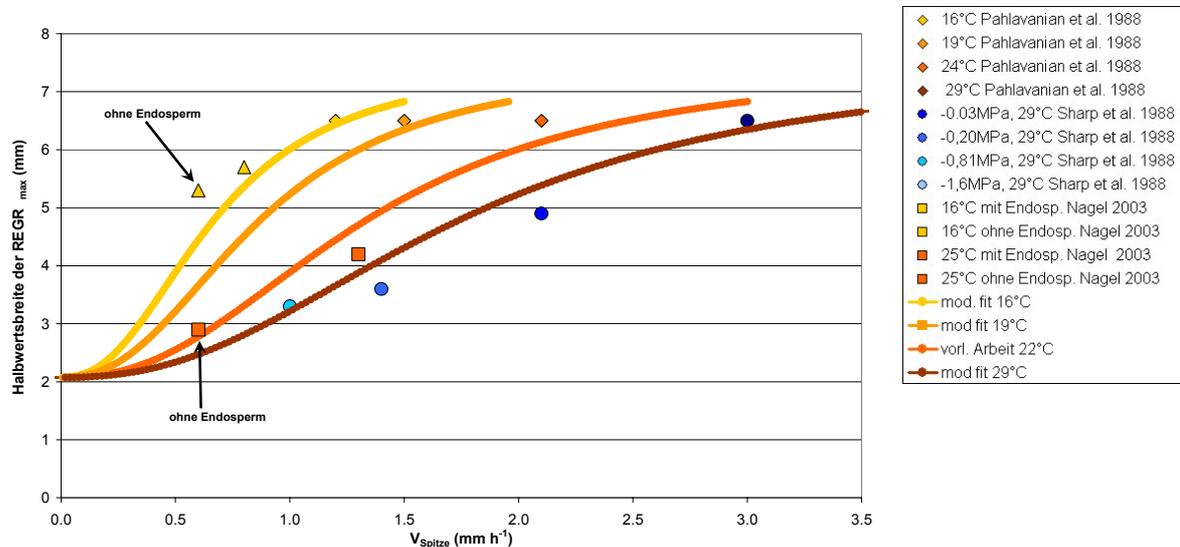
**Skalierung von  $V_{Spitze}$ :** Da die Werte der  $REGR$ -Halbwertsbreite,  $REGR_{max}$ -Position und Wachstumszonenlänge bei unterschiedlichen Temperaturen im ‚steady state‘ trotz deutlich verschiedener Werte von  $V_{Spitze}$  sehr ähnlich sind (Pahlavanian & Silk 1988), werden die Kurven um das Verhältnis zwischen  $V_{Spitze}$  bei 24 °C und der Zieltemperatur angepasst. Die Werte der 22 °C-Verteilung der vorliegenden Arbeit wurden näherungsweise mit dem Wert bei 24 °C als gleichwertig betrachtet. Durch diese Skalierung wurde die Form der Fitlinie (in der Legende ‚vorliegende Arbeit 22 °C‘) für 16 °C (‚mod. Fit 16 °C‘), 19 °C (‚mod. Fit 19 °C‘) und 29 °C (‚mod. Fit 29 °C‘) angepasst. Dieses Verfahren kann Messungen nicht ersetzen, ermöglicht aber einen qualitativen Vergleich mit Werten aus der Literatur (Abb. 6.1 bis Abb. 6.3).

**Anpassung der REGR<sub>max</sub>-Verteilung:** Die REGR<sub>max</sub> steigt mit höheren Temperaturen deutlich an (Pahlavanian & Silk 1988), daher reicht es bei der Anpassung der REGR<sub>max</sub>-Verteilung aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  nicht, die oben beschriebene Skalierung für  $V_{\text{Spitze}}$  durchzuführen. Unter der Annahme, dass sich die REGR nach der RGT-Regel bei Temperaturanstieg um 10 °C etwa verdoppelt, wurden daher zusätzlich die REGR-Werte angepasst (Abb. 6.4).

**Vergleich mit Werten aus der Literatur:** Für den Vergleich der Parameter des Primärwurzelswachstums von Mais aus der vorliegenden Arbeit werden drei verschiedene Experimente an Maiswurzeln benutzt:

- 1) Der Einfluss verschiedener zeitlich konstanter Temperaturen auf das ‚steady state‘ Wachstum (Pahlavanian & Silk 1988).
- 2) Unterschiede der Wachstumsparameter des ‚steady state‘ Wachstums bei konstanter Temperatur (29 °C) und verschiedenen Wasserpotentialen (Sharp et al. 1988)
- 3) Evaluierung der Wachstumsanpassungen bei Entfernung des Endosperms an jungen Maiskeimlingen bei verschiedenen, zeitlich konstanten Temperaturen (Nagel 2003)

Für alle Werte werden die Quellen und Daten in der Legende aufgeführt.



**Abb. 6.1:** Vergleich der REGR-Halbwertsverteilung aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  aus der vorliegenden Arbeit mit Werten aus der Literatur durch temperaturabhängige Modifizierung der Kurve

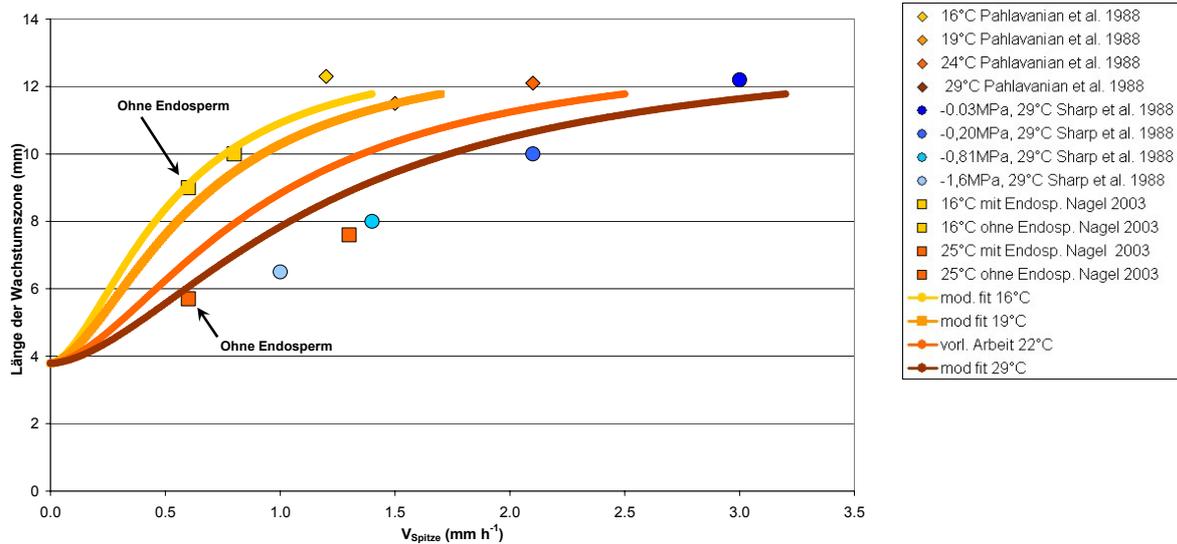


Abb. 6.2: Vergleich der Wachstumszonenlänge aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  aus der vorliegenden Arbeit mit Werten aus der Literatur durch temperaturabhängige Modifizierung der Kurve

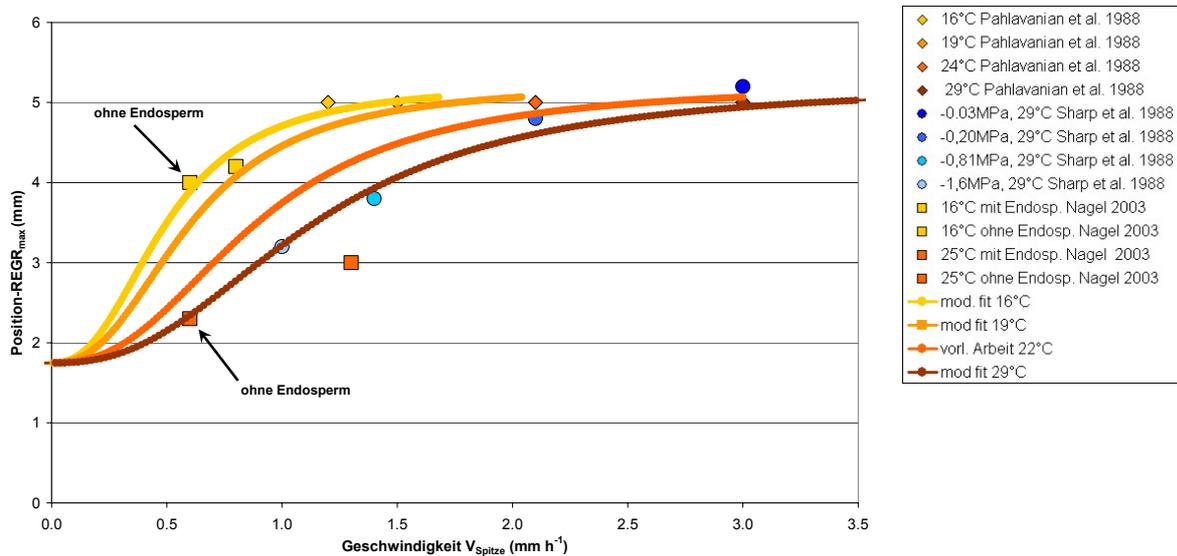


Abb. 6.3: Vergleich der  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position aufgetragen gegen  $V_{\text{Spitze}}$  aus der vorliegenden Arbeit mit Werten aus der Literatur durch temperaturabhängige Modifizierung der Kurve

**Korrelation zwischen Literaturwerten und Parameterkurven:** Trotz der einfachen Transformation (s.o.) der im Laufe der vorliegenden Arbeit ermittelten Kurven beim Auftragen verschiedener Wachstumsparameter gegen  $V_{\text{Spitze}}$ , gibt es signifikante Übereinstimmungen zwischen den erhaltenen modifizierten Kurven und den aus der Literatur extrahierten Werten. Die bei 29 °C gemessenen Wachstumsparameter bei unterschiedlichen, jeweils zeitlich konstanten Wasserpotentialen (Sharp et al. 1988) stimmen mit allen auf 29 °C transformierten Kurven gut überein. Auch die Werte der Maiskeimlinge ohne Endosperm und der Kontrollpflanzen (Nagel 2003) korrelieren gut mit den modifizierten Kurven der entsprechenden Temperatur, vor allem bei 16 °C.

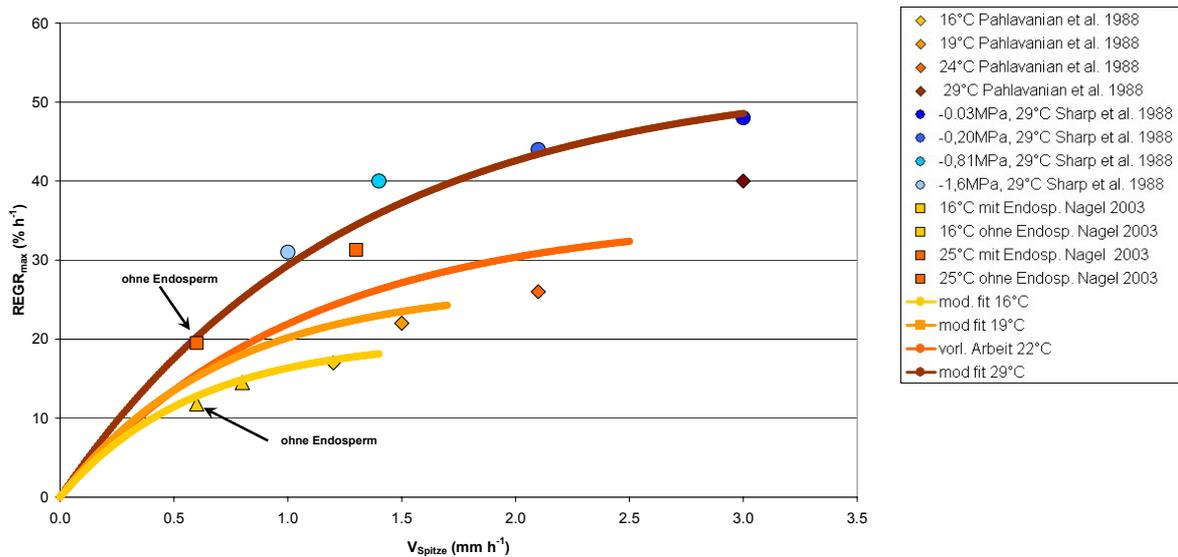


Abb. 6.4: Vergleich der REGR<sub>max</sub> aufgetragen gegen V<sub>Spitze</sub> aus der vorliegenden Arbeit mit Werten aus der Literatur durch temperaturabhängige Modifizierung der Kurve

### Daraus lässt sich folgende Hypothese zur Wachstumsregulation ableiten:

Die REGR<sub>max</sub> könnte durch die Expressionsrate und den Grad der posttranslationalen Aktivierung von Zellwand-erweichenden Enzymen (Cosgrove 1999, Lee et al. 2003, Vissenberg et al. 2003) reguliert werden.

Bei konstanter Temperatur steigt die REGR<sub>max</sub> mit zunehmenden V<sub>Spitze</sub>-Werten auf ein Maximum an. Das erreichte Maximum der REGR<sub>max</sub>-Verteilung könnte durch die maximale Expressionsrate der beteiligten Enzyme oder durch einen Maximalwert der ‚Erweichbarkeit‘ der Zellwand bedingt sein.

Der Verlauf des maximalen REGR<sub>max</sub>-Wertes in Abhängigkeit von V<sub>Spitze</sub> (Abb. 6.4) wird vermutlich bei unterschiedlichen konstanten Temperaturen (im ‚steady state‘) durch die Veränderung von Diffusions-, Transport- und Reaktionsgeschwindigkeit beeinflusst. Bei steigenden Temperaturen werden höhere REGR<sub>max</sub>-Werte erreicht (RGT-Regel, Abb. 6.4). Die Kurve REGR<sub>max</sub> aufgetragen gegen V<sub>Spitze</sub> steigt bei höheren Temperaturen steiler an. Außerdem wird die Zellteilungsrate von der Temperatur beeinflusst (Carmona & Cuadrado 1986, Baskin 2000), so dass ein gleich langes Meristem bei niedrigen Temperaturen eine geringere und bei höheren Temperaturen eine grössere Zellproduktionsrate aufweist. Daher kann es auch sein, dass durch eine gesteigerte Anzahl an Zellen in der Streckungszone bei erhöhter Temperatur der maximale REGR<sub>max</sub>-Wert steigt.

V<sub>Spitze</sub> (akkumulierte Geschwindigkeit über den gesamten Streckungsbereich) wird sowohl durch Variation der REGR<sub>max</sub>, als auch durch die REGR<sub>max</sub>-Position, die REGR-Halbwertsbreite

sowie der Wachstumszonenlänge skaliert. Die drei letztgenannten Wachstumsparameter haben eine logistische Beziehung zu  $V_{\text{Spitze}}$  (Abb. 6.1 bis Abb. 6.3). Dieser logistische Verlauf könnte z.B. bewirkt werden, wenn die Zellen in einer bestimmten Zeit (oder relativen Position) nach Austritt aus dem Meristem ein Maximum der Expression von Zellwand-erweichenden Enzymen aufweisen würden und die Meristemlänge (inkl. Zellproduktionsrate) in einem bestimmten Bereich von  $V_{\text{Spitze}}$  (der Anstiegsphase der logistischen Kurve) zunehmen würde. Dabei würde die Meristemlänge im unteren  $V_{\text{Spitze}}$ -Bereich nahezu konstant bleiben und  $V_{\text{Spitze}}$  allein durch steigende  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Werte erhöht. In einem mittleren  $V_{\text{Spitze}}$ -Bereich würde die Meristemlänge in etwa linear zunehmen. Dadurch würde zum einen die  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position basalwärts verschoben sowie die REGR-Halbwertsbreite und die Wachstumszonenlänge (mehr Zellen, die sich strecken) vergrößert.

Es könnte sein, dass bei einer artspezifischen Maximallänge das Meristem nicht weiter vergrößert werden kann, so dass die drei logistisch im Verhältnis zu  $V_{\text{Spitze}}$  stehenden Wachstumsparameter einen oberen Plateauwert erreichen würden, wenn die maximale Meristemlänge erreicht ist. Diese artspezifische maximale Meristemlänge könnte auch vom Durchmesser der Wurzel abhängen, da das Meristem z.B. ausreichend mit Saccharose versorgt werden muss. Die Menge an Assimilaten, die zum das Wurzelapikalmeristem transportiert werden kann, hängt von der Phloem-Kapazität und damit auch vom Durchmesser der Wurzel ab.

Diese Hypothese wird durch folgende Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit und der Literatur unterstützt:

- Die Meristemgröße wächst proportional mit steigenden  $V_{\text{Spitze}}$ -Werten an (Kap. 5.3.1, Rost & Baum 1988, Beemster & Baskin 1998).
- Bei unterschiedlichen, zeitlich konstanten Temperaturen werden bei vergleichbaren Werten für  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position, REGR-Halbwertsbreite und die Wachstumszonenlänge bei höheren Temperaturen auch gesteigerte  $\text{REGR}_{\text{max}}$ - und  $V_{\text{Spitze}}$ -Werte erreicht (Pahlavanian & Silk 1988, Morris & Silk 1992, Nagel 2003).
- Die Zellteilungsrate ist temperaturabhängig (Carmona & Cuadrado 1986, Baskin 2000).
- Bei Variation des Wasserpotenzials nimmt nicht nur  $\text{REGR}_{\text{max}}$  ab, sondern die  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position verschiebt sich Richtung Apex, die REGR-Halbwertsbreite und die Wachstumszonenlänge nimmt ab (Sharp et al. 1988, Liang et al. 1997). Diese

Veränderungen lassen sich mit den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Beziehungen zwischen den Wachstumsparametern und  $V_{\text{Spitze}}$  beschreiben (Abb. 6.1 bis Abb. 6.4).

- Bei Variation der Nährlösungskonzentration von 0 mM (bidest) auf 5 bzw. 20 mM verändern sich  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$  sehr schnell, während die  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position, die REGR-Halbwertsbreite sowie die Wachstumszonenlänge nur langfristige abnehmen (Abb. 5.67, Abb. 5.68), was darauf hindeutet, dass die Verteilung der REGR durch ein Enzymexpressionsmuster bestimmt wird, während  $V_{\text{Spitze}}$  und  $\text{REGR}_{\text{max}}$  durch Turgorveränderungen beeinflusst werden, wie aus der Lockhart-Gleichung zu erwarten.
- Der Wurzeldurchmesser und  $V_{\text{Spitze}}$  verhalten sich proportional zueinander (Kap. 5.1.5, z.B. Liang et al. 1997, Thaler & Pagés 1996).
- Die Entfernung von der Wurzelspitze bei der das Protoxylem ausdifferenziert ist abhängig von  $V_{\text{Spitze}}$  (Wilcox 1954, Esau 1965, Rost & Baum 1988).
- Auch die Entfernung des ersten Protophloem-Elementes von der Wurzelspitze ist vermutlich proportional zu  $V_{\text{Spitze}}$  (Abb. 5.47)
- Veränderung der Meristemaktivität (DOF14-Inhibierung) wirkt sich auf die  $\text{REGR}_{\text{max}}$ -Position aus (Kap. 5.1.2.2).

Die vermutliche Übereinstimmung der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Verteilung der Wachstumsparameter in Bezug auf  $V_{\text{Spitze}}$  mit Werten aus der Literatur (Abb. 6.1 bis Abb. 6.4) legt die Vermutung nahe, dass diese auf viele experimentelle Daten anwendbar sein könnten und generelle Wachstumsregulierungsmechanismen widerspiegeln.

## 7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten in interdisziplinärer Zusammenarbeit große Fortschritte bei der Analyse von Wurzelwachstum erzielt werden, die in den nächsten Jahren für eine Vielzahl von systematischen Ansätzen bis zu Screening-Projekten genutzt werden kann. Durch die Kombination der DISP-Methode mit weiteren Verfahren zur Untersuchung von Wachstum oder anderen physiologischen Prozessen können tiefere Einblicke gewonnen werden. Folgende Gebiete erscheinen aus der Sicht der präsentierten Ergebnisse besonders interessant:

Die Optimierung der Kombination aus der DISP- und CycB1;1-GFP-Methode zur standardisierten parallelen Untersuchung der Zellteilung und Zellstreckung ist sehr erstrebenswert. Verbesserungen könnten durch die Ergänzung der 4D-Timelapse Aufnahme durch ein Wurzelfolgermodul sowie die weitere Automatisierung der Auswertung der CycB1;1-GFP-aktiven Zellen erreicht werden. Eine Ergänzung dieses Verfahrens durch den Einsatz von 2-Photonen Laser Scanning Mikroskopie (TPLSM) würde die Detektion verbessern, da bisher nur die Hälfte der Wurzel aufgenommen werden konnte mit Verringerung des Signal/Rausch Verhältnisses an den tiefer in der Wurzel gelegenen Stellen. TPLSM hat im Vergleich zur CLSM eine höhere Eindringtiefe und ermöglicht auch die Detektion von gestreuten Fluoreszenzphotonen (die Zellwände streuen das Licht relativ stark). Hierzu konnten erste erfolgversprechende Vorversuche durchgeführt werden. Auch ‚higher harmonics generation‘ Mikroskopie (HHG) verspricht die *in vivo* Visualisierung ohne externe Farbstoffapplikation von Proben, die geeignet geordnete Strukturen (z.B. Kollagen oder Membranstapel) aufweisen. Dabei ist ebenfalls die Beobachtung von tiefer in der Probe liegenden Strukturen möglich, weil das benutzte NIR-Licht wie bei der TPLSM besser eindringt. Von der HHG-Mikroskopie wird erwartet, dass sie weniger schädlich ist, da die benutzten Wellenlängen von biologischen Proben kaum absorbiert werden und bei der Erzeugung der ‚higher harmonics‘ die gleiche Energie wieder abgestrahlt wird, die auch absorbiert wurde. Diese Eigenschaften scheinen ideal für Studien des Meristems, da die Zellen bei der Zellteilung meist besonders empfindlich sind.

Generell ist die Untersuchung von Reportergenansätzen mit fluoreszierenden Proteinen (FP) wie z.B. GFP durch Bildsequenz-verarbeitende Methoden in Kombination mit der DISP-Technik sehr interessant. So ist z.B. denkbar die CycB1;1-GFP-Linie durch ein anderes Reportergenkonstrukt zu ergänzen, das beispielweise die Expansin-Aktivität durch ein andersfarbiges FP, wie z.B. DsRed (ein rot fluoreszierendes FP aus der Koralle *Discosoma*) anzeigt. Auch die Markierung der Zellwände durch ein FP wäre eine interessante Ergänzung der DISP- bzw. CycB1;1-

Methode, da mit diesem Ansatz auch die Zellgrößen in der Wachstumszone bestimmt werden könnten, die z.B. kinematische Berechnungen ermöglichen.

Molekularbiologische Untersuchungen, z.B. ein Vergleich der Expansin-Aktivität (und evtl. anderer Zellwand-erweichender Enzyme) zwischen verschiedenen Wachstumsbedingungen wie bidestilliertes Wasser und 20 mM Nährlösung, versprechen neue Erkenntnisse über die Regulation des Expansionswachstums. Auch Versuche mit rascher Variation der Umgebungslösung versprechen interessante Ergebnisse. So könnte mit Zugabe von Calcium-Lösungen ohne andere Nährelemente der Einfluss von Calcium auf die schnelle Wachstumsreaktion bei den Variationsexperimenten in Kapitel 5.2 genauer geklärt werden. Genauso wäre es interessant die umspülende Lösung von bidestilliertem Wasser auf  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Lösung und in einem weiteren Experiment auf  $\text{KNO}_3$ -Lösung zu ändern.

Die Kopplung der DISP-Methode mit Messverfahren, wie z.B. der Turgormessung durch Zelldrucksonden wäre vorteilhaft, um z.B. die raum-zeitlich hochaufgelösten Bestimmungen zur Dynamik des Wurzelwachstums bei Variation der Nährlösungskonzentration mit Turgorwerten ergänzen zu können. Auch die Untersuchung des Zellinhaltes von einzelnen Zellen in verschiedenen Bereichen der Wurzelwachstumszone mit Einzelzell-Kapilarelektrophorese, bietet eine Möglichkeit detailliertere Einblicke in die Wachstumsphysiologie zu gewinnen.

Bei der DISP-Methode besteht ebenfalls Optimierungspotential. So könnte beispielweise das Wachstum im Meristembereich höher aufgelöst werden. Dies wäre z.B. für den Vergleich der C24-Pflanzen von Interesse, da hier besonders im Meristem Unterschiede zwischen Wildtyp und Transformante bestehen. Der Einsatz schnellerer Rechner und Verschiebetische würde die Möglichkeit eröffnen, parallele Bildsequenzaufnahme einer größeren Anzahl an Objekten durchzuführen, was z.B. bei Screening von Transformanten sehr vorteilhaft ist. Somit würde einerseits die Analysedauer deutlich verkürzt, andererseits die Vergleichbarkeit erhöht, da die Wurzeln zeitgleich unter den selben Bedingungen aufgenommen werden. Auch eine Ergänzung um eine ‚Online‘-Auswertung, die bereits während der Aufnahme Werte darstellt, wäre sehr hilfreich, da damit frühzeitig erkannte Probleme bei der Auswertung durch die Neujustage der Aufnahmeparameter korrigiert werden könnten. Eine Kombination der DISP-Methode mit Bildsequenz-Analyse basierten Methoden auf der ganzen Pflanzenebene verspricht korrelative Vergleichsmöglichkeiten zwischen Pflanzen- und Organniveau.

Aufgrund des offenen Bauplans der Pflanzen und der Komplexität sowie Verflechtung der physiologischen Prozesse ist die Entschlüsselung der pflanzlichen Wachstumsregulation eine große Herausforderung, gleichzeitig aber auch ein sehr interessantes Forschungsgebiet.

## 8 Danksagung

Ganz herzlich sei an dieser Stelle allen gedankt, die zum Fortschritt dieser Arbeit durch wissenschaftlichen, sozialen, technischen und psychologischen Beistand beigetragen haben:

Prof. Uli Schurr danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas, gewinnbringende Diskussionen, zahlreiche Ideen und freundliche Unterstützung während der Arbeit. Prof. Dr. Thomas Rausch danke ich für die nette Unterstützung, hilfreiche Anregungen und die ‚Asylgewährung‘ in seiner Arbeitsgruppe während der Endphase der Arbeit.

Die gesamte Arbeitsgruppe Schurr hat meine Zeit als Doktorand durch viel Spass und wissenschaftliche Kooperation angenehmer gestaltet. Besonders möchte ich Achim danken, für viele schöne Erinnerungen aus dem Studium, sein Motivationstalent, wissenschaftliche Unterstützung und freundschaftliche Hilfe. Auch Frank, Maja, Andrés, Kerstin und Klaus haben zum Gelingen durch wissenschaftliche und technische Hilfe sowie motivierende Freizeitgestaltung stark beigetragen.

Ohne die interdisziplinäre Kooperation mit der Bildverarbeitungs-Forschergruppe wäre diese Arbeit nicht denkbar gewesen. Hier gilt mein Dank Prof. Bernd Jähne für die Bereitschaft zur interdisziplinären Zusammenarbeit und seine wissenschaftliche Unterstützung. Norbert, Hanno, Hagen, Dominik, Tobias, Ralf und Christoph und die anderen Mitglieder der Forschergruppe haben sich durch ihre Entwicklung der notwendigen Bildverarbeitungsprogramme, motivierte Zusammenarbeit, Geduld mit uns Botanikern und Freizeitgestaltung ein grosses Dank verdient.

Rainer, Jens und Timo von der ALMF am EMBL danke ich ganz herzlich für die Ermöglichung der CLSM-Arbeiten in dieser Arbeit, motivierende wissenschaftliche Diskussionen und Hilfestellung, die einen wichtigen Beitrag zum Fortschritt dieser Arbeit waren.

Prof. Peter Dörner und Prof. Bernd Müller-Röber danke ich für die zur Verfügungstellung der Arabidopsis-Transformanten und ihren wissenschaftlichen Beitrag an dieser Arbeit, die zu interessanten Versuchen geführt haben.

Der gesamten Arbeitsgruppe Rausch möchte ich für die freundliche Aufnahme ganz herzlich Danken. Besonders Steffen, Markus S., Markus K., Andreas, Maja, Jan, Christina und Sebastian haben durch anregende (auch wissenschaftliche) Diskussionen den Arbeitsalltag aufgelockert.

Auch wenn die AG Stitt schon länger nach Golm abgewandert ist, habe ich die motivierenden und freundschaftlichen Stunden nicht vergessen, hervorheben möchte ich hier besonders Tina, Cathrin, Michael und Petra – Tschakka!



## 9 Literatur

- Aguirrezabal, L. A. N., E. Deléens, and F. Tardieu. (1994) Root elongation rate is accounted for by intercepted PPFD and source-sink relations in field and laboratory-grown sunflower. *Plant, Cell and Environment* 17:443-450.
- Aguirrezabal, L. A. N., S. Pellerin, and F. Tardieu. (1993) Carbon nutrition, root branching and elongation: can the present state of knowledge allow a predictive approach at a whole-plant level? *Environmental Experimental Botany* 33:121-130.
- Al-Ghazi, Y., B. Muller, S. Pinloche, T. J. Tranbarger, P. Nacry, M. Rossignol, F. Tardieu, and P. Doumas. (2003) Temporal responses of *Arabidopsis* root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signalling. *Plant, Cell and Environment* 26:1053-1066.
- Arredondo, J. T. and D. A. Johnson. (1999) Root architecture and biomass allocation of three range grasses in response to nonuniform supply of nutrients and shoot defoliation. *New Phytologist* 143:373-385.
- Barghoorn, E. S. Jr. (1942) The effects of 1-proline on proliferation of cells and differentiation of protoxylem in roots of cotton and bean. *Growth* 6:23-31.
- Barlow, Peter W., P. Brain, and J. S. Parker. (1991) Cellular Growth in Roots of a Gibberellin-Deficient Mutant of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and its Wild-type. *Journal of Experimental Botany* 42:339-351.
- Barron, J. L. and A. Liptay. (1997) Measuring 3-D plant growth using optical flow. *Bioimaging* 5:82-86.
- Baskin, T. S. (2000) On the constancy of cell division rate in the root meristem. *Plant Molecular Biology* 43:545-554.
- Baskin, T. S. (2001) On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. *Protoplasma* 215:150-171.
- Baskin, T. S., A. Cork, R. Williamson, and J. R. Gorst. (1995) *STUNTED PLANT 1*, A Gene Required for Expansion in Rapidly Elongating but not in Dividing Cells and Mediating Root Growth Responses to Applied Cytokinin. *Plant Physiology* 107:233-243.
- Baskin, T. S., L. Remillong, and J. E. Wilson. (2001) The Impact of mannose and other carbon sources on the elongation and diameter of the primary root of *Arabidopsis thaliana*. *Australian Journal of Plant Physiology* 28:481-488.
- Baskin, T. S. and J. E. Wilson. (1997) Inhibitors of Protein Kinases and Phosphatases Alter Root Morphology and Disorganize Cortical Microtubules. *Plant Physiology* 113:493-502.
- Beemster, G. and T. S. Baskin. (1998) Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 116:1515-1526.

- Beemster, G. and T. S. Baskin. (2000) *STUNTED PLANT 1* Mediates Effects of Cytokinin, But not of Auxin, on Cell Division and Expansion in the Root of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124:1718-1727.
- Beemster, G., J. Masle, R. Williamson, and G. Farquhar. (1996) Effects of soil resistance to root penetration on leaf expansion in wheat (*Triticum aestivum* L.): kinematic analysis of leaf elongation. *J.Exp.Bot.* 47:1663-1678.
- Beemster, G., K. de Vusser, E. de Tavernier, K. de Bock, and D. Inzé. (2002) Variation in Growth Rate between *Arabidopsis* Ecotypes is Correlated with Cell Division and A-Type Cyclin-Dependent Kinase Activity<sup>1</sup>. *Plant Physiology* 129:854-864.
- Bengough, A. G. and C. J. MacKenzie. (1994) Simultaneous measurement of root force and elongation for seedling pea roots. *Journal of Experimental Botany* 45:95-102.
- Bigün, J. and G. H. Granlund. (1987) Optimal orientation detection of linear symmetry. *Proceedings of the First International Conference on Computer Vision, ICCV, London, UK.*
- Bilbrough, C. J. and M. M Caldwell. (1995) The effect of shading and N status on root proliferation in nutrient patches by the perennial grass *Agropyron desertorum* in the field. *Oecologia* 103:10-16.
- Blancaflor, E. B., J. M. Fasano, and S. Gilroy. (1998) mapping the functional roles of cap cells in the response of *Arabidopsis* primary roots to gravity. *Plant Physiology* 116:213-222.
- Brouquisse, R., A. Evrard, D. Rolin, P. Raymond, and C. Roby. (2001) Regulation of Protein Degradation and Protease Expression by Mannose in Maize Root Tips. Pi Sequestration by Mannose May Hinder the Study of Its Signaling Properties. *Plant Physiology* 125:1485-1498.
- Brumfield, Robert. T. (1942) Cell Growth and Division in Living Root Meristems. *American Journal of Botany* 29:533-543.
- Carmona, M. J. and A. Cuadrado. (1986) Analysis of growth components in *Allium cepa*. *Planta* 168:183-189.
- Casero, P. J., C. García-Sánchez, P. G. Lloret, and J. Navascués. (1989) Changes in cell length and mitotic index in vascular pattern-related pericycle cell types along the apical meristem and elongation zone of the onion root. *Protoplasma* 153:85-90.
- Cavallo, A. (2002) Four dimensional particle tracking in biological dynamic processes. Dissertation IWR, Universität Heidelberg.
- Chanson, A. and P.-E. Pilet. (1982) Transport and metabolism of [2<sup>14</sup>-C]-abscissic acid in maize roots. *Planta* 154:556-561.
- Cockcroft, C. E., B. G. W. den Boer, J. M. S Healy, and J. A. H. Murray. (2000) Cyclin D control of growth rate in plants. *Nature* 405:575-579.
- Colon-Carmona, A., R. You, T. Haimovitch-Gal, and P. Dörner. (1999) Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant Journal*:503-508.

- Cosgrove, D. J. (1986) Biophysical control of plant cell growth. *Annual Review of Plant Physiology* 37:377-405.
- Cosgrove, D. J. (1997) Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* 9:1031-1041.
- Cosgrove, D. J. (1998) Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiology* 118:333-339.
- Cosgrove, D. J. (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Ann.Rev.Plant Physiol.* 50:391-417.
- Cosgrove, D. J. (2000) New genes and new biological roles for expansins. *Current Opinion in Plant Biology* 3:73-78.
- Cramer, G. R., E. Epstein, and A. Läuchli. (1988) Kinetics of root elongation of maize in response to shortterm exposure to sodium chloride and elevated calcium. *Journal of Experimental Botany* 39:1513-1522.
- Darwin, C. (1880) *The Power of Movement in Plants*. London, UK: J. Murray.
- de Ruijter, N. C. A, J. Verhees, W. van Leeuwen, and A. R. van der Krol. (2003) Evaluation and Comparison of the GUS, LUC and GFP Reporter System for Gene Expression Studies in Plants. *Plant Biology* 5:103-115.
- De Tullio, M. C., C. Paciolla, F. Dalla Vecchia, N. Rascio, S. D'Emérico, L. De Gara, R. Liso, and O. Arrigoni. (1999) Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta* 209:424-434.
- De Veylder, L., T. Beeckman, G. Beemster, L. Krols, F. Terras, I. Landrieu, E. van der Schueren, S. Maes, M. Naudts, and D. Inzé. (2001a) Functional Analysis of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:1653-1667.
- De Veylder, L., G. Beemster, T. Beeckman, and D. Inzé. (2001b) CKS1At overexpression in *Arabidopsis thaliana* inhibits growth by reducing meristem size and inhibiting cell-cycle progression. *Plant Journal* 25:617-626.
- De Veylder, L., J. Joubes, and D. Inzé. (2003) Plant cell cycle transitions. *Current Opinion in Plant Biology* 6:31-38.
- Delhon, P., A. Gojon, P. Tillard, and L. Passama. (1995) 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.
- 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.
- Dierig, T. (2002) Gewinnung von Tiefenkarten aus Fokussierien. Dissertation IWR, Universität Heidelberg.

- Dixit, R. and R. Cyr. (2003) Cell damage and reactive oxygen species production induced by fluorescence microscopy: effect on mitosis and guidelines for non-invasive fluorescence microscopy. *Plant Journal* 36:280-290.
- Dolan, Liam, K. Janmaat, V. Willemsen, P. Linstead, R. S. Poethig, K. Roberts, and B. Scheres. (1993) Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119:71-84.
- Dörner, P. (1994) Cell Cycle Regulation in Plants. *Plant Physiology* 106:823-827.
- Dörner, P. (2000) Root patterning: does auxin provide positional cues? *Current Biology*:R201-R203.
- Dörner, P. (2003) Plant Meristems: A Merry-Go-Round of Signals. *Current Biology* 13:R368-R374.
- Dörner, P., J. E. Jorgensen, R. You, J. Steppuhn, and C. Lamb. (1996) Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* 380:520-523.
- Edwards, K. L. and T. K. Scott. (1974) Rapid growth response of corn root segments: effects of pH on elongation. *Planta* 119:27-37.
- Erickson, R. O. and K. B. Sax. (1956) Rates of cell division and cell elongation in the growth of primary root of *Zea mays*. *Proc Am Phil Soc* 100:499-514.
- Esau, K. (1965) *Vascular differentiation in plants*. New York: Holt, Rinehart and Winston.
- Ferreira, P., A. Hemerly, J. Almeida Engler, C. Bergounioux, S. Burssens, M. Van Montagu, G. Engler, and D. Inzé. (1994) Three discrete classes of *Arabidopsis* cyclins are expressed during different intervals of the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:11313-11317.
- Fiorani, F., G. Beemster, L. Bultynck, and H. Lambers. (2000) Can Meristematic Activity Determine Variation in Leaf Size and Elongation Rate among Four *Poa* Species? A Kinematic Study<sup>1</sup>. *Plant Physiology* 124:845-856.
- Fraser, T. E., W. K. Silk, and T. L. Rost. (1990) Effects of low water potential on cortical cell length in growing regions of maize roots. *Plant Physiology* 93:648-651.
- Freixes, S., M. C. Thibaud, F. Tardieu, and B. Muller. (2002) Root elongation and branching is related to local hexose concentration in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant, Cell and Environment* 25:1357-1366.
- Frensch, J. and T. C. Hsiao. (1994) Transient responses of cell turgor and growth of maize roots as affected by changes in water potential. *Plant Physiology* 104:247-254.
- Fujie, M., H. Kuroiwa, S. Kawano, and T. Kuroiwa. (1993) Studies on the behaviour of organelles and their nucleoids in the root apical meristem of *Arabidopsis thaliana* (L.) Col. *Planta* 189:443-452.
- Gasche, N. (2001) Etablierung und Anwendung digitaler Bildsequenzverarbeitung zur Wuchsanalyse an Kartoffelwurzeln. Diplomarbeit Botanisches Institut, Universität Heidelberg.

- Gerendas, J. and U. Schurr. (1999) Physicochemical aspects of ion relations and pH regulation in plants - a quantitative approach. *Journal of Experimental Botany* 50:1101-1114.
- Goodwin, R. H. and W. Stepka. (1945) Growth and differentiation in the root tip of *Pbleum pratense*. *American Journal of Botany* 32:36-46.
- Green, P. B. (1976) Growth and cell pattern formation on an axis: critique of concepts, terminology and modes of study. *Botanical Gazette* 137:187-202.
- Gunning, B. E. S. and A. R. Hardham. (1982) Microtubules. *Annual Review of Plant Physiology* 33:651-698.
- Hansen, G. K. (1977) Adaption to photosynthesis and diurnal oscillation of root respiration rates for *Lolium multiflorum*. *Physiologia Plantarum* 39:275-279.
- Haußecker, H. and H. Spies. (1999) Motion. In *Handbook of Computer Vision and Applications*, edited by Jähne, B., H. Haußecker, and P. Geißler (San Diego, CA, USA: Academic Press).
- Hejnowicz, Z. (1959) Growth and Cell Division in the Apical Meristem of Wheat Roots. *Physiologia Plantarum* 12:124-138.
- Hellebust, J. A. and D. F. Forward. (1962) The invertase of the corn radicle and its activity in successive stages of growth. *Canadian Journal of Botany* 40:113-126.
- Hemerly, A., J. Almeida Engler, C. Bergounioux, M. Van Montagu, G. Engler, D. Inzé, and P. Ferreira. (1995) Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO Journal* 14:3925-3936.
- Himanen, K., E. Boucheron, S. Vanneste, J. de Almeida Engler, and D. Inzé. (2002) Auxin-Mediated Cell Cycle Activation during Early Lateral Root Initiation. *Plant Journal* 14:2339-2351.
- Hoagland, D. R. and D. J. Arnon. (1938) The Water Cultured Method for Growing Plants without soils. *California Agricultural Experimental Station Circular* no. 347, University of California, Berkeley, CA, USA.
- Ingestad, T. (1982) Relative addition rate and external concentration; Driving variables used in plant nutrition research. *Plant, Cell and Environment* 5:443-453.
- Ingestad, T. and Göran I. Agren. (1992) Theories and methods on plant nutrition and growth. *Physiologia Plantarum* 84:177-184.
- Inzé, D. (2003) Why should we study the plant cell cycle. *Journal of Experimental Botany* 54:1125-1126.
- Ishikawa, H. and M. L. Evans. (1993) The role of the distal elongation zone in the response of maize roots to auxin and gravity. *Plant Physiology* 102:1203-1210.
- Ishikawa, H. and M. L. Evans. (1995) Specialized Zones of Development in Roots. *Plant Physiology* 109:725-727.

- Ivanov, V. B. and J. G. Dubrovsky. (1997) Estimation of the cell cycle duration in the root apical meristem: a model of linkage between cell cycle duration, rate of cell production and rate of root growth. *International Journal of Plant Sciences* 158:757-763.
- Jarvis, M. C. (1982) The proportion of calcium-bound pectin in plant cell walls. *Planta* 154:344-346.
- Jähne, B. (2002) *Digitale Bildverarbeitung*. 5. Auflage Heidelberg: Springer Verlag.
- Kang, J. and F. J. Turano. (2003) The putative glutamate receptor 1.1 (*AtGLR1.1*) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:6872-6878.
- King, R. W., R. J. Deshaies, J. M. Peters, and M. W. Kirschner. (1996) How Proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274:1652-1659.
- Kirchgessner, N. (2003) Extraktion physiologischer Koordinatensysteme von Pflanzenwurzeln und -blättern aus Bildsequenzen. Dissertation IWR, Universität Heidelberg.
- Kristie, D. M. and P. A. Joliffe. (1986) High-resolution studies of growth oscillations during stem elongation. *Canadian Journal of Botany* 64:2399-2405.
- Küsters, R. (2001) Objektverfolgung und Bildfusion zur Untersuchung wachsender Pflanzenwurzeln. Diplom Universität Köln.
- Lee, D.-K., J. H. Ahn, S.-K. Song, Y. D. Choi, and J. S. Lee. (2003) Expression of an Expansin Gene Is Correlated with Root Elongation in Soybean. *Plant Physiology* 131:985-997.
- Lejay, L., X. Gansel, M. Cerezo, P. Tillard, C. Müller, A. Krapp, N. von Wirén, F. Daniel-Vedele, and A. Gojon. (2003) Regulation of Root Ion Transporters by Photosynthesis: Functional Importance and Relation with Hexokinase. *Plant Cell* 15:2218-2232.
- Liang, B. M., R. E. Sharp, and T. S. Baskin. (1997) Regulation of growth anisotropy in well-watered and water-stressed maize roots: I. Spatial distribution of longitudinal, radial, and tangential expansion rates. *Plant Physiology* 115:101-111.
- Lockhart, J. A. (1965) An analysis of irreversible plant cell elongation. *Journal of Theoretical Biology* 8:264-275.
- Ma, Z., T. S. Baskin, K. M. Brown, and J. P. Lynch. (2003) Regulation of Root Elongation under Phosphorus Stress Involves Changes in Ethylene Responsiveness. *Plant Physiology* 131:1381-1388.
- Migliaccio, F. and S. Piconese. (2001) Spiralizations and tropisms in *Arabidopsis* roots. *Trends Plant Sci.* 6:561-565.
- Morris, A. K. and W. K. Silk. (1992) Use of a flexible logistic function to describe axial growth of plants. *Bulletin of Mathematical Biology* 54:1069-1081.
- Mullen, J. L., H. Ishikawa, and M. L. Evans. (1998a) Analysis of changes in relative elemental growth rate patterns in the elongation zone of *Arabidopsis* roots upon gravistimulation. *Planta* 206:598-603.

- Mullen, J. L., E. Turk, K. Johnson, C. Wolverton, H. Ishikawa, C. Simmons, D. Soll, and M. L. Evans. (1998b) Root-growth behavior of the *Arabidopsis* mutant rgr1. Roles of gravitropism and circumnutation in the waving/coiling phenomenon. *Plant Physiol* 118:1139-1145.
- Muller, B., M. Stosser, and F. Tardieu. (1998) Spatial distributions of tissue expansion and cell division rates are related to irradiance and to sugar content in the growing zone of maize roots. *Plant, Cell and Environment* 21:149-158.
- Murashige, T. and F. Skoog. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Nagel, K. (2003) Temperaturabhängigkeit der dynamischen Interaktion zwischen Blatt- und Wurzelwachstum bei *Zea mays*. Diplom HIP, Universität Heidelberg.
- Neufeld, T. P. and B. A. Edgar. (1998) Connections between growth and the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology* 10:784-790.
- Newman, I. A. (2001) Ion transport in roots: measurement of fluxes using ion-selective microelectrodes to characterize transporter function. *Plant, Cell and Environment* 24:1-14.
- Odhnoff, C. (1963) The effect of gibberillin and phenylboric acid on xylem differentiation and epidermal cell elongation in bean roots. *Physiologia Plantarum* 16:474-483.
- Okada, K. and Y. Shimura. (1990) Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* 250:274-276.
- Pahlavanian, A. and W. K. Silk. (1988) Effect of temperature on spatial and temporal aspects of growth in the primary maize root. *Plant Physiology* 87:529-532.
- Pilet, P.-E., J.-M. Versel, and G. Mayor. (1983) Growth distribution and surface pH patterns along maize roots. *Planta* 158:398-402.
- Potuschak, T. and P. Dörner. (2001) Cell cycle controls: genome-wide analysis in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:501-506.
- Quader, H., G. Deichgräber, and E. Schnepf. (1986) The Cytoskeleton of *Cobaea* seed hairs: Patterning during cell-wall differentiation. *Planta* 168:1-10.
- Riou-Khamlichi, C., M. Menges, J. M. S Healy, and J. A. H. Murray. (2000) Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Molecular and Cellular Biology* 20:4513-4521.
- Rosenkranz, H., R. Vogel, S. Greiner, and T. Rausch. (2001) In wounded sugar beet (*Beta vulgaris* L.) tap-root, hexose accumulation correlates with the induction of a vacuolar invertase isoform. *Journal of Experimental Botany* 52:2381-2385.
- Rost, T. L. and S. Baum. (1988) On the correlation of primary root length, meristem size and protoxylem tracheary element position in pea seedlings. *American J. of Botany* 75:414-424.
- Sachs, J. (1887) *Vorlesung über Pflanzen-Physiologie*. Leipzig: Wilhelm Engelmann.

- Sacks, M. M., W. K. Silk, and P. Burman. (1997) Effect of Water Stress on Cortical Cell Division Rates within the Apical Meristem of Primary Roots of Maize. *Plant Physiology* 114:519-527.
- Santi, S., G. Locci, R. Monte, R. Pinton, and Z. Varanini. (2003) Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-Affinity nitrate transporter and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms. *Journal of Experimental Botany* 54:1851-1864.
- Scharr, H. (2000) Optimale Operatoren in der Digitalen Bildverarbeitung. Dissertation IWR, Universität Heidelberg.
- Scheible, W. R., M. Lauerer, E. D. Schulze, M. Caboche, and M. Stitt. (1997) Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant Journal* 11:671-691.
- Schmundt, D., M. Stitt, B. Jähne, and U. Schurr. (1998) Quantitative analysis of local growth rates of dicot leaves at high temporal and spatial resolution, using image sequence analysis. *Plant Journal* 16:505-514.
- Schopfer, P., A. Liskay, M. Bechtold, G. Frahry, and A. Wagner. (2002) Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* 214:821-828.
- Schurr, U. (1997) Growth physiology and measurement of growth. In *Progress in Botany*, edited by Behnke, H. D., U. Lüttge, K. Esser, J. W. Kadereit, and M. Runge Vol. 59, (Berlin: Springer Verlag).
- Shabala, S. N. and I. A. Newman. (1997) Proton and calcium flux oscillations in the elongation region correlate with root nutations. *Physiologia Plantarum* 100:917-926.
- Sharp, R. E., T. C. Hsiao, and W. K. Silk. (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., W. K. Silk, and T. C. Hsiao. (1988) Growth of the Maize Primary Root at low Water Potentials. I. Spatial Distribution of Expansive Growth. *Plant Physiology* 87:50-57.
- Silk, W. K. (1984) Quantitative Descriptions of Development. *Ann.Rev.Plant Physiol.* 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., R. C. Walker, and J. Labavitch. (1984) Uronide deposition rates in the primary root of *Zea mays*. *Plant Physiology* 74:721-726.
- Simmons, C., D. Söll, and F. Migliaccio. (1995) Circumnutation and gravitropism cause root waving in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 46:143-150.
- Smeekens, S. C. M. (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51:49-81.

- Spies, H. (2001) Analysing Dynamic Processes in Range Data Sequences. Phd IWR, Universität Heidelberg.
- Spies, H. and H. Scharr. 2001. Accurate Optical Flow in Noisy Image Sequences. 2001, at Vancouver, Canada.
- Spollen, W. C. and R. E. Sharp. (1991) Spatial distribution of turgor and root growth at low water potentials. *Plant Physiology* 96:438-443.
- Stitt, M. (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology* 2:178-186.
- Strasburger, E. (1998) *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. Edited by Sitte, P., H. Ziegler, F. Ehrendorfer, and A. Bresinsky. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Gustav Fischer Verlag.
- Sundblad, L-G., P. Geladi, A. Dunberg, and B. Sundberg. (1998) The use of image analysis and automation for measuring mitotic index in apical conifer meristems. *Journal of Experimental Botany* 49:1749-1756.
- Taiz, L. (1984) Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Annual Review of Plant Physiology* 35:585-657.
- Taiz, L. and E. Zeiger. (2000) *Physiologie der Pflanzen*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Thaler, P. and L. Pagés. (1996) Root apical diameter and root elongation rate of rubber seedlings (*Hevea brasiliensis*) show parallel responses to photoassimilate availability. *Physiologia Plantarum* 97:365-371.
- Toko, K., S. Iiyama, C. Tanaka, K. Hayashi, K. Yamafuji, and K. Yamafuji. (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. and J. Pritchard. (1994) Biophysical and biochemical control of cell expansion in roots and leaves. *Journal of Experimental Botany* 45:1721-1731.
- Trewavas, A. J. (1983) Nitrate as a plant hormone. In *British Plant Growth Regulator Group Monograph 9*, edited by Jackson, M. B. (Oxford, UK).
- Trewavas, A. J. and R. Malhó. (1997) Signal perception and transduction: the origin of the phenotype. *Plant Cell* 9:1181-1195.
- van der Weele, C. M., H. S. Jiang, K. K. Palaniappan, V. B. Ivanov, K. Palaniappan, and T. S. Baskin. (2003) A New Algorithm for Computational Image Analysis of Deformable Motion at High Spatial and Temporal Resolution Applied to Root Growth.<sup>1</sup> *Plant Physiology* 132:1138-1148.
- van der Weele, C. M., W. C. Spollen, R. E. Sharp, and T. S. Baskin. (2000) Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany* 51:1555-1562.

- Vandepoele, K., J. Raes, L. De Veylder, P. Rouze, S. Rombauts, and D. Inzé. (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:903-916.
- Verbelen, J. P. and S. Kerstens. (2000) Polarization confocal microscopy and congo red fluorescence: a simple and rapid method to determine the mean cellulose fibril orientation in plants. *Journal of Microscopy* 198:101-107.
- Verbelen, J. P. and D. Stickens. (1994) In vivo determination of fibril orientation in plant cell walls with polarization CLSM. *Journal of Microscopy* 177:1-6.
- Virk, S. S. and R. E. Cleland. (1988) Calcium and the mechanical properties of soybean cell walls: possible role of calcium and protons in cell-wall loosening. *Planta* 176:60-67.
- Vissenberg, K., I. M. Martinez-Vilchez, J. P. Verbelen, J. G. Miller, and S. C. Fry. (2000) *In Vivo* Colocalization of Xyloglucan Endotransglycosylase Activity and Its Donor Substrate in the Elongation Zone of *Arabidopsis* Roots. *Plant Cell* 12:1229-1237.
- Vissenberg, K., V. van Sandt, S. C. Fry, and J. P. Verbelen. (2003) Xyloglucan endotransglycosylase action is high in the root elongation zone and in the trichoblasts of all vascular plants from *Selaginella* to *Zea mays*. *Journal of Experimental Botany* 54:335-344.
- Walter, A. (2001) Räumliche und zeitliche Wachstumsmuster in Wurzeln und Blättern dikotyler Pflanzen. Dissertation Botanisches Institut der Universität Heidelberg.
- Walter, A., R. Feil, and U. Schurr. (2003) Expansion dynamics, metabolite composition and substance transfer of the primary root growth zone of *Zea mays* L. grown in different external nutrient availabilities. *Plant, Cell and Environment* 26:1451-1466.
- Walter, A., U. Schurr, and W. K. Silk. (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.
- Walter, A., H. Spies, S. Terjung, R. Kirchgeßner N. Küsters, and U. Schurr. (2002) Spatio-temporal dynamics of expansion growth in roots: automatic quantification of diurnal course and temperature response by digital image sequence processing. *Journal of Experimental Botany* 53:1-10.
- Wang, H., Q. Qi, P. Schorr, A. J. Cutler, W. L. Crosby, and L. C. Fowke. (1997) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant Journal* 15:501-510.
- Wang, H., Y. Zhou, S. Gilmer, S. Whitwil, and L. C. Fowke. (2000) Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant Journal* 24:613-623.
- Warneck, H. M., D. C. Fulton, H. Seitz, and S. C. Fry. (1998) Transport, degradation and cell wall-integration of XXFGol, a growth-regulating nonasaccharide of xyloglucan, in pea stems. *Planta* 204:78-85.
- Webster, P. L. and R. D. MacLeod. (1980) Characteristics of root apical meristem cell population kinetics: a review of analyses and concepts. *Environmental Experimental Botany* 20:335-358.

- 
- Wilcox, H. (1954) Primary organization of active and dormant roots on noble fir, *Abies procera*. *American Journal of Botany* 41:812-821.
- Wilms, S. (1998) Über Anwendungsmöglichkeiten der Zwei-Photonen Laser Scanning Mikroskopie in der Biologie. Staatsexamensarbeit Universität Heidelberg.
- Wolverton, C., J. L. Mullen, H. Ishikawa, and M. L. Evans. (2002) Root gravitropism in response to a signal originating outside of the cap. *Planta* 215:153-157.
- Wu, Y. and D. J. Cosgrove. (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.
- Xu, J., G. H. Pemberton, E. C. Almira, D. R. McCarthy, and K. E. Koch. (1995) The *Ivr1* Gene for Invertase in Maize. *Plant Physiology* 108:1293-1294.
- Zhang, H. and B. G. Forde. (1998) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279:407-409.
- Zhang, H. and B. G. Forde. (2000) Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany* 51:51-59.
- Ziegenspeck, H. (1948) Die Emission polarisierten Fluoreszenzlichtes (Difluoreszenz) durch gefärbte Zellulose und Kutinmembranen von Pflanzen. *Mikroskopie* 3:72-83.