

Charakterisierung und Regulation der stofflichen
Zusammensetzung der Apoplastenlösung in den
Gefäßleitbahnen der Sprossachsen von
Populus balsamifera L.

Dissertation
zur Erlangung eines Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Stefan Franke

Kiel 2002

Referent: Prof. Dr. J.J. Suter:

Koreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

zum Druck genehmigt:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	5
2.1	Versuchsmaterial	5
2.2	Versuchsaufbau und Durchführung der Perkolationsexperimente	5
2.3	Messung des pH im Gefäßwasser	8
2.3.1	pH- Messung	8
2.3.2	Meßwerterfassung und -auswertung mit einer PC-Datenerfassungskarte	8
2.4	Ionenanalytik	9
2.4.1	AAS	9
2.4.2	HPLC	9
2.4.3	Ionenselektive Elektroden	10
2.4.4	Bilanzierung der Abgabe von Kationen	10
2.5	Methodische Vorversuche	11
2.5.1	Einfluß des Atmungs- CO ₂ auf den gemessenen pH . .	11
2.5.2	Einfluß der Tageszeit auf pH und Ionengehalt	11
2.5.3	Einfluß der Lage des Sprosssegmentes am Astabschnitt	13
2.5.4	Einfluß der Perkulationsgeschwindigkeit auf pH und Ionengehalt im Perkolat	13
2.5.5	Perkolation mit vier Parallelansätzen	18
3	Ergebnisse	21
3.1	Jahresgang von pH und Ionen im Gefäßwasser	21
3.1.1	pH im frisch gewonnenen Gefäßwasser	22

INHALTSVERZEICHNIS

3.1.2	Kationen im frisch gewonnenen Gefäßwasser	22
3.1.3	Menge des gewonnenen Gefäßwassers und Perkolations- geschwindigkeit	27
3.2	Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang	29
3.2.1	Regulation des pH im Gefäßwasser bei Vorlage von saurem Medium	30
3.2.2	Regulation des pH im Gefäßwasser bei Vorlage von alkalischem Medium	30
3.2.3	Regulation der Ionen im Gefäßwasser bei unterschied- lichen pH- Bedingungen	32
3.2.4	Langzeitexperimente	43
3.2.5	Jahreszeitliche Veränderung des Regulationsvermögens des pH bei Vorlage von Medium mit pH 3	45
3.2.6	Unterbrechung der Zufuhr von saurem Medium	45
3.2.7	Lagerung des geernteten Sprosses bei Zimmertemperatur	50
3.2.8	Einfluß von Komplexbildnern (EDTA) auf die Freiset- zung von Kationen und auf die pH- Regulation	50
3.2.9	Quantifizierung der Kationenabgabe am Gefäßwand- apoplasten	52
3.3	Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte	55
3.3.1	pH- Regulation bei Angebot der Kationen Na, K, Mg und Ca als Chloride und Gluconate	55
3.3.2	Regulation der Kationen bei Perkolations mit KCl und K-Gluconat im Vergleich	58
3.3.3	Regulation der Kationen bei Angebot der Kationen Na, K, Mg und Ca als Gluconate	59
3.3.4	Angebot von weiteren mehrwertigen Kationen wie Ca, La, Mn und Mg in Chloridform	62
3.3.5	Angebot von Barium	65
3.4	Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation	68
3.4.1	Blockierung der K- Abgabe aus dem Symplasten in die Gefäße	69
3.4.2	Blockierung der Aufnahme von Kalium in den Symplasten	75

INHALTSVERZEICHNIS

3.4.3	Hemmung der pH- Regulation durch CsCl im neutralen und sauren Medium	77
3.5	Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung	87
3.5.1	2,4-D	87
3.5.2	2,4-DNP	90
3.5.3	PCBM	91
3.5.4	CCCP	91
3.5.5	NEM	94
3.5.6	KCN	97
3.5.7	Hemmstoffe und Kanalblocker im Vergleich	98
3.5.8	Zeitverzögerter Einsatz der Hemmstoffe	99
4	Diskussion	101
4.1	Das Pappelholz als Untersuchungssystem	101
4.2	Kritische Betrachtung der angewandten Methodik	102
4.3	Perkulationsgeschwindigkeit	103
4.4	Der pH im Gefäßwasser	104
4.5	Kationengehalt im Gefäßwasser	105
4.5.1	Die Zellwände als Kationenaustauscher	105
4.5.2	Austauschvorgänge mit dem Gefäßwasser	106
4.5.3	Jahresgang der Kationen im Gefäßwasser	106
4.6	Regulation von pH und Ionen im Gefäßwasser	108
4.7	Ladungsbilanzen	110
4.8	Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte	111
4.9	Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation	112
4.9.1	Blockierung der K- Abgabe aus dem Symplasten in die Gefäße	113
4.9.2	Blockierung der Aufnahme von Kalium in den Symplasten	114
4.9.3	pH- Regulation	115
4.10	Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung	116

INHALTSVERZEICHNIS

4.10.1	2,4-D	116
4.10.2	2,4-DNP	117
4.10.3	PCMB	117
4.10.4	CCCP	117
4.10.5	NEM	118
4.10.6	KCN	118
4.10.7	Zeitverzögerter Einsatz der Hemmstoffe	119
5	Zusammenfassung	120
6	Literatur	122

Kapitel 1

Einleitung

Der Nährstofftransport erfolgt bei den Höheren Pflanzen auf dem Weg von der Wurzel bis ins Blatt meist über sehr lange Strecken im Apoplast, das heißt, in den Gefäßbahnen als den spezialisierten Elementen des Wasserferntransportes. Dieser lange Weg bedeutet einerseits einen enormen Zellwandraum, der in den Gefäßen für Speicher- und Austauschvorgänge von Ionen zur Verfügung steht, zum anderen wird diese Transportbahn von speziellen, gefäßbegleitenden Parenchymzellen gesäumt, die einen wesentlichen Einfluß auf die Art und Zusammensetzung der im Apoplasten geleiteten Substanzen ausüben (Läuchli et al. 1971). Ferner sind diese Zellen entscheidend an der pH- Regulation im Apoplasten beteiligt (Fromard et al. 1995). Umfangreiche Speicherungs- und Austauschvorgänge sind somit möglich, die Gegenstand der hier dargestellten Untersuchungen waren.

Diese Untersuchungen können zum grundlegenden Verständnis der Schnittstelle zwischen Symplast und Apoplast beitragen. Sie liefern auch das notwendige Basiswissen für angewandte Fragestellungen. So zeigt sich etwa bei der Waldschadensproblematik, bei der insbesondere auch der Frage nach der Ernährungssituation geschädigter und nicht geschädigter Bäume großes Interesse entgegengebracht wurde (Schröder et al. 1988, Stienen et al. 1984, Stienen und Bauch 1988), der dringende Bedarf an Grundlagenforschung auf diesem Gebiet.

Das Holzstrahlparenchym erfüllt eine wichtige Funktion als Leit- und Speichergewebe für Assimilate und Reservestoffe (Kozłowski und Keller 1966, Sauter und van Cleve 1994). Im Laufe des Sommers werden in das Holzstrahlparenchym Photosyntheseprodukte eingeleitet, angereichert und für die nächste Wachstumsperiode gelagert. Das Gewebe zeichnet sich durch eine hohe Stoffwechselaktivität aus, die ebenso wie das Speichern der Reservestoffe mit jahreszeitlichen Änderungen vor sich geht (Sagisaka 1982; Sauter 1966a, b, c). Neben Fetten, Proteinen, Aminosäuren und Amidinen treten vor allem Stärke und andere Speicherkohlenhydrate in jahreszeitlich wechselnd

1. Einleitung

den Konzentrationen auf (Nelson und Dickson 1981, Sagisaka 1972, Sauter 1966a, Sauter und Ambrosius 1986, Sauter und Witt 1997, Elle und Sauter 2000). Dabei sind die Austauschvorgänge zwischen dem Holzstrahlparenchym und den vertikal verlaufenden Wasserleitelementen über die paratrachealen Kontaktzellen von besonderem Interesse. Dabei interessiert z.B. die Frage, ob und inwieweit parallel zu der Aminosäureabgabe in die Xylembahnen im Frühjahr (Sauter und van Cleve 1992) auch eine Ionenmobilisation in den paratrachealen Zellen erfolgt.

Die Holzstrahlzellen im Pappelholz sind Gegenstand vielfältiger Untersuchungen gewesen. Sie dienten als Modellsystem zur Untersuchung physiologischer und ultrastruktureller Abläufe (Sauter und Kloth 1986, 1987) in parenchymatischen Zellen von Bäumen während der verschiedenen Stadien eines Jahres. Jahresperiodische Zyklen im Gehalt einzelner Speicherstoffe wie Stärke (Sauter 1988a), Speicherproteine (Sauter und van Cleve 1990), Fette (Sauter und van Cleve 1994), verschiedene Zucker (Sauter und van Cleve 1994) wurden schon genau untersucht und Veränderungen bei Mobilisation, Deposition und auch während der Winterruhe verfolgt. Dabei wurde ein spezifisches H⁺/Glucose Aufnahmesystem entdeckt (Himpkamp 1988).

Der Jahresgang des pH sowie die Gehalte von Zuckern (Sauter 1988b, Sauter und van Cleve 1994, Witt und Sauter 1994a, b) und Aminosäuren (Sauter und van Cleve 1992) im Gefäßwasser waren Gegenstand einer Reihe von Untersuchungen. Über anorganische Ionen im Gefäßwasser liegen dagegen von *Populus* noch keine Erkenntnisse vor.

Auch für andere Baumarten wurden Jahresgänge der Gehalte von Kationen (Tromp 1979, Glavac et al. 1990a, b), Zuckern (Sauter 1973, 1982) und Aminosäuren (Tromp und Ovaa 1967, Sauter 1976) im Gefäßwasser und der Speicherstoffe wie Stärke, Proteine und Zucker (Sauter und Wellenkamp 1998) im Holzstrahlparenchym aufgenommen.

Durch methodische Fortschritte bei der Untersuchung von Membranen, insbesondere der „patch clamp“-Technik Anfang der 80er Jahre rückte die Analyse ionenselektiver Kanalproteine, der Ionenkanäle, in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses (Sanders und Tester 1997). Für Ionenkanäle lassen sich Modelle auf verschiedenen Ebenen erstellen: mathematische Modelle, Zustandsmodelle, physikalische, strukturelle und molekulardynamische Modelle (Hansen et al. 1996).

Für Kalium sind verschiedene Ionenkanäle bekannt. Nach der Transportrichtung lassen sich einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (KIRC) (Hedrich und Becker 1994, Roberts und Tester 1997) und auswärtsgerichtete Kaliumkanäle (KORC) (Findlay et al. 1994, Schröder 1988), unterscheiden. Aus der Plasmamembran von Xylemparenchymzellen sind KIRC (Wegner und Raschke

1. Einleitung

1994, Maathuis und Sanders 1997, de Boer und Wegner 1997) und KORC bekannt (Giromini et al. 1997, de Boer und Wegner 1997). Zudem sind nicht selektive Kanäle (NORC) bekannt (Wegner und Raschke 1994). Kaliumkanäle können durch Depolarisation oder durch Hypopolarisation aktiviert werden (Hoth et al. 1997, Hedrich und Becker 1994, de Boer und Wegner 1997). Verschiedene Kaliumkanäle werden durch unterschiedliche Gene bestimmt (Anderson et al. 1992, Sentenac et al. 1992, Bertl et al. 1995, 1997). Mit Hilfe klonierter cDNA konnten Membranen mit durch Mutationen veränderten Ionenkanälen erzeugt werden. Auch für weitere Kationen und Anionen sind Ionenkanäle bekannt, etwa für Na^+ in Maiswurzeln (Roberts und Tester 1997), Ca^{++} (Geitmann und Cresti 1997), Cl^- bei *Chara* (Mc Culloch et al. 1997, Plieth et al. 1997) und Malat (Cheffings et al. 1997).

Um ein Gleichgewicht der elektrischen Ladungen aufrecht zu erhalten, ist der Kaliumabnahme jedoch eine Protonenabgabe aus den Xylemparenchymzellen entgegengerichtet (de Boer und Wegner 1997, Kelly et al. 1995). Der Ionentransport durch Membranen ist oft ein Cotransport: Sowohl ein Symport von K^+/H^+ (Maathuis und Sanders 1995, 1997) als auch ein Symport H^+/Cl^- (Sanders 1984, Mc Culloch et al. 1997) sind bekannt. Eine charakteristische Eigenschaft der Kaliumkanäle ist ihre leichte Blockierbarkeit durch extrazelluläre Kationen (Hille 1992). Zum Nachweis von Ionenkanälen, ihrer Identifizierung und dem Nachweis ihrer Selektivität wird eine Reihe von Kanalblockern eingesetzt. Während die Kanalproteine KAT1 und KST1 durch Cs^+ , TEA^+ und Ba^{++} blockiert werden (Hedrich et al. 1995, Müller-Röber et al. 1995, Anderson et al. 1992), wird KST1 auch durch extrazelluläres Zn^{++} blockiert. Bertl et al. (1997) wiesen für TEA^+ , Ba^{++} und Cs^+ eine deutliche, für Na^+ und NH_4^+ eine schwache Hemmung nach, wobei sich die Stärke der Hemmung zwischen den Kanalproteinen KAT1 und KST1 unterschied. Neben den Ionenkanälen sind Protonenpumpen als weitere Elektroenzyme von Bedeutung. Fromard et al. (1995) wies in parenchymatischen Begleitzellen im Holz von *Robinia* eine plasmamembrangebundene H^+ -ATPase nach.

In der vorliegenden Arbeit wurde am Modellsystem der Wasserleitbahnen im Holz von Pappelzweigen (*Populus balsamifera* L.) eine Quantifizierung und nähere Untersuchung des hier vorliegenden apoplastischen Speicher- und Transportraumes vorgenommen. In Perkolationsversuchen wurden die pH-Regulation in den Gefäßbahnen, die vorliegenden freien und gebundenen Ionen im Jahreszyklus, die Ionenaustausch- und Bindungskapazität der Gefäßwände, deren Austauschverhalten bei unterschiedlichen pH-Bedingungen sowie der Einfluß von konkurrierenden Ionen auf pH und Zusammensetzung des Gefäßwassers untersucht. Weiterhin wurde versucht, mit Hilfe von Blockern der Kaliumkanäle sowie von Stoffwechsellinhibitoren die

1. Einleitung

Rolle der paratrachealen Kontaktzellen als mögliche Orte der Aufnahme und Abgabe von Ionen zu klären. Dabei wurde stets mit Sprossachsenabschnitten und nicht mit isolierten Zellen oder Membranen gearbeitet.

Für die Gewinnung des Inhaltes von Wasserleitelementen wurde die etablierte und bis heute vielfach angewandte Methode der Perkolations von Sprossachsensegmenten (Bollard 1960) insbesondere zur Untersuchung der Transportvorgänge im Xylem und der Nährstoffversorgung von Pflanzenteilen angewandt.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Schwerpunktprogramm 717: „Der Apoplast der höheren Pflanze: Speicher-, Transport- und Reaktionsraum“ unterstützt.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Versuchsmaterial

Die Proben wurden ganzjährig (1996-1999) von ca. 15-jährigen Freilandexemplaren von *Populus balsamifera L.* aus dem Neuen Botanischen Garten der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genommen. Die Pappeln waren Teil eines größeren, angepflanzten Stecklingbestandes, der aus genetisch einheitlichem Klonmaterial herangezogen worden war und zu Beginn der Untersuchungen (1996) 14-15 Jahre alt war. Für die Perkulationsversuche wurden jeweils vier Sprossachsen von einem Baum für insgesamt vier parallele Ansätze geerntet, die jeweils etwa in gleicher Höhe ein bis drei Meter über dem Boden vom Stamm abzweigten. Für die Analyse des frischen Gefäßwassers wurden jeweils drei Äste geerntet und im Labor davon drei aufeinanderfolgende Sprossachsensegmente gewonnen. Lufttemperatur und Wetterlage wurden notiert. Die Sprossachsen wurden nach der Ernte sofort in ein wassergefülltes Gefäß gestellt und in das Labor gebracht. Um eine Kontamination des Perkolates mit Bestandteilen außerhalb des Holzes zu vermeiden, wurden die Sprossachsen ca. 3 cm von den Schnittstellen aus entrindet. Für die Experimente wurden 2-3 jährige oder 5-7 jährige Sprossachsensegmente gewählt, die einen Durchmesser ohne Rinde gemessen von etwa 6 bis 10 mm aufwiesen.

2.2 Versuchsaufbau und Durchführung der Perkulationsexperimente

Die Gewinnung des Inhaltes von Wasserleitelementen ist eine erprobte Methode (Bollard 1960) zur Untersuchung der Transportvorgänge im Xylem. Die hier angewandte Perfusionstechnik (Abb. 2.1) geht auf van Bel zurück (van Bel 1974a, b).

2.2 Versuchsaufbau und Durchführung der Perkolationsexperimente

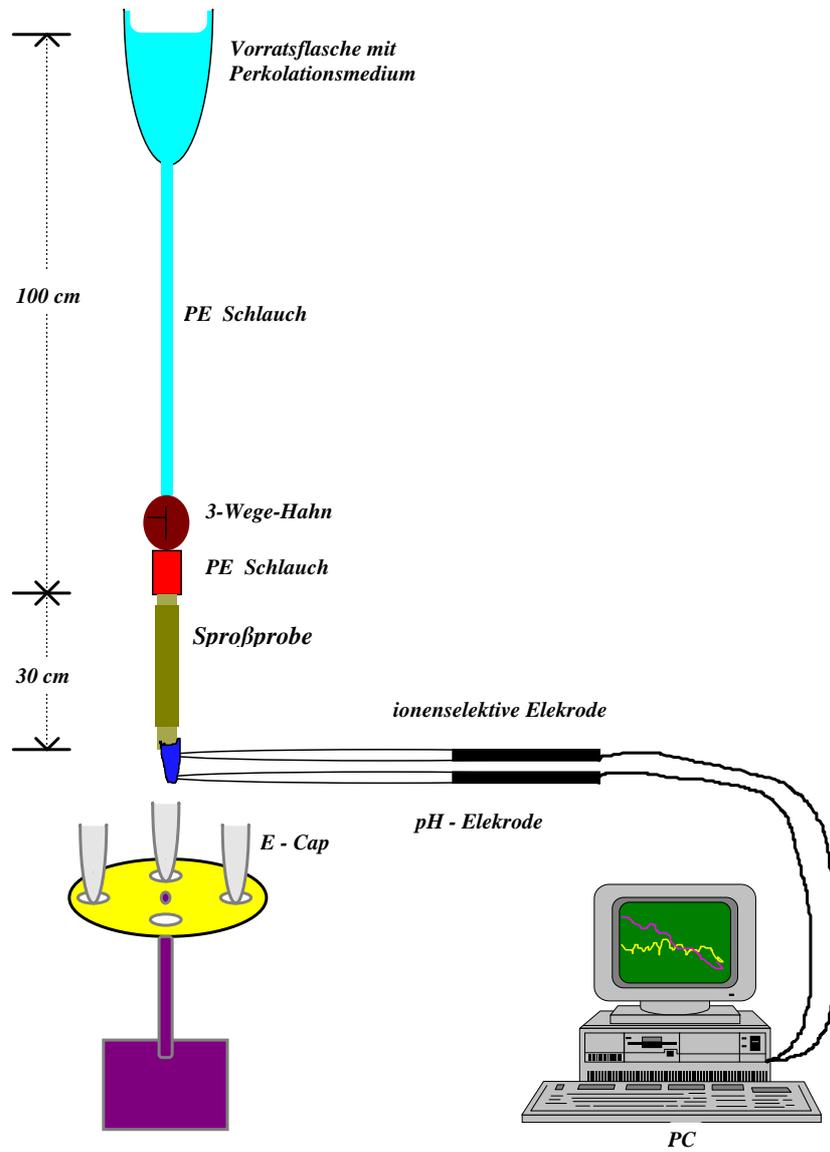


Abbildung 2.1: Der Versuchsaufbau für die Perkolationsexperimente

2.2 Versuchsaufbau und Durchführung der Perkolationsexperimente

Die Sprossachsensegmente wurden unter Wasser auf 30 cm Länge geschnitten. Bei einer Länge von 30 cm ist ein ausreichender Kontakt des Mediums mit den Gefäßwänden während des Perkolationsvorganges gewährleistet. Da über 99% der Gefäße eine Länge unterhalb 30 cm aufweisen (Hacke 1996), passiert die perkolierende Lösung praktisch immer Gefäßenden, was den Flußwiderstand erhöht. Der Eintritt von Luft in die Gefäße soll durch das Schneiden unter Wasser verhindert werden. Das Schlauchstück wurde daher auch unter Wasser auf das basale Ende aufgesetzt. Dann wurde das Schlauchstück halb mit Wasser gefüllt, etwas zusammengedrückt und mit dem Daumen abgedichtet. Durch einen erzeugten Unterdruck werden so eventuell an der Schnittfläche eingedrungene Luftblasen entfernt.

Die Sprossabschnitte wurden dann kopfüber an einem Gestell befestigt, d.h. mit dem basalen Ende der Achse nach oben aufgehängt. Auf die obere Querschnittsfläche wurde das Perkolationsmedium aus einem Vorratsbehälter (500 ml oder 5 l) über 1 m Wassersäule ($p = 10\text{KPa}$) appliziert (Abb. 2.1). Von unten wurde in den austretenden Tropfen die Elektrode waagrecht eingeführt. Bei den Experimenten, bei denen ionenselektive Elektroden eingesetzt wurden, wurden bis zu drei Elektroden in den hängenden Tropfen positioniert. Das austretende Perkolat wurde in 1,5 ml PE-Caps aufgefangen. 15 Caps wurden in ein Probenkarusell gesteckt, das manuell gedreht wurde. Die Perkolationsdauer wurde je nach Fragestellung über eine Zeitdauer von einer Stunde bis zu drei Tagen durchgeführt. Die befüllten Caps wurden zur weiteren Analyse der Kationen bei -20°C eingefroren.

Sollte bei einigen Experimenten später am Querschnitt der Anteil der leitenden Gefäße an den Gefäßen insgesamt ermittelt werden, so wurde direkt nach Abschluß des Experimentes eine 0,1%ige Safraninlösung appliziert. Safranin bindet stärker an die Gefäßwände, ohne zwischen den Zellen zu diffundieren, und eignet sich deshalb zur Einfärbung der Gefäßwände gut. Auch bei der Gewinnung von Gefäßwasser wurde Farblösung eingesetzt, um sicherzustellen, daß das aufgefangene Perkolat nicht durch appliziertes Wasser verdünnt wird. Säurefuchsin bindet weniger stark an die Gefäßwände und passiert diese schneller als Safranin und war daher für diesen Zweck eher geeignet. Bei der Gewinnung des Gefäßwassers wurde daher zu Beginn der Perkolationsdauer eine 0,1%ige Säurefuchsinlösung appliziert. Dabei wurde solange perkoliert, bis die Säurefuchsinlösung die gesamte Länge des Sprossabschnittes passiert hatte.

2.3 Messung des pH im Gefäßwasser

2.3.1 pH- Messung

Um die Verhältnisse im Gefäßwasser der Äste möglichst unverfälscht wiederzugeben, wurde der pH direkt im austretenden Tropfen mit pH- Elektroden gemessen. Vorversuche (siehe 2.5.1) ergaben, daß in abgestandenen Proben durch CO₂- Austritt an dem zeitweise CO₂- reichen Gefäßwasser ein höherer pH auftrat, der nicht mehr dem physiologischen Zustand entsprach (Abb. 2.2). Der pH wurde mit Minielektroden (Mettler-Toledo Inlab 423) wie oben beschrieben kontinuierlich gemessen.

Zunächst wurde das zweikanalige pH- Meter Delta 350 der Fa. Mettler Toledo eingesetzt. Zwei Parallelversuche konnten so aufgezeichnet werden. Die pH- Werte wurden als druckbare Zeichen (ASCII) über eine serielle Schnittstelle auf einen PC übertragen. Das pH-Meter wurde mit Pufferlösungen des Herstellers Mettler Toledo (pH 4,01, pH 7,00, pH 9,21) geeicht. Ein Temperaturfühler zur Korrektur der Meßwerte wurde in ein Gefäß mit Wasser gestellt, das Raumtemperatur aufwies. Die Messung war problemlos möglich, ohne daß Störpotentiale auftraten. Mit einer weiteren Elektrode sowie mit pH- Papier konnte die Zuverlässigkeit der Werte geprüft werden.

2.3.2 Meßwernerfassung und -auswertung mit einer PC-Datenerfassungskarte

Seit April 1998 stand eine Datenerfassungskarte der Fa. National Instruments, Modell ME-10 zur Verfügung, die gleichzeitig Messungen an bis zu acht Kanälen ermöglichte. Bei den Parallelversuchen an vier Sprossachsen konnten so zusätzlich zu den pH- Elektroden noch weitere ionenselektive Elektroden erfaßt werden. Da der Eingangswiderstand der Karte für die speziellen Anforderungen der Elektroden nicht ausreichte, wurde ein hochohmiger Vorverstärker notwendig. Die Fa. Wissenschaftliche Apparatebau- und Entwicklungsgesellschaft in Pansdorf konstruierte nach unseren Vorgaben einen Meßverstärker (Innenwiderstand $> 10 \text{ G}\Omega$) mit acht analogen Eingängen. Mit dem Softwareentwicklungssystem Labview von National Instruments wurde eine graphische Applikation erstellt, die das gesamte Experiment von der Eichung der Elektroden über Datenerfassung und Darstellung der laufenden Messung bis zur Speicherung der Meßwerte steuert und protokolliert.

2.4 Ionenanalytik

Für die Analyse der Kationen wurden drei Techniken eingesetzt:

- Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)
- High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
- Messung mit ionenselektiven Elektroden für Kalium und Calcium

2.4.1 AAS

Die Messungen wurden an einem Spektrometer der Fa. Phillips vom Typ SP9 700 durchgeführt. Eichlösungen und Proben wurden in einem 0,2%-igen Cs-La-Puffer gemessen. Für den Puffer wurden 24g CsCl, 36g LaCl₃ und 20ml 65%-ige HNO₃ eingesetzt und mit demineralisiertem Wasser auf 1l Gesamtlösung aufgefüllt. Das Perkolat konnte zur Messung im Verhältnis 1:10 verdünnt werden. Ein Ansatz für fünf Parallelmessungen für jedes zu messende Element wurde aus 1,0 ml Perkolat, 9,0 ml aqua demin. und 1,11 ml Cs-La-Puffer hergestellt. Für die Umrechnung von Extinktionen in Konzentrationen wurden Eichlösungen bekannter Zusammensetzung (Standards) gemessen. Als Mischung mit bekannter Zusammensetzung wurde ein Mineralwasser verwandt.

2.4.2 HPLC

Die Messungen mit dem AAS zeigten einige Nachteile auf. So stand nach der Gewinnung von frischem Gefäßwasser nicht immer die benötigte Menge von 1 ml unverfälschtem Perkolat zur Verfügung. Zudem machte sich bei geringen Konzentrationen ein Grundrauschen, hervorgerufen durch Verunreinigungen im Gerät, störend bemerkbar. Da die Proben für jedes zu messende Element einzeln und von Hand injiziert werden mußten, war die Messung zudem mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden. Diese Nachteile fielen beim Umstieg auf die Messung per HPLC weg.

Für die Messungen wurde eine neu auf dem Markt eingeführte Kationentrennsäule (Trennsäule Sykam SuperSep LCA SS, S/N 23612/98 bzw. S/N 390599) verwandt, die sowohl einwertige wie auch zweiwertige Kationen erfassen kann. In den Proben wurden die Signale von Na, NH₄, K, Mg und Ca erfaßt. Die Konzentrationen von Na und NH₄ waren jedoch vernachlässigbar gering und wurden daher im allgemeinen nicht weiter ausgewertet. Eine gealterte Säule, die nicht mehr gereinigt werden konnte, wurde zweimal ersetzt. Die zuletzt gelieferte Säule war mit einer veränderten Matrix befüllt und machte ein anderes Laufmittel notwendig (s.u.). Über einen Probengeber

2.4 Ionenanalytik

wurden 10 μl Proben aus einem 150 μl PE-Cap injiziert. Das Laufmittel wurde bei 40°C mit einer Flußrate von 1 ml/min durch die Trennsäule geschickt, der Druck betrug etwa 6-8 MPa. Als Eluent wurde ein Gemisch aus 0,61 mM Ascorbinsäure und 3,27 mM Oxalsäure eingesetzt. Für die zweite Säule mit veränderter Matrix wurden 2 mM Citronensäure und 0,4 mM Dipicolinsäure eingesetzt. Ein Leitfähigkeitsdetektor der Fa. Sykam S 3110 erzeugte das Signal, das über einen Verstärker über eine GPIB- Schnittstelle auf einen PC übermittelt wurde. Aus der Fläche der Peaks wurden von der PC- Software die Konzentrationen von Na, NH₄, K, Mg und Ca ermittelt. Als Referenzlösungen dienten Gemische der Chloride der fünf ermittelbaren Kationen zur Eichung.

2.4.3 Ionenselektive Elektroden

Durch den Einsatz ionenselektiver Elektroden sollte der zusätzliche Arbeitsaufwand für die Messung der Proben an der HPLC- Anlage entfallen. Zudem sollten die beiden Methoden verglichen werden. Es kamen kaliumselektive und calciumselektive Elektroden (Fa. Microelectrodes Inc., Bedford, NH, USA) zum Einsatz. Der Einfluß von Störimpulsen aus der Umgebung und das Auftreten von Fremdpotentialen ungeklärter Herkunft lieferten jedoch oft nicht reproduzierbare Meßwerte und ließen das Verfahren als Standardmethode für die Ionenanalytik als ungeeignet erscheinen.

2.4.4 Bilanzierung der Abgabe von Kationen und Bezug der bilanzierten Größen zur Fläche der am Ionenaustausch beteiligten Zellwände

Für eine Reihe von Experimenten wurden die ersten 22,5 ml Perkolat in je 15 PE- Caps zu je 1,5 ml aufgefangen. Das erste Cap enthält nahezu reines Gefäßwasser. Aus der gemessenen Konzentration im ersten Cap wurde die Menge an Kationen auf 6 ml Gefäßwasser hochgerechnet. Das ist das Volumen des Gefäßwassers, das für die betrachteten Sprossachsenabschnitte angenommen wurde. Die Menge der aus Zellen und Zellwänden freigesetzten Ionen berechnet sich aus der Differenz Gesamtmenge gemessener Ionen und der Menge der ursprünglich im Gefäßwasser enthaltenen Ionen. Wie Vorversuche mit Säurefuchsin zeigten, ist nach 12 ml Perkolation das Gefäßwasser nahezu vollständig ausgespült. Für Bilanzen, die Messungen erst nach 12 ml Perkolation verwenden, ist das Gefäßwasser demnach nicht mehr zu berücksichtigen.

Die innere Oberfläche der Gefäßwände läßt sich aus den in dieser Arbeit experimentell bestimmten morphometrischen Daten wie der Länge der Achsenabschnitte (30 cm²), dem Holzquerschnitt (ca. 1 cm²), dem Anteil

2.5 Methodische Vorversuche

leitender Gefäße (ca. 20%) und dem Volumen der Sprossachse (ca. 6 cm³) sowie der Anzahl der Gefäße pro Fläche (ca. 100/mm²) zu 4700 cm² errechnen.

Die Belegung der Gefäße mit lebenden Zellen (Holzstrahlzellen) beträgt nach mikroskopischer Analyse nur ca. 1/4 der Gefäßwandfläche, wovon wiederum nur ca. 50% eigentliche Kontaktzellen sind, d.h. Xylem- Parenchymzellen, die auf den Kontakt mit den Gefäßen spezialisiert sind (Sauter 1981 a, b, Sauter und van Cleve 1992). Deren eigentliche Austauschflächen sind die ca. 5 µm großen Kontakttüpfel, die wiederum nur ca. 50% der Kontaktfläche der Kontaktzellen betragen. Etwa 1/16 der Zellwandfläche dient damit als Austauschfläche.

2.5 Methodische Vorversuche

Die folgenden Vorversuche dienten dazu, im vorliegenden System die Parameter zu bestimmen, die die Meßergebnisse beeinflussen, aber nicht Gegenstand der Untersuchungen sein sollen. Eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sollte gewährleistet sein, wenn die Probenahme und die Laborbedingungen in den entscheidenden Parametern standardisiert sind.

2.5.1 Einfluß des Atmungs- CO₂ auf den gemessenen pH

Das im Perkolat gelöste Atmungs- CO₂ der Xylemparenchymzellen (vgl. Eklund 1990, Sprugel 1990) kann die pH- Messung nachweisbar beeinflussen. Folgende Versuche zeigten, daß der pH nach dem Ausgasen von gelöstem CO₂ aus dem Perkolat, das durch Unterdruckbedingungen experimentell in Vakuumflaschen induziert wurde, höher liegt als im gerade aus den Gefäßen austretenden Tropfen (Abb. 2.2).

Bei Anlegen eines Druckes von 1,0 bar mittels einer Druckpumpe liegt der pH im austretenden Tropfen bei pH 6,4, nach Auffangen im Gefäß jedoch bei pH 7,4. Bei Verwendung einer Saugpumpe ergeben sich unter Unterdruckbedingungen von - 7KPa mit pH 6,7 im hängenden Tropfen und pH 7,5 im Perkolat nur geringfügig höhere Werte. Ebenso liegen die Werte bei Perkolation mit 80 cm Wassersäule mit pH 6,5 im Tropfen und pH 7,2 im gewonnenen Perkolat etwa auf gleichem Niveau. Als Konsequenz daraus wurden die Messungen stets sofort im hängenden Tropfen durchgeführt.

2.5.2 Einfluß der Tageszeit auf pH und Ionengehalt

Es ist bekannt, daß die chemische Zusammensetzung im Xylemsaft eine tageszeitliche Dynamik aufweist (Andersen und Brodbeck 1989). Mit den

2.5 Methodische Vorversuche

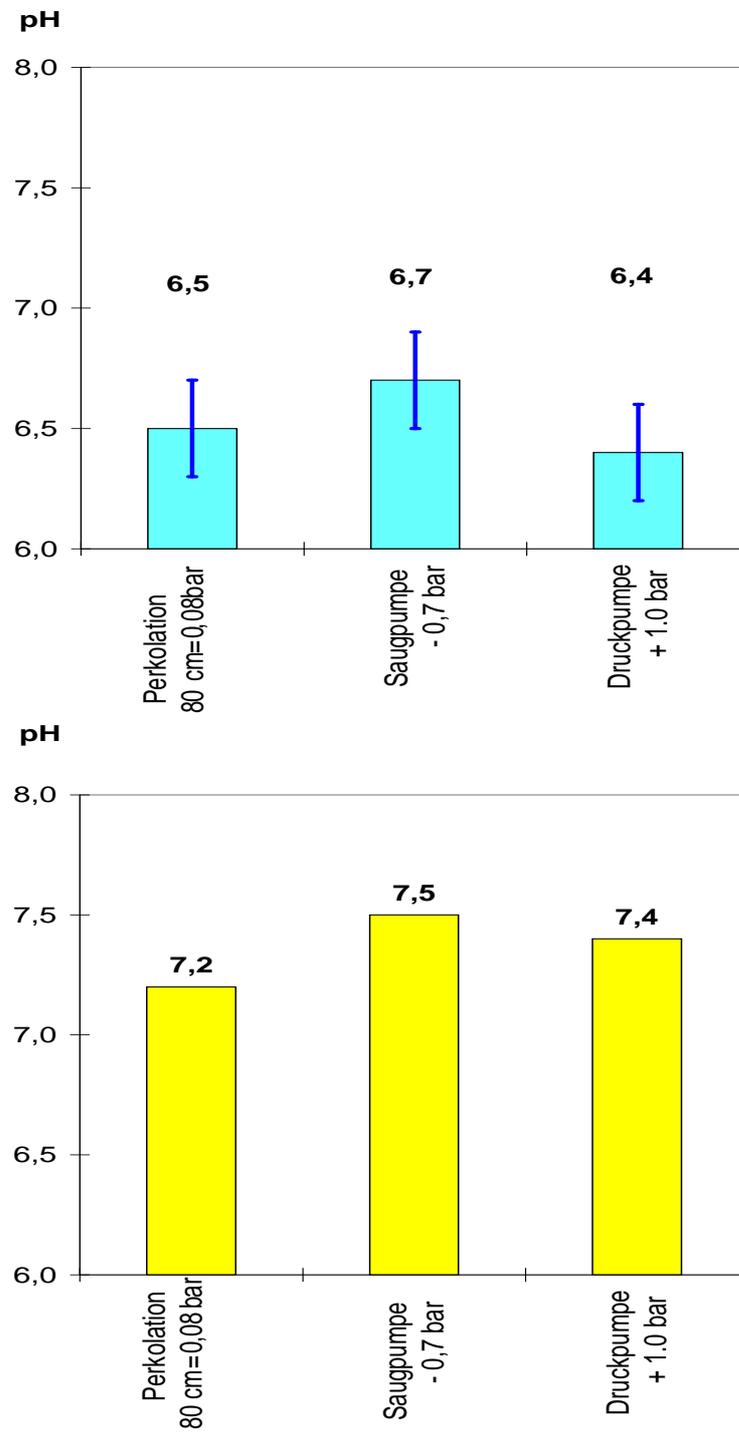


Abbildung 2.2: pH- Wert im "hängenden Tropfen" (oben) und im aufgefangenen Perkolat (unten).

2.5 Methodische Vorversuche

Analysen des Ionengehaltes im Gefäßwasser frisch geernteter Sprosse zu drei verschiedenen Tageszeiten (morgens, ca. 9-11h, mittags, ca. 11-13h und nachmittags, ca. 13-15h) sollte untersucht werden, ob und in welchem Maße sich die Ionenzusammensetzung im Xylem ändert und wenn ja, ob die Unterschiede zu den verschiedenen Tageszeiten größer sind als die individuelle Streuung der einzelnen Proben.

Für den Untersuchungszeitraum von Juli 1996 bis Juli 1997 wurden an jedem Probetag von neun und im Jahre 1999 von vier Achsenabschnitten der pH- Wert aus dem austretenden frischen Gefäßwasser gemessen und der Mittelwert berechnet (Abb. 2.3). Vergleicht man hiermit die Mittelwerte der pH- Werte von je drei zu einer Tageszeit perkolierten Sprossabschnitte, so läßt sich keine deutliche Abhängigkeit von der Tageszeit der Ernte erkennen (Abb. 2.4). Ebenso zeigen auch die Ionengehalte keine eindeutige Beziehung zur Tageszeit (Abb. 2.5). Somit können bei folgenden Experimenten durchaus Achsenabschnitte miteinander verglichen werden, die zu unterschiedlicher Tageszeit geerntet wurden.

2.5.3 Einfluß der Lage des Sprossegmentes am Astabschnitt

Die folgenden Untersuchungen sollten zeigen, ob ein Gradient innerhalb der Versuchssäste von der Basis zur Spitze auszumachen ist. Gradienten im Ionengehalt von der Stammbasis bis zur Kronenspitze sind für die Buche an gefällten Exemplaren (Glavac et al. 1990) aufgezeigt worden. Bei Ahorn wurden Gradienten für Kalium, pH, Citrat, Malat und Saccharose ermittelt (Schill et al. 1996). Für die folgenden Untersuchungen wurde das Astmaterial, nicht zuletzt auch aus Gründen der besseren Erreichbarkeit, aus dem unteren Kronenbereich (2 bis 4 m über dem Boden) gewonnen und an drei Stellen (basal, mitte, distal) untersucht. Stellt man die unter 2.5.2 beschriebenen Proben nach den aus einem Astabschnitt gewonnenen Achsensegmenten zusammen (Abb. 2.4), so lassen die Mittelwerte der pH- Werte der drei morphologisch aufeinanderfolgenden Sprossabschnitte keinen konstanten Gradienten von der Basis zur Spitze erkennen. Ebenso zeigen auch die Kationengehalte keine Beziehung zur Lage an der Sprossachse (Abb. 2.6). Somit können bei folgenden Experimenten auch Achsenabschnitte miteinander verglichen werden, die näher oder ferner der nächsten Sprossachse gelegen haben.

2.5.4 Einfluß der Perkulationsgeschwindigkeit auf pH und Ionengehalt im Perkolat

Ist die Perkulationsgeschwindigkeit gering genug, so ist zu erwarten, daß sich zum einen ein chemisches Gleichgewicht zwischen zellwandgebundenen und im Gewäßwasser gelösten Kationen einstellt. Zum anderen kann sich durch

2.5 Methodische Vorversuche

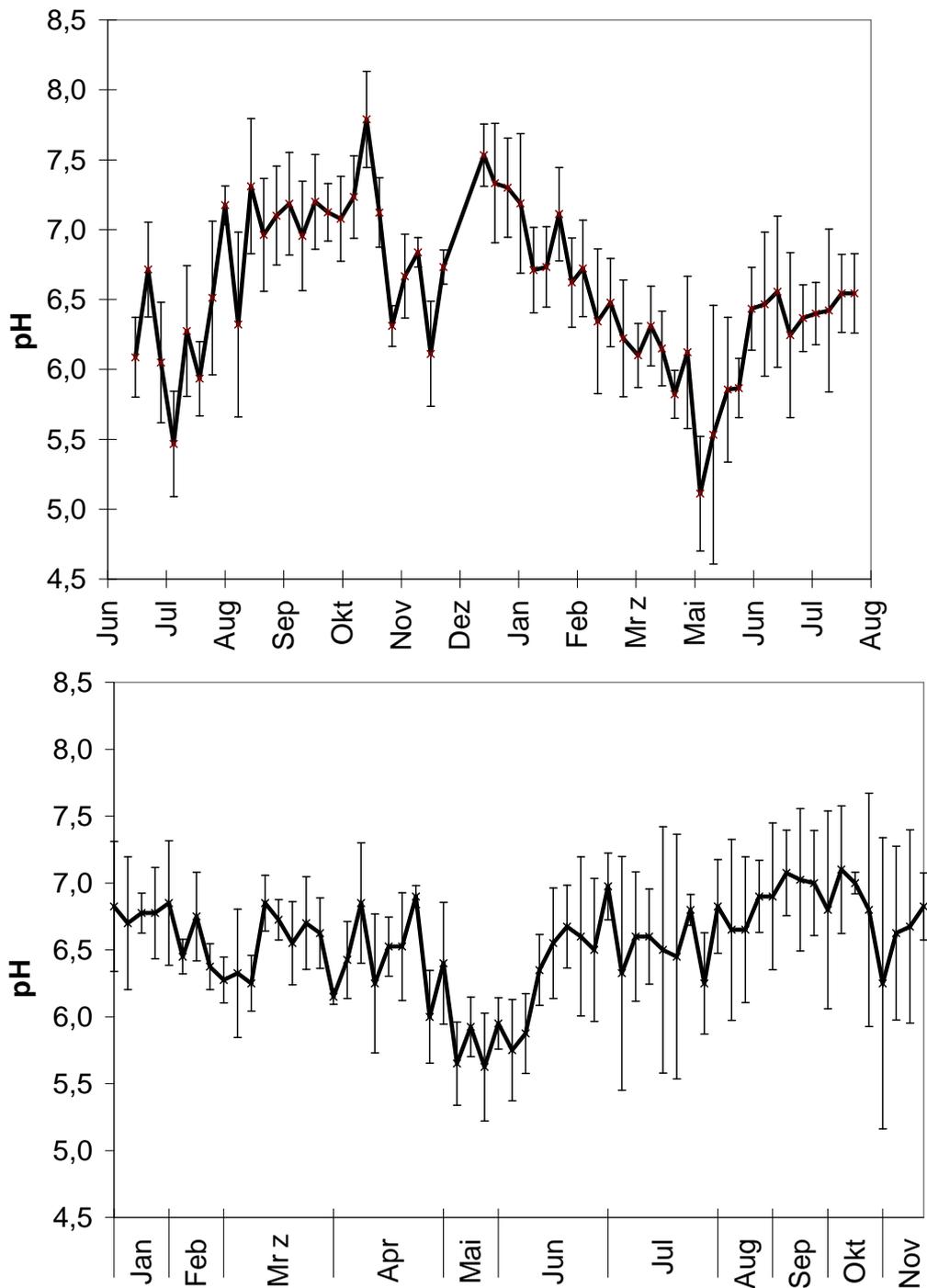


Abbildung 2.3: pH im Gefäßwasser frisch geschnittener Sprosse 1996/97 (oben) und 1999 (unten). Mittelwert (durchgezogene Linie) und Standardabweichung (Fehlerbalken) von neun (1996/97) bzw. vier (1999) Einzelproben. Die Abszisse ist für 1999 nicht linear dargestellt.

2.5 Methodische Vorversuche

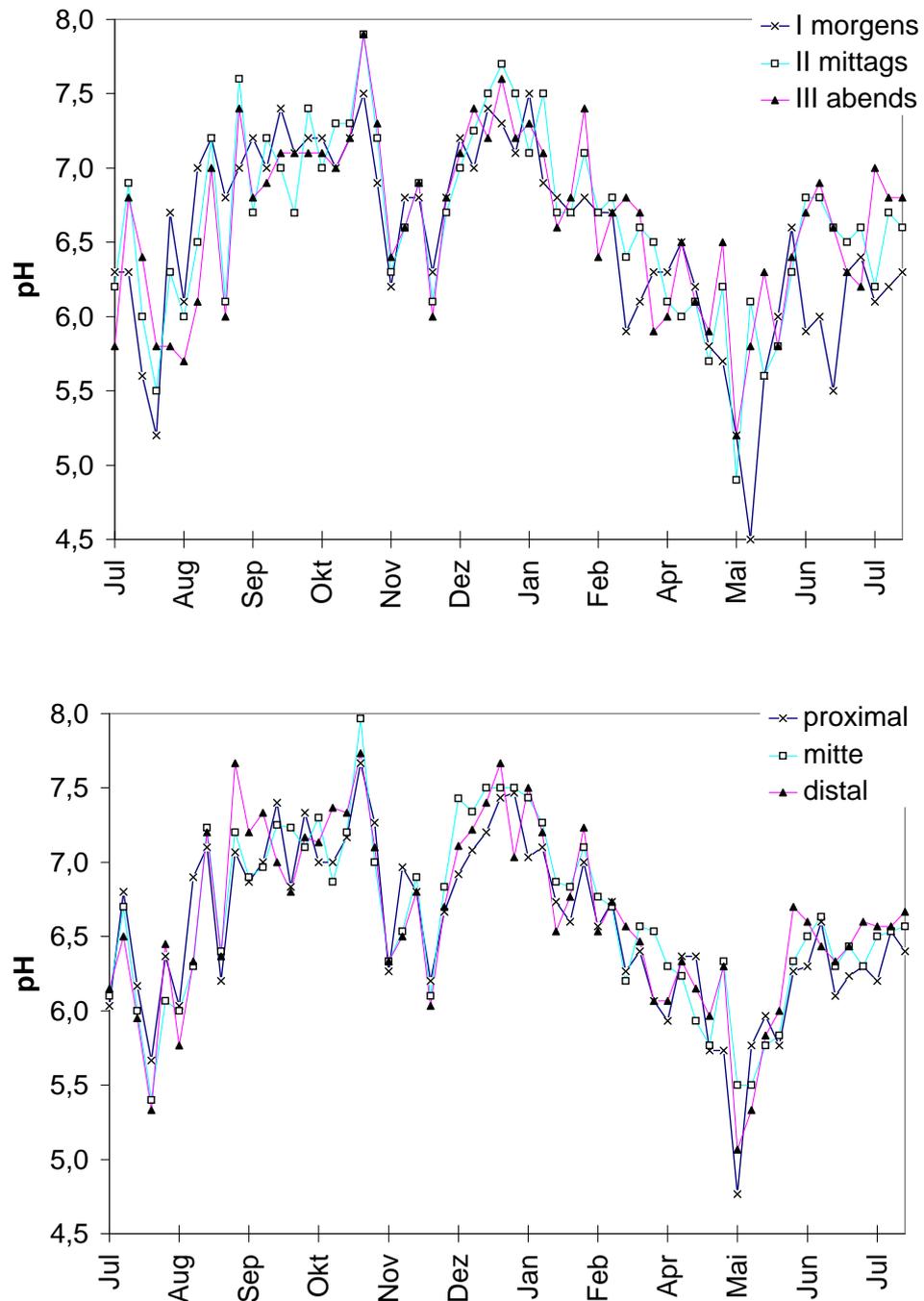


Abbildung 2.4: pH im Gefäßwasser frisch geschnittener Sprosse 1996/97. Vergleich zu drei Tageszeiten (oben), wobei die Tageszeitwerte Mittelwerte aus je drei Sprossproben sind. Vergleich von drei aufeinanderfolgenden Sprossabschnitten (unten), wobei die dargestellte Werte wiederum Mittelwerte aus je drei Sprossproben sind.

2.5 Methodische Vorversuche

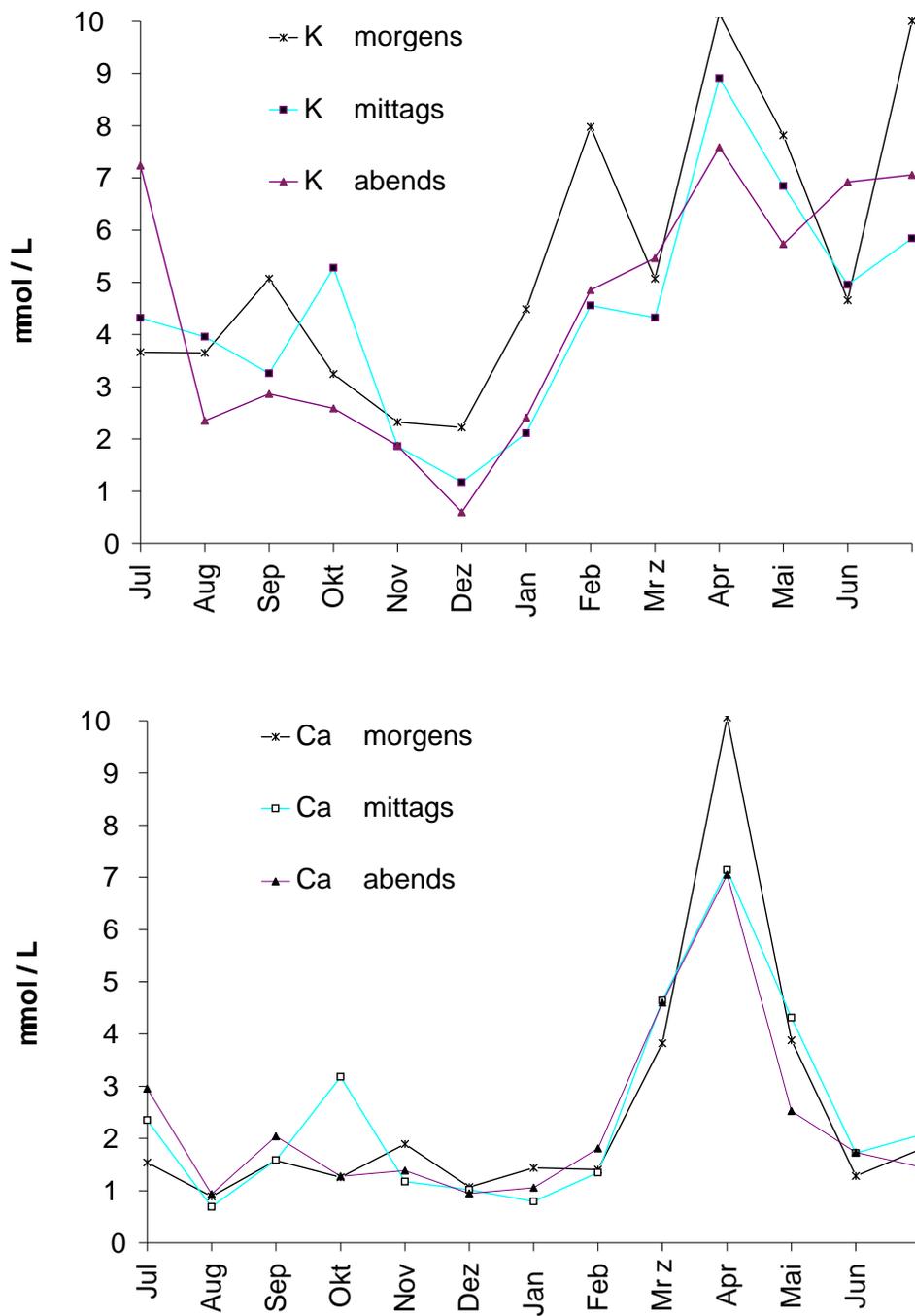


Abbildung 2.5: Gehalte von Kalium (oben) und Calcium (unten) im Gefäßwasser 1996/97 zu unterschiedlichen Tageszeiten.

2.5 Methodische Vorversuche

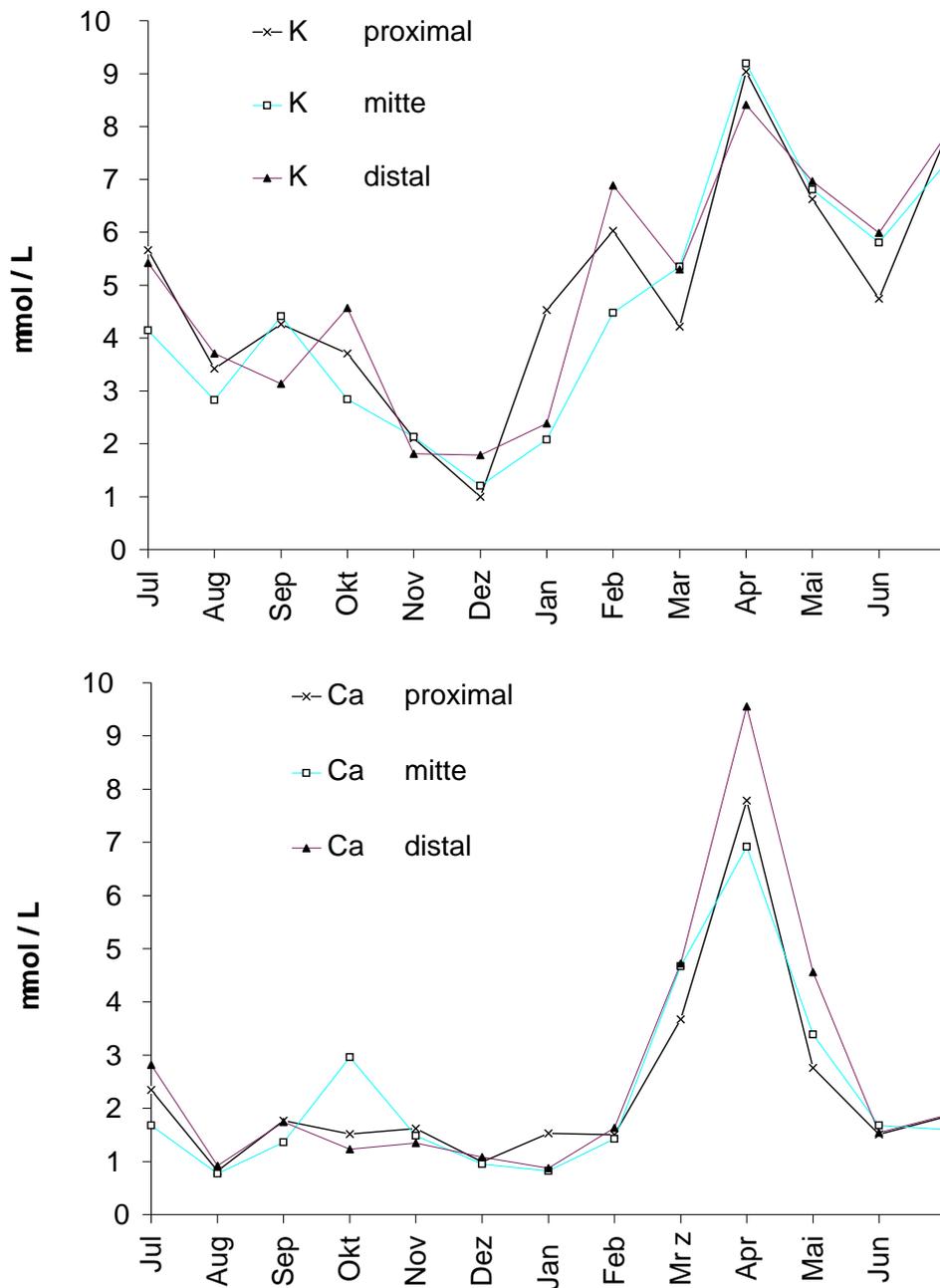


Abbildung 2.6: Gehalte von Kalium (a) und Calcium (b) im Gefäßwasser 1996/97 von drei aufeinanderfolgenden Sprossabschnitten. Mittelwerte von drei Einzelproben.

2.5 Methodische Vorversuche

Monat	Jul 1996	Aug 1996	Sep 1996	Okt 1996	Nov 1996	Dez 1996	Jan 1997	Feb 1997	Mrz 1997	Apr 1997	Mai 1997	Jun 1997	Jul 1997
K	-0,49	0,14	-0,73	-0,34	-0,74	-0,12	-0,27	0,09	0,16	-0,82	-0,17	-0,47	-0,35
Ca	-0,39	-0,09	-0,69	-0,01	-0,62	-0,03	-0,20	-0,38	-0,34	-0,13	-0,44	-0,05	-0,24

Tabelle 2.1: Pearson'scher Korrelationskoeffizient r zwischen Perkulationsgeschwindigkeit und Ionengehalt im Untersuchungszeitraum Juli 1996 bis Juli 1997.

aktive Transportvorgänge ein neues Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärem Raum einstellen. Bei höherer Perkulationsgeschwindigkeit können kinetische Effekte eine Rolle spielen, d.h. durch verminderten Austausch an den Zellwänden und weniger Einträgen aus den parenchymatischen Kontaktzellen kann die Kationenkonzentration im gewonnenen Perkolat verändert, bei Perkulation ohne Mineralstoffe herabgesetzt sein.

Für verschiedene Zeitpunkte zwischen 1996 und 1997 wurde untersucht, ob Ionengehalt und Perkulationsgeschwindigkeit miteinander korrelieren. Neun bis elf Achsenabschnitte wurden hierfür jeweils solange perkoliert, bis erste Spuren der gefärbten, perkolierten Lösung im austretenden Tropfen sichtbar wurden. Eine Korrelationsanalyse auf lineare Abhängigkeit zeigte mit einem Pearson'schen Korrelationskoeffizienten bei den vorliegenden Perkulationsgeschwindigkeiten für Kalium mit $r = +0,16$ bis $r = -0,82$ und für Ca mit $r = -0,01$ bis $r = -0,69$ zumeist keine Korrelation (Tab. 2.1).

Exemplarisch sind die Kaliumgehalte für zwei Untersuchungstage (12.09.96 und 03.03.97) in Abb. 2.7 dargestellt. Während im September eine schwach negative Korrelation vorliegt, d.h. eine höhere Perkulationsgeschwindigkeit mit geringerem Kaliumgehalt korreliert, ist im März keine Korrelation mehr zu erkennen.

2.5.5 Perkulation mit vier Parallelansätzen

Freilandmaterial weist im Vergleich zu Material, das in Klimakammern unter weitgehend konstanten Bedingungen gewonnen wurde, sicherlich eine höhere Streuung der Werte auf. Mittels vier Parallelproben von vier Ästen eines Baumes sollte die Schwankungsbreite abgeschätzt werden.

Die Ionengehalte von Kalium und Calcium im Perkolat zeigten nach Applikation von demineralisiertem Wasser bei pH 7 und jeweils 0,01 MPa Druck am 21.04.99 in den ersten 22,5 ml Perkolat einen weitgehend identischen Verlauf (Abb. 2.8). Trotz recht unterschiedlicher Startwerte nähern sich die Gehalte im weiteren Verlauf der Perkulation einander an. Damit ist eine Vergleichbarkeit der Sprossachsen bei mehreren Parallelansätzen hinsichtlich des Gehaltes an Kationen gewährleistet.

2.5 Methodische Vorversuche

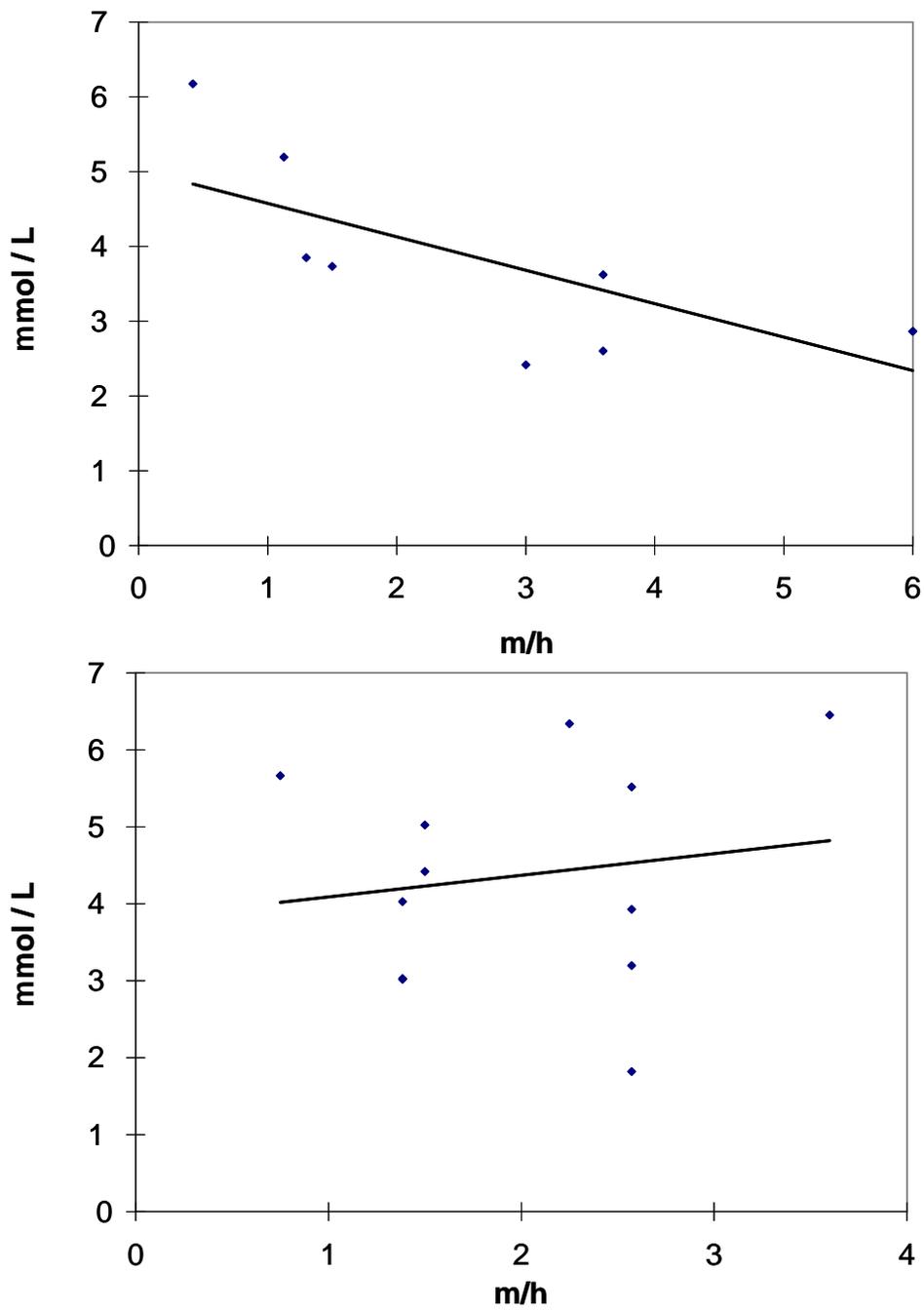


Abbildung 2.7: Korrelation zwischen Kationengehalt und Perkolationsgeschwindigkeit (oben) am 12.09.96 und (unten) am 03.03.97. Regressionsgerade und Einzelwerte.

2.5 Methodische Vorversuche

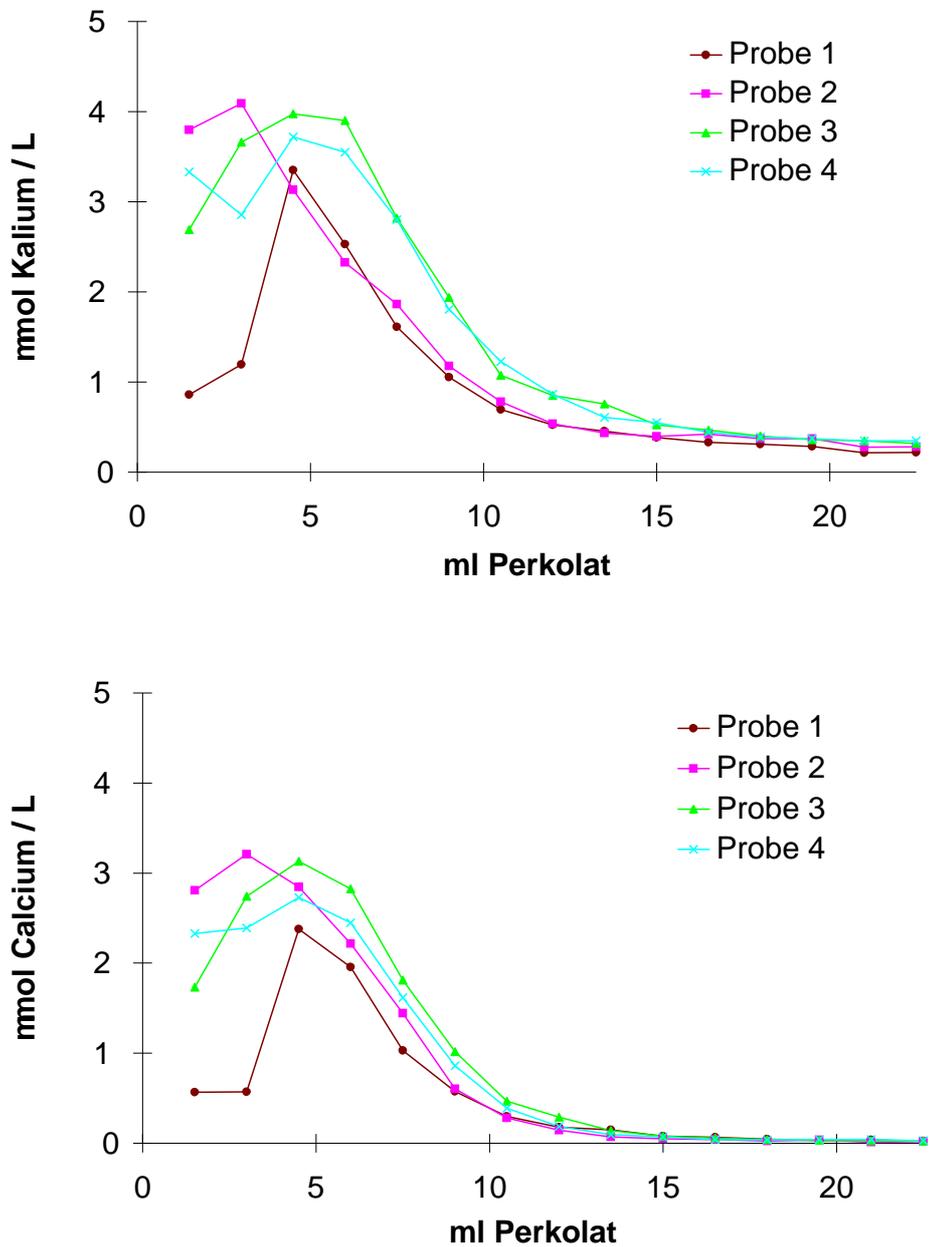


Abbildung 2.8: Verlauf der Kationengehalte bei vier parallelen Perkolationsexperimenten für Kalium (oben) und Calcium (unten) am 21.04.99 bei Vorlage von pH 7.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Jahrgang von pH und Ionen im Gefäßwasser frisch geernteter Sprosse

Die Daten über den Jahrgang von pH und Ionen im Gefäßwasser frisch geernteter Sprosse liefern wichtige Basisinformationen für diejenigen Experimente, die über die Regulationsfähigkeit des pH und der Ionenzusammensetzung entlang der Wasserleitbahnen im Pappelholz Auskunft geben sollen. Es ist zu erwarten, daß eine Vielzahl endogener Faktoren wie Knospen- und Blattaustrieb im Frühjahr, Blattfall im Herbst und exogener Faktoren wie Trockenstress oder hohe Verdunstung im Sommer und Frost im Winter eine lebhaftere Dynamik der Zusammensetzung des Gefäßwassers bewirken. Erstmals wurde in einem engen zeitlichen Raster durch wöchentliche Probenahme für *Populus balsamifera* mit der Methode der Perkolation schonend Gefäßwasser gewonnen, das in seiner Zusammensetzung die natürlichen Bedingungen so weit wie möglich widerspiegelt. In einer ersten Versuchsserie von Juli 1996 bis Juli 1997 wurden 2-3 jährige Sprossabschnitte verwendet, in einer zweiten von Januar bis Dezember 1999 wurden 5-7 jährige Sprossabschnitte zum Vergleich herangezogen. Für diese Analysen wurden morgens (9-11 h), mittags (11-13h) und nachmittags (13-15h) von einem Ast jeweils drei Sprossabschnitte gewonnen und mit 0,1%-iger Säurefuchsinlösung perkoliert. Das austretende Gefäßwasser, dessen pH mit einer Mikroelektrode gemessen wurde, wurde aufgefangen, gewogen und später auf Kationen analysiert. Sowie der austretende Tropfen eine Farbspur zeigte, wurde die Gewinnung abgebrochen.

3.1 Jahrgang von pH und Ionen im Gefäßwasser

3.1.1 pH im frisch gewonnenen Gefäßwasser

Physiologische Vorgänge wie Atmung, der Transport organischer Säuren und Austauschvorgänge an den Zellwänden lassen ein wechselndes Milieu im Gefäßwasser erwarten. Die folgenden Untersuchungen sollten zeigen, in welchen Grenzen sich der pH- Wert in den verschiedenen physiologischen Stadien eines Jahres bewegt. Unterschiede zwischen älteren und jüngeren Sprosssegmenten werden in zwei Versuchsreihen herausgestellt.

Untersuchungen an 2-3 jährigen Sprossen

Der pH im Gefäßwasser lag über den gesamten Untersuchungszeitraum meist im leicht sauren Bereich (Abb. 3.1). So lag der pH an 8 von 57 Probetagen im Bereich von pH 5 bis pH 6, an 33 Tagen im Bereich von pH 6 bis pH 7 und an 16 Probetagen bei pH 7 bis pH 8. Das Jahresmittel lag bei pH 6,6. Das Minimum der gemittelten Meßwerte von neun Sprossproben wurde am 5. Mai mit pH 5,1 ermittelt. Das Maximum lag am 4. November bei pH 7,8. Da die pH- Werte nicht erkennbar von der Tageszeit der Probenahme (siehe 2.5.2) oder von der Lage am Spross abhängen (siehe 2.5.3), wurden diese Parameter im weiteren nicht mehr berücksichtigt.

Untersuchungen an 5-7 jährigen Sprossen

Wiederum lag der pH im Gefäßwasser über das gesamte Jahr hinweg im leicht sauren Bereich (Abb. 3.1). So lag der pH an 6 von 63 Probetagen im Bereich von pH 5 bis pH 6, an 49 Tagen im Bereich von pH 6 bis pH 7 und an 8 Probetagen bei pH 7 bis pH 8. Das Jahresmittel lag bei pH 6,6. Das Minimum wurde am 30. Mai mit pH 5,6 ermittelt, das Maximum lag am 5. Oktober bei pH 7,1. Im Mai wurden somit in beiden Jahren jeweils die tiefsten, im Oktober und November die höchsten pH- Werte gemessen.

3.1.2 Kationen im frisch gewonnenen Gefäßwasser

Die Zellwände der Gefäße bestehen zu einem erheblichen Anteil aus Pektinmakromolekülen, wobei zweiwertige Kationen wie Calcium und Magnesium über die freien Carboxylgruppen die kettenförmigen Makromoleküle vernetzen. Diese Struktur ist jedoch nicht unveränderlich, vielmehr können die Bindungsstellen mit dem umgebenden Medium Kationen austauschen, und im sauren Milieu auch Kationen gegen Protonen eintauschen. Die Kationenaustauschkapazität (CEC) von Zellwänden im Xylem läßt sich mit Hilfe radioaktiver Tracer bestimmen, was an Papyrussprossen schon durchgeführt wurde (van de Geijn und Petit 1979). In der vorliegenden Arbeit wurden mittels HPLC die einzelnen Gehalte an NH_4^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{++} und Ca^{++} in

3.1 Jahrgang von pH und Ionen im Gefäßwasser

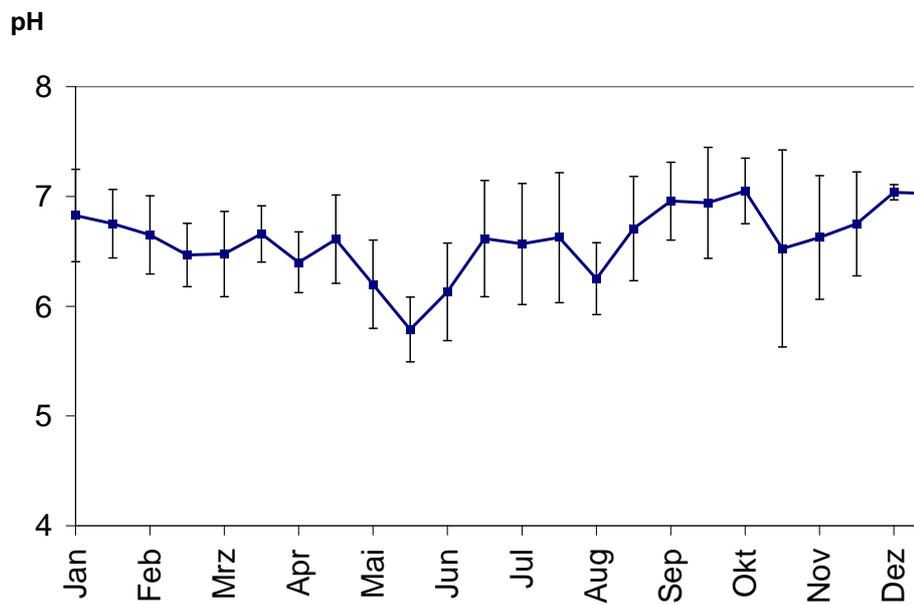
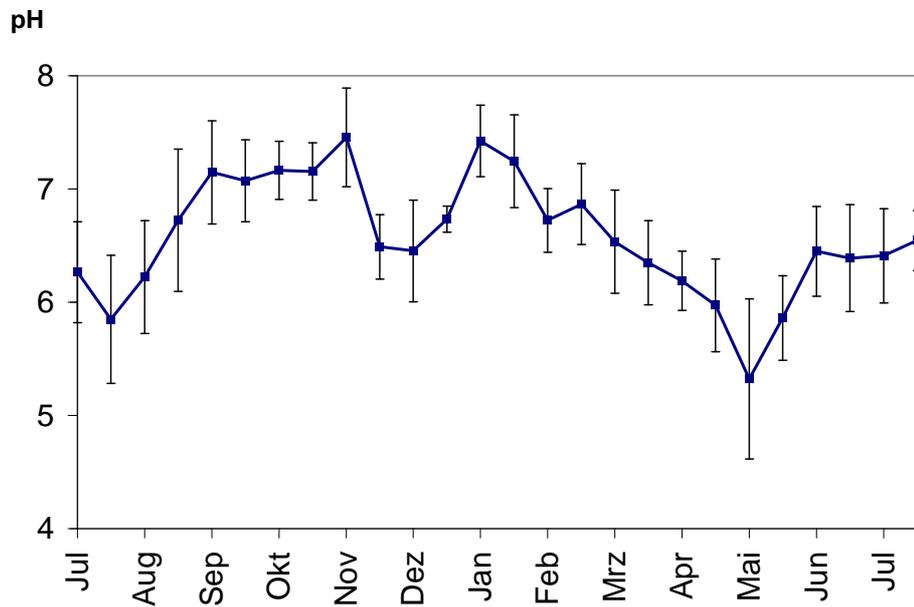


Abbildung 3.1: Jahrgang des pH im Gefäßwasser frisch geschnittener 2-3 jähriger Sprosse 1996/97 (oben) und 5-7 jähriger Sprosse 1999 (unten). Mittelwerte (durchgezogene Linie) und Standardabweichung (Fehlerbalken) von jeweils neun Proben (1996/97) bzw. vier Proben (1999).

3.1 Jahrgang von pH und Ionen im Gefäßwasser

den verschiedenen Jahreszeiten bestimmt. Die Konzentrationen von Ammonium und Natrium lagen unterhalb von $100\mu\text{M}$ und werden hier nicht weiter betrachtet. Somit können unterschiedliche Trends bei den verschiedenen Kationen sichtbar werden. Die Untersuchungen ermöglichen auch eine Quantifizierung der Ionentransportkapazität im natürlichen System. Ein Vergleich mit Werten, die unter experimentell erzeugten Bedingungen (s.u.) erhalten wurden, ermöglicht, das potentielle Transport- und Regulationsvermögen abzuschätzen. Da die Kationengehalte weder erkennbar von der Tageszeit der Probenahme (s. 2.5.2) noch von der Lage am Spross abhängen (s. 2.5.3), wurden diese Einflüsse hier nicht weiter berücksichtigt.

Untersuchungen an 2-3 jährigen Sprossen

Von den ermittelten Kationengehalten im Gefäßwasser wies stets Kalium die höchsten Werte auf, gefolgt von Calcium und mit großem Abstand von Magnesium (Abb. 3.2). Die Kaliumkonzentrationen lagen im Mittel bei $4775\mu\text{M}$, das Minimum wurde im Dezember mit $2590\mu\text{M}$ und das Maximum wiederum im April zur Zeit des Knospentreibens mit $8880\mu\text{M}$ gemessen. Die Calciumkonzentrationen lagen im Jahresmittel bei $2395\mu\text{M}$, das Minimum wurde im August mit $836\mu\text{M}$ und das Maximum im April zur Zeit des Knospenaustriebes mit $8086\mu\text{M}$ gemessen. Während der Wintermonate lag Calcium mit $1000\mu\text{M}$ bis $1500\mu\text{M}$ gleichfalls auf einem niedrigen Niveau.

Die Magnesiumkonzentrationen lagen im Jahresmittel bei $166\mu\text{M}$, das Minimum wurde im November mit $72\mu\text{M}$ und das Maximum wiederum im April mit $855\mu\text{M}$ ermittelt.

Untersuchungen an 5-7 jährigen Sprossen

Mit Ausnahme von Mai und Juni wies in diesen älteren Sprossachsen Calcium von den ermittelten Kationengehalten im Gefäßwasser die höchsten Werte auf, gefolgt von Kalium und mit großem Abstand von Magnesium (Abb. 3.2). Die Calciumkonzentrationen lagen im Jahresmittel bei $1997\mu\text{M}$, das Minimum wurde im Januar mit $494\mu\text{M}$ und das Maximum im April mit $2975\mu\text{M}$ gemessen. Die Kaliumkonzentrationen lagen im Jahresmittel bei $1467\mu\text{M}$, das Minimum wurde ebenfalls im Januar mit $363\mu\text{M}$ und das Maximum im Mai mit $3322\mu\text{M}$ gemessen. Die Magnesiumkonzentrationen lagen im Mittel bei $410\mu\text{M}$, das Minimum wurde wiederum im Januar mit $148\mu\text{M}$ und das Maximum im Dezember mit $855\mu\text{M}$ gemessen.

Die Maxima der Kationengehalte liegen somit bei beiden Versuchsreihen im Zeitraum von April bis Mai, die Minima von November bis Januar: Bei Calcium treten auch im August Minima auf. Vergleicht man die Gehalte von Kalium und Calcium, so fällt auf, daß Kalium bei den 2-3 jährigen Achsen-

3.1 Jahrgang von pH und Ionen im Gefäßwasser

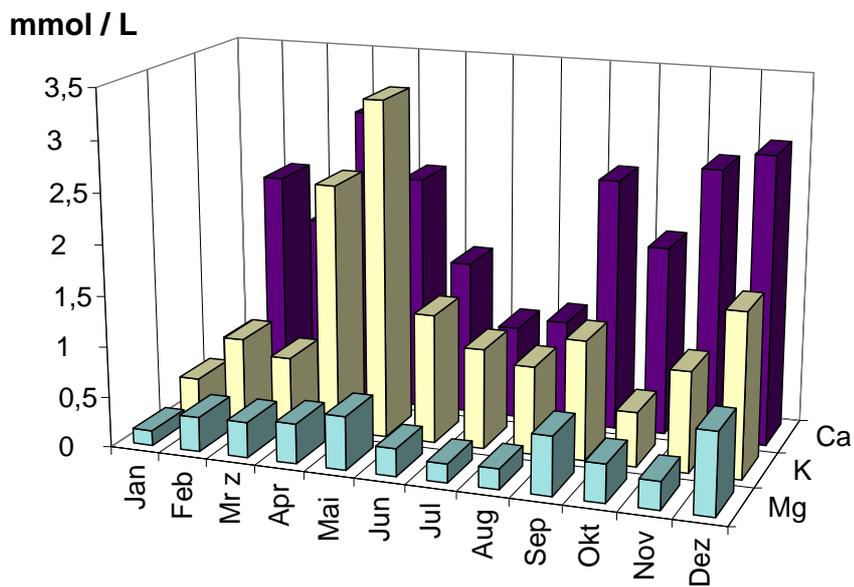
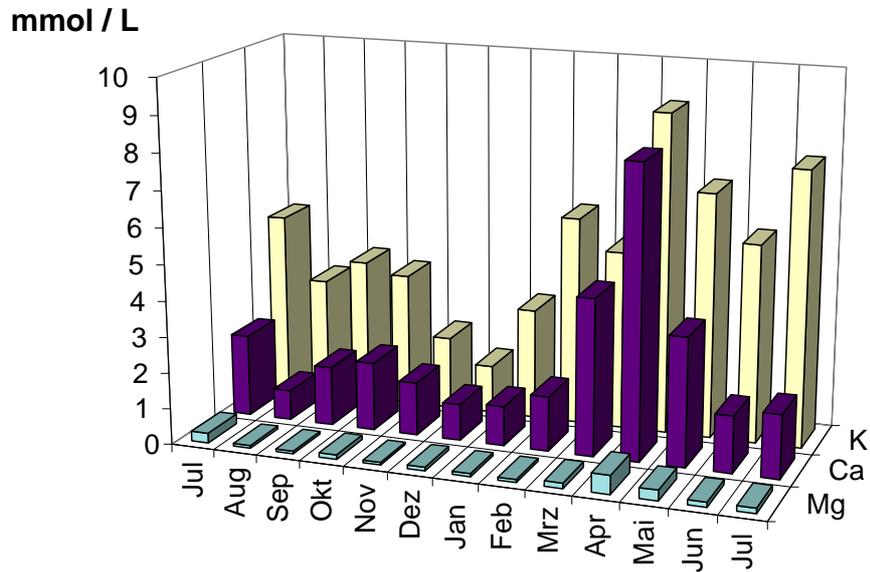


Abbildung 3.2: Jahrgang der Kationen K, Ca, Mg im Gefäßwasser frisch geschnittener 2-3 jähriger Sprosse 1996/97 (oben) und 5-7 jähriger Sprosse 1999 (unten). Die Säulen stellen die Mittelwerte aus neun (1996/97) bzw. vier Proben dar.

3.1 Jahrgang von pH und Ionen im Gefäßwasser

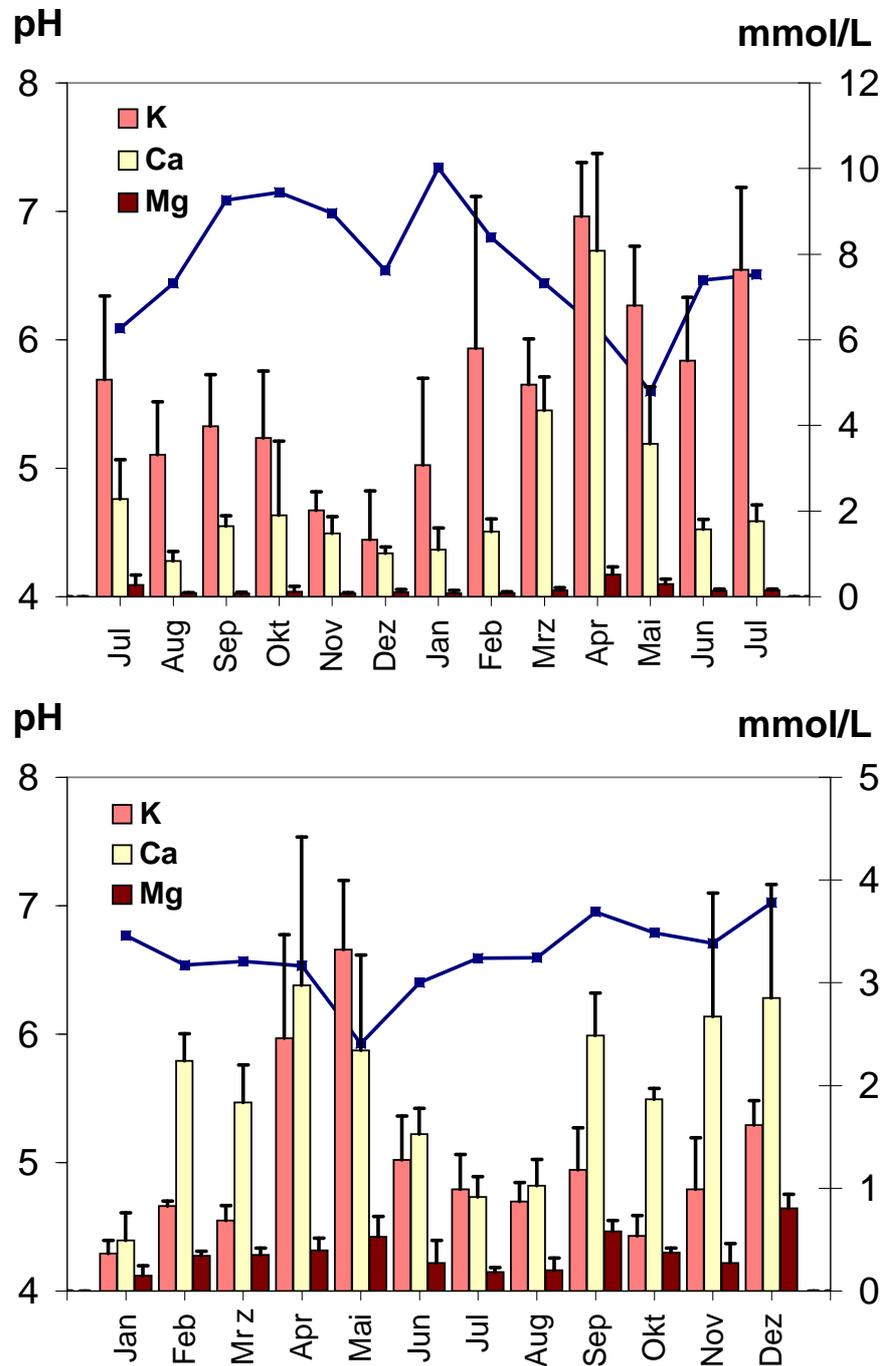


Abbildung 3.3: Jahrgang von pH und Kationen im Gefäßwasser frisch geschnittener 2-3 jähriger Sprosse 1996/97 (oben) und 5-7 jähriger Sprosse (unten). Der pH ist als durchgezogene Linie, die Kationenkonzentrationen sind als Säulen mit Fehlerbalken wiedergegeben.

3.1 Jahrgang von pH und Ionen im Gefäßwasser

abschnitten und Calcium bei den 5-7 jährigen Achsenabschnitten deutlich dominieren. Das Verhältnis von Kalium zu Calcium liegt für die 2-3 jährigen Abschnitte bei 1,99. Für die 5-7 jährigen Abschnitte liegt es jedoch nur bei 0,73.

Stellt man den Jahresverlauf der pH - Werte und der Kationengehalte gegenüber, so fällt eine Korrelation von sinkenden pH- Werten und steigenden Kationengehalten im Frühjahr auf, im Sommer zeigt sich ein umgekehrter Trend (Abb. 3.3). Dieses Verhalten ist bei den 2-3 jährigen Sprossachsen noch ausgeprägter als bei den 5-7 jährigen. Im Vergleich zu den 2-3 jährigen Sprossen fallen die Schwankungen des pH bei den 5-7 jährigen geringer aus.

3.1.3 Menge des gewonnenen Gefäßwassers und Perkulationsgeschwindigkeit

Die Menge des aus den Achsenabschnitten frisch gewonnenen Gefäßwassers war stets geringer als die aus den morphologischen Daten errechneten 6 ml, da die Gewinnung abgebrochen wurde, sowie Farbstoff im perkolierten Medium aus der Schnittfläche austrat. In diesem Augenblick hat der Farbstoff in den am schnellsten leitenden Gefäßen das untere Sprossende erreicht. Die Menge des gewonnenen Gefäßwassers lag im Untersuchungszeitraum von Juli 1996 bis Juli 1997 im Jahresmittel bei 1,42 ($\pm 0,24$) ml. Ein vergleichbarer Jahrgang der Menge an gewonnenem Gefäßwasser zu dem anderer Parameter wie der Perkulationsgeschwindigkeit, dem pH oder dem Ionengehalt waren nicht zu erkennen. Die Perkulationsgeschwindigkeit v in m/h läßt sich aus der Perkulationsrate x in ml/h errechnen. Bei einer Sprosslänge l von 30 cm und einem Gefäßwasservolumen V von 6 cm³ ergibt sich $v = x \cdot l / V$.

Die gemessene Perkulationsgeschwindigkeit unter den gewählten Druckbedingungen von 0,01 MPa gibt Auskunft über das Transportvermögen der Gefäße. Eine stark verminderte Perkulationsgeschwindigkeit kann auf Embolien hinweisen. Auch die Beziehung zwischen Perkulationsgeschwindigkeit und Kationengehalt des Perkolates ist von Interesse. Es könnte ein direkter Zusammenhang zwischen Perkulationsgeschwindigkeit und Ionengehalt bestehen (s. 2.5.4).

Die mittlere Perkulationsgeschwindigkeit im Monatsvergleich im Jahre 1999 lag zwischen 1,4 m/h im März und 3,1 m/h im Mai, der Mittelwert der Messungen von 66 Probetagen lag bei 2,2 m/h bei einer Standardabweichung von 1,3 m/h (Abb. 3.4). Im vorangegangenen Jahr waren bei einer geringeren Probenzahl Perkulationsgeschwindigkeiten in der gleichen Größenordnung von 0,7 m/h bis 3,4 m/h ermittelt worden. Wie Abb. 3.4 zeigt, kann die Perkulationsgeschwindigkeit auch in den Achsenabschnitten von einem Baum an manchen Tagen deutliche Unterschiede aufweisen. Obgleich die

3.1 Jahrgang von pH und Ionen im Gefäßwasser

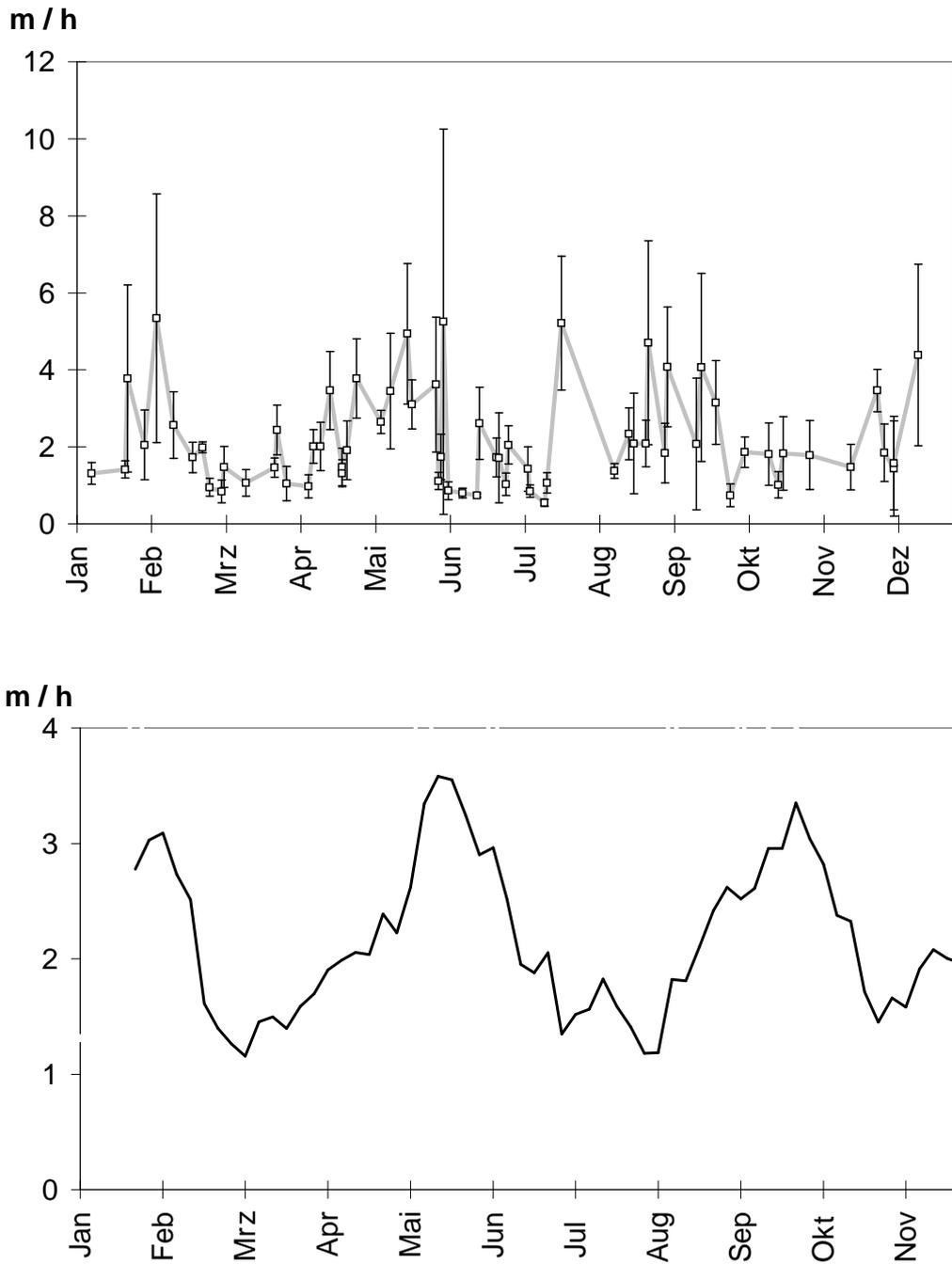


Abbildung 3.4: Perkolationsgeschwindigkeit der untersuchten Sprossachsen im Jahre 1999. Mittelwert und Standardabweichung bei neun Achsenabschnitten für jeden Probetag (oben) und gleitender Mittelwert über fünf Probetage im Jahre 1999 (unten).

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

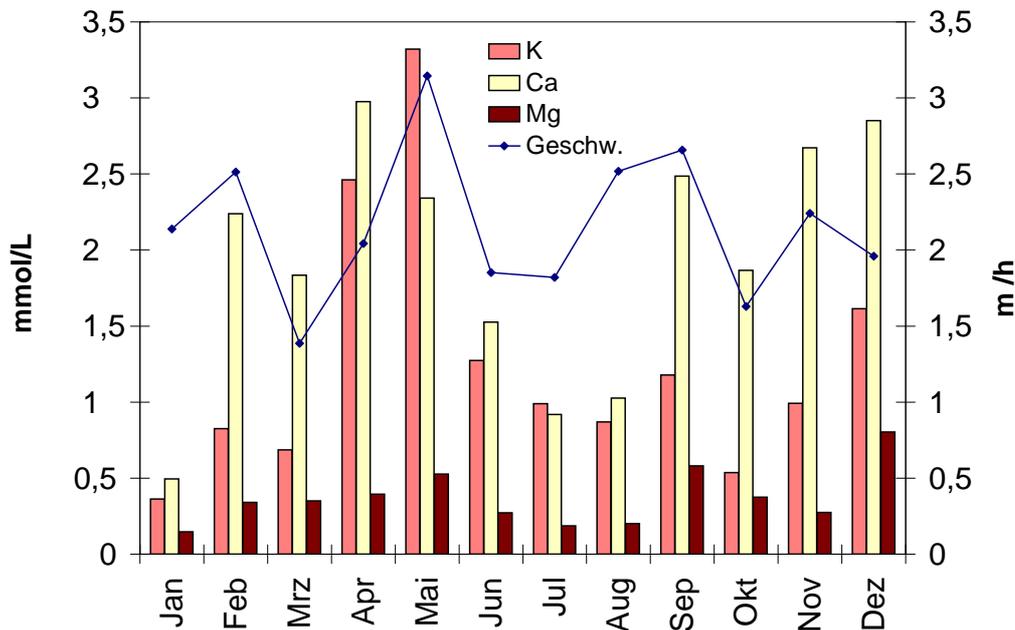


Abbildung 3.5: Perkolationsgeschwindigkeit und Kationengehalte (K, Ca, Mg) im Gefäßwasser 1999

Maxima von Perkolationsgeschwindigkeit und Kaliumgehalt zusammenfallen (Abb. 3.5), zeigt die statistische Analyse keine Korrelation bei 21 Werten. Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient liegt für Kalium bei $r = 0,19$ und für Calcium bei $r = 0,005$. Der in den Gefäßen vorliegende Kationengehalt und die in den Achsen gemessene Perkolationsgeschwindigkeit lassen somit keinen Zusammenhang erkennen.

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

Mit den folgenden Experimenten sollte unter experimentell vorgegebenen pH-Bedingungen das Regulationsvermögen von pH und Ionengehalt in den Gefäßen qualitativ und quantitativ ermittelt werden. Zudem sollte geprüft werden, ob sich ein neues Fließgleichgewicht einstellt und wie lange es aufrecht erhalten werden kann.

Erstmals wurde der Versuch unternommen, eine Vorstellung von der Größenordnung der Kationenfreisetzung an den Gefäßwänden pro Zeiteinheit zu erhalten und den Jahresgang dieser Vorgänge zu erfassen. Der morphologische Bezug der Kationenfreisetzung zur Zellwandfläche ermöglicht Abschätzungen, die das Material der Zellwände des Untersuchungsobjek-

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

tes charakterisieren. Für die Berechnungen der Ionenfreisetzung wurde die ursprünglich im Gefäßwasser enthaltene Ionenmenge stets abgezogen.

Eine Vielzahl von physiologischen Mechanismen können zur Regulation beitragen, die mit diesen Experimenten nur in ihrer Gesamtwirkung erfaßt werden können: Passive Ionenaustauschvorgänge an den Zellwänden (Ca^{++} gegen 2H^+), Austausch von Ionen über Ionenkanäle und aktive Protonenpumpen.

Bei den folgenden Versuchen wurden zunächst in je zwei parallelen Versuchsansätzen mit pH 3 und pH 7 im direkten Vergleich Perkolationen der Sprossabschnitte von einem Baum durchgeführt. Ab März 1998 wurden dann vier parallele Perkolationen bei pH 2, pH 3, pH 5 und pH 7 durchgeführt. Die Experimente liefen über 15 Stunden. Mit wenigen Ausnahmen war die Perkolation dabei auch während dieser Zeit nicht verlangsamt, sodaß verfälschende Meßwerte durch aufgetretene Embolien weitgehend ausgeschlossen werden können. pH und Kationengehalte werden im Verlauf des Experimentes entweder über die Zeitachse oder das perkolierte Volumen dargestellt.

3.2.1 Regulation des pH im Gefäßwasser bei Vorlage von saurem Medium

Bei Vorlage von Lösungen mit pH 2, pH 3 und pH 5 erfolgte die Regulation des pH in den Bereich von pH 6 bis pH 7 außergewöhnlich rasch. Die Regulation dauerte außer bei Angebot einer Perfusionslösung mit einem unphysiologisch niedrigem pH von 2 fast stets über 12 Stunden an. Dabei wurden über 100 ml Lösung perkoliert. Lediglich im April trat bei einer Vorlage von pH 3 bereits nach 90 ml Perkolation ein pH von weniger als pH 5 auf. Bei Vorlage von pH 5 wurden etwa $1 \mu\text{mol}$ Protonen pro 100 ml Perkolat und bei Vorlage von pH 3 $100 \mu\text{mol}$ Protonen neutralisiert. Bei einer Flußrate von $40(\pm 30)$ ml/h entspricht das $0,4(\pm 0,3) \mu\text{mol}$ bei pH 5 und $40(\pm 30) \mu\text{mol}$ Protonen / h. Bei Vorlage von Lösungen mit pH 7 wird der pH über die beobachtete Zeit in etwa auf dem Ausgangsniveau gehalten.

3.2.2 Regulation des pH im Gefäßwasser bei Vorlage von alkalischem Medium

Im natürlichen System ist eher ein saures Milieu durch Atmungsprozesse oder durch organischer Säuren zu erwarten. Für das Auftreten eines deutlich alkalischen Milieus finden sich jedoch keine Anhaltspunkte, wenngleich wie in diesem Versuch im Winter Werte bis pH 8 auftreten können. Dennoch wurde hier untersucht, ob das System potentiell eine pH- Regulation unter alkalischen Bedingungen leisten kann.

Ein Experiment bei Vorlage von pH 11 und einem parallelen Ansatz von

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

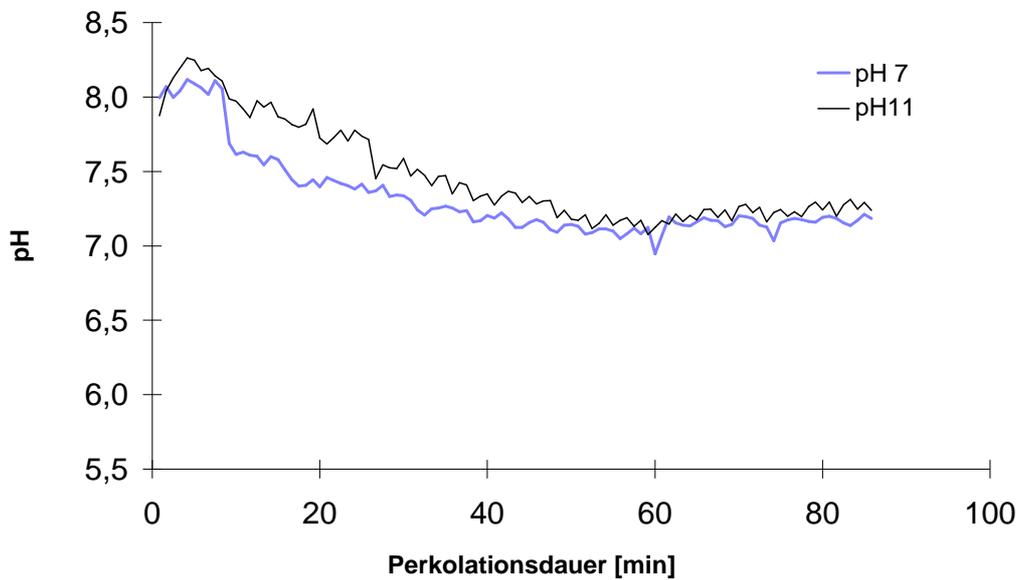
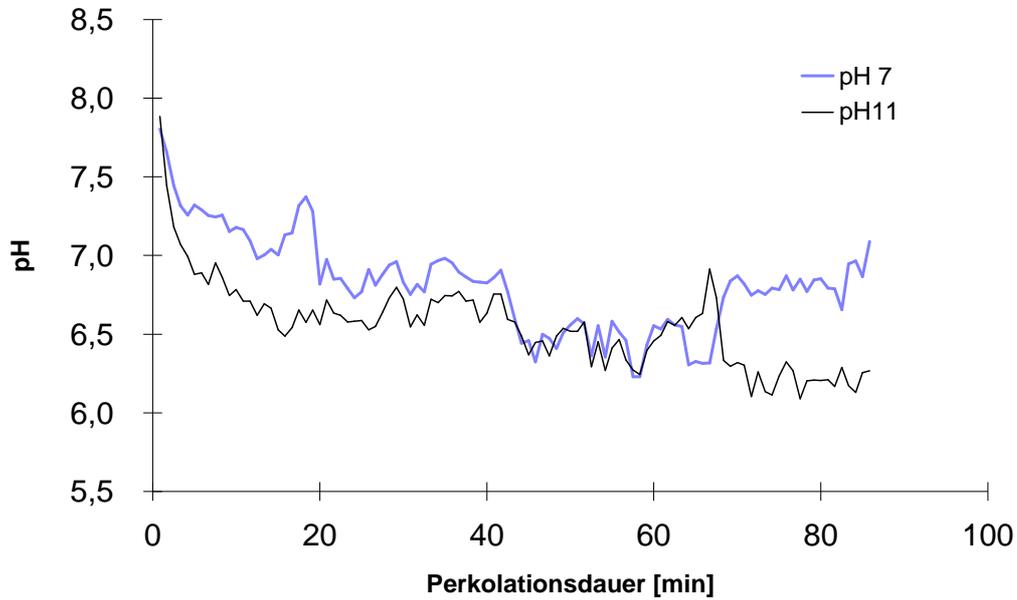


Abbildung 3.6: Verlauf des pH bei der Perkolationsdauer mit Medien von pH 7 und pH 11 am 23.01.97 zu Versuchsbeginn (oben) und nach 1 h Unterbrechung der Perkolationsdauer (unten).

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

pH 7 vom 23.01.97 (Abb. 3.6) zeigen sofort eine Regulation auf ein neutrales Milieu. Von einem Startwert des frischen Gefäßwassers bei pH 7,9 bzw. pH 7,8 fällt dieser bei dem Ansatz mit pH 11 nach 90 min sogar leicht in den schwach sauren Bereich von pH 6,3, während der Ansatz bei pH 7 einen neutralen Wert von pH 7,1 annimmt. Nach Unterbrechung der Perkolation über eine Stunde steigt der pH in den beiden Ansätzen auf pH 7,9 bzw. 8,0, um innerhalb weiterer 90 min auf jeweils pH 7,2 zu fallen. Somit konnte eine pH- Regulation auch bei Vorlage von alkalischem Medium gezeigt werden.

3.2.3 Regulation der Ionen im Gefäßwasser bei unterschiedlichen pH- Bedingungen

Um die Fähigkeit der Sprossachsen zur Regulation des Kationengehaltes im Gefäßwasser zu überprüfen, wurden jeweils 22,5 ml Lösung von unterschiedlichem pH durch die Achsen perkoliert. Dabei wurden die Veränderungen der Ionengehalte analysiert. Für den Vergleich der Ionengehalte bei Perkolation mit saurem Medium wurden 32 Experimente bei pH 3 ausgewertet, davon wurden zum Vergleich 12 Experimente zusätzlich bei pH 2, pH 5 und pH 7 durchgeführt. Die Versuche sollten Auskunft über den Verlauf der Ionenregulation und über das Verhältnis von Protonenaufnahme aus der sauren Perkolutionslösung zur Kationenfreisetzung in das Perkolat geben. Dabei wurde auch auf mögliche Unterschiede des Regulationsvermögens im Jahresgang geachtet.

Kationengehalte im Verlauf der Perkolation bei Vorlage von Medium mit pH 3 und pH 7

Wie für den Jahresgang der Kationengehalte im Gefäßwasser frisch geschnittener Sprossachsen schon dargestellt (Abb. 3.2), weisen entweder Kalium oder Calcium die höchsten Gehalte auf, mit deutlichem Abstand folgt Magnesium. Natrium und Ammonium wurden nur in Spuren nachgewiesen und sind daher hier nicht weiter dargestellt. Der pH wird über die hier dargestellte Perkulationsdauer bis zum Erreichen von 22,5 ml Perkolat fast stets auf einen pH- Wert von ca. pH 6,5 einreguliert (Abb. 3.7), und zwar sowohl bei Vorlage der Lösung mit pH 3, als auch bei dem Medium mit pH 7. Bei einem Experiment im April ist jedoch ein kurzfristiger, leichter Einbruch des pH zu beobachten (Abb. 3.8).

Im Verlauf der Perkolation zeigen K und Ca fast stets einen Anstieg vom Startwert auf ein Maximum. Danach fallen die Calciumgehalte wieder und erreichen nach 22,5 ml Perkolation Werte deutlich unterhalb des Startwertes. Diese Ergebnisse sind exemplarisch in Abb. 3.7 dargestellt. Bei den Ansätzen im Februar bleibt der Kaliumgehalt jedoch konstant auf einem Niveau (Abb. 3.7). Zu Versuchsbeginn, d.h. nach 1,5 ml Perkolation bei pH

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

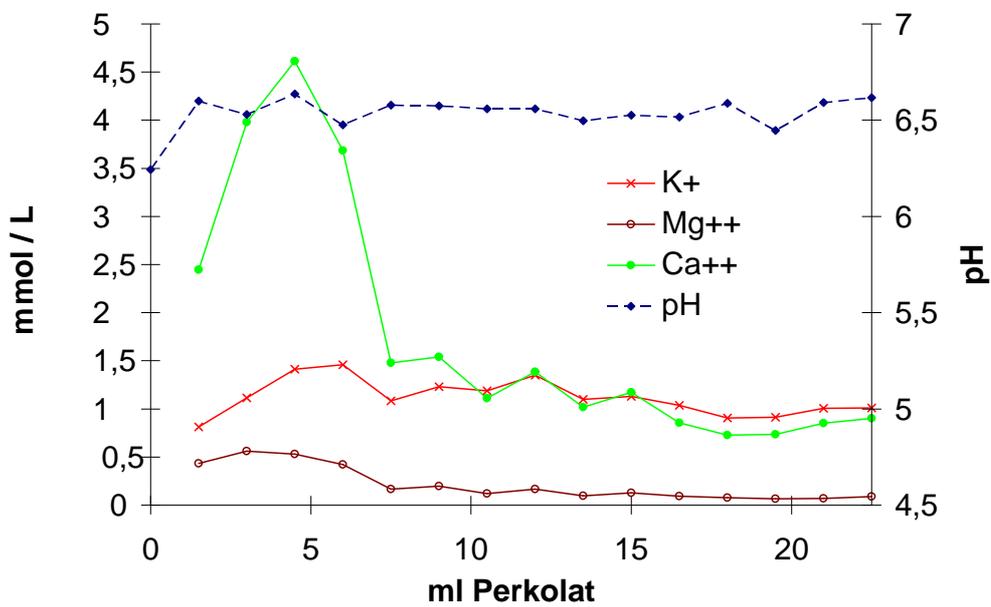
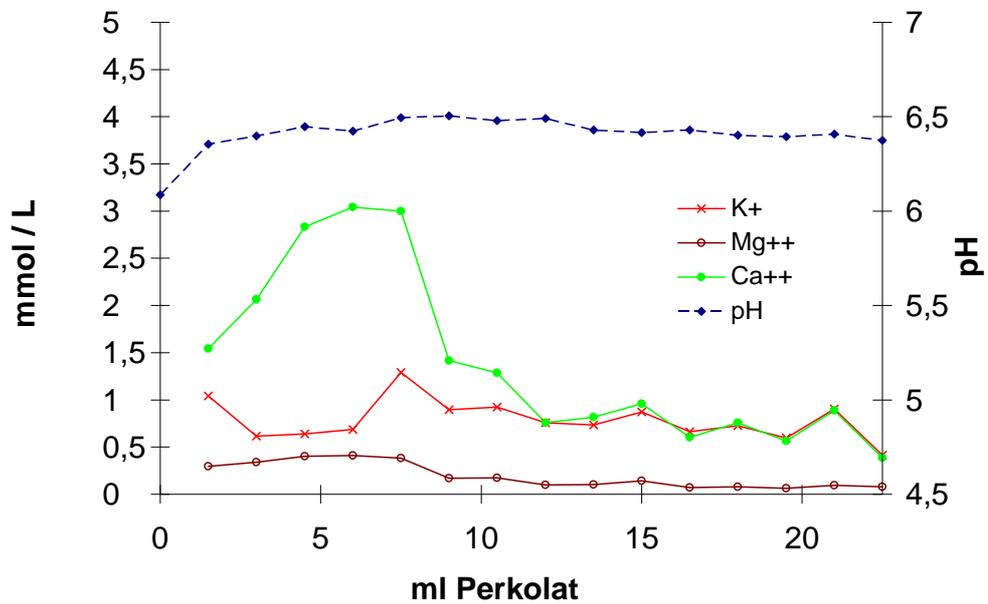


Abbildung 3.7: pH und Kationengehalte im Perkolat bei Perkolation am 25.02.99 bei pH 3 (oben) und bei pH 7 (unten).

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

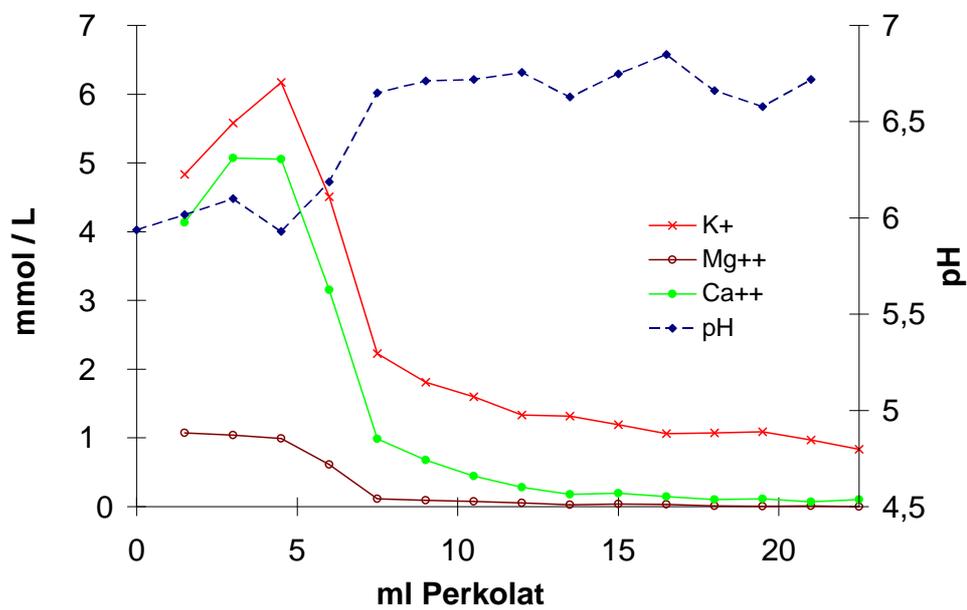
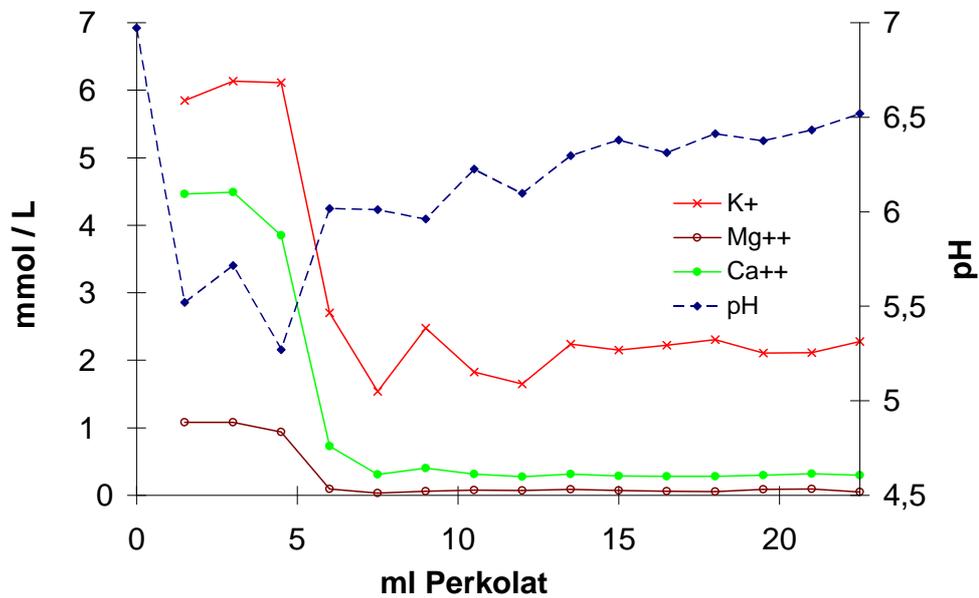


Abbildung 3.8: pH und Kationengehalte im Perkolat bei Perkolations am 27.04.99 bei pH 3 (oben) und bei pH 7 (unten).

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

3 weist Calcium an 15 von 23 Versuchstagen höhere Werte auf als Kalium. Bei Versuchsende dagegen dominiert Kalium in 19 von 23 Fällen. Die Perkolations sowohl bei pH 3 als auch bei pH 7 läßt dagegen bei Versuchsende ein deutliches Überwiegen des Kaliumgehaltes erkennen (Abb. 3.8).

Betrachtet man diese Ergebnisse im Jahresgang, so zeigt Kalium an sechs Probetagen in Folge im Frühjahr von April bis Juni sowie an zwei aufeinander folgenden Probetagen im August bei Perkolations mit pH 3 jedoch die höhere Startkonzentration auf (Tab. 3.1). Gegen Ende der Perkolations überwiegt dagegen - mit Ausnahme der Periode von November bis Februar - stets das K^+ im Perkolat. Die Ergebnisse, bei denen nach 22,5 ml Perkolations die Konzentration von Calcium höher lag als die von Kalium, wurden nur im Zeitraum außerhalb der Vegetationsperiode von November bis Februar erhalten. Der Kaliumgehalt bei vier Analysen im Mai und Juni und bei je einer Analyse im September und Oktober betrug sogar mehr als das Zehnfache des Calciumgehaltes (Tab. 3.1).

Freisetzung von Kalium und Calcium bei Perkolations mit Medien von verschiedenem pH

Um festzustellen, inwieweit der pH- Wert des perkolierten Mediums einen Einfluß auf die Freisetzung von Kalium und Calcium hat, wurden an neun Probetagen Perkolations mit vier Medien von unterschiedlichem pH (pH 2, pH 3, pH 5, pH 7) durchgeführt (Tab. 3.2). Vergleicht man die Ansätze mit unterschiedlichem pH anhand der Menge an abgegebenem Kalium sowie Calcium in den ersten 18 ml Perkolat (siehe auch Abb. 3.9 und 3.10), so ergibt sich weder für Kalium noch für Calcium eine feste Rangfolge der vier Ansätze bezüglich der Ionengehalte (Tab. 3.2).

Auf den ersten Blick zeigt sich keine einfach ersichtliche pH- Abhängigkeit der Freisetzung von Kalium und Calcium. Jedoch sind Trends erkennbar: Bei Vergleich der Ansätze mit unterschiedlichem pH finden sich bei Vorlage von pH 2 an 8 von 9 Versuchstagen die höchsten Gehalte an Kalium im Vergleich zu den Ansätzen mit den höheren pH- Werten. Bei Calcium finden sich entsprechend an 6 von 9 Probetagen die höchsten Gehalte. Vergleicht man die Rangfolge der Ansätze für Kalium und Calcium, so ist sie in 3 von 9 Ansätzen gleich, in 4 Ansätzen unterscheiden sich die Rangfolgen in nur einer Position. Dabei liegen die Ansätze bei pH 7 für Calcium in der Rangfolge jeweils um eine Position höher. Nur in den beiden Ansätzen Mitte November und Dezember zeigen sich größere Unterschiede. In der Rangfolge der Ionengehalte führen die Ansätze mit pH 2, gefolgt von denen mit pH 7, pH 3 und pH 5 (Tab. 3.2).

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

pH 3	K/Ca	K/Ca
1999	Perkolation 0-1,5 ml	Perkolation 21-22,5 ml
22.01.	0,67	2,08
10.02.	0,50	0,995
22.02.	0,35	0,84
25.02.	0,67	1,07
02.03.	0,39	2,09
03.03.	0,66	1,52
07.04.	0,51	2,88
27.04.	1,31	7,67
18.05.	1,82	17,11
31.05.	1,77	5,88
16.06.	1,12	13,17
17.06.	1,82	12,30
25.06.	0,53	13,20
14.07.	0,47	3,64
18.08.	1,90	9,46
25.08.	1,58	6,08
26.08.	0,67	7,40
02.09.	0,92	4,99
17.09.	0,67	2,47
23.09.	0,53	16,51
15.10.	0,64	13,93
18.11.	0,25	0,95
16.12.	0,21	0,20

Tabelle 3.1: Verhältnis von Kalium zu Calcium bei Perkolation mit Medium von pH 3 nach Beginn (0-1,5ml) und im Verlauf der Perkolation (21-22,5ml) im Jahre 1999.

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

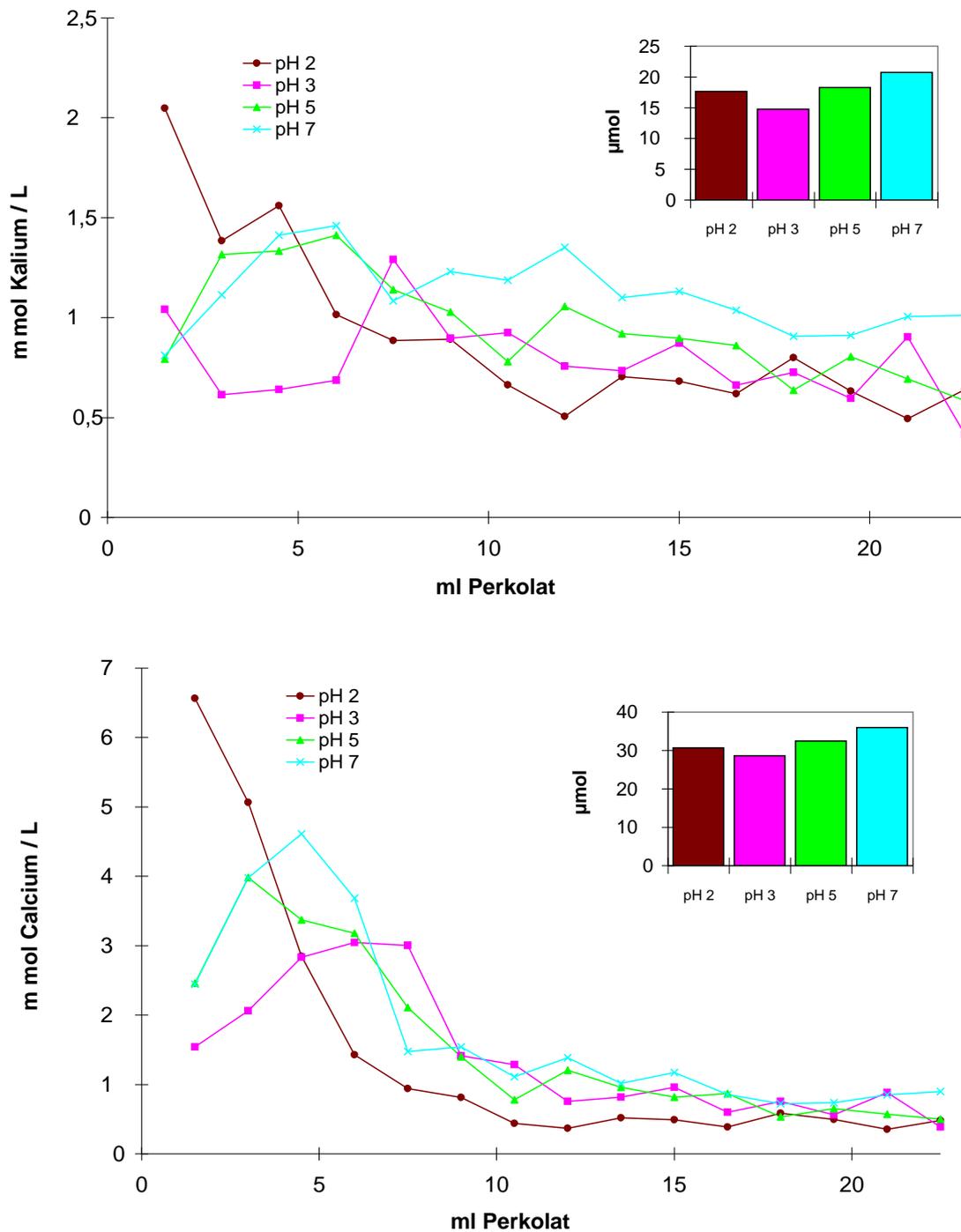


Abbildung 3.9: Gehalte an Kalium (oben) und Calcium (unten) bei Perkolati-
on mit verschiedenem pH am 25.02.99. Die Säulen zeigen die Gesamtmenge
an Kalium bzw. Calcium in den ersten 18 ml Perkolat.

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

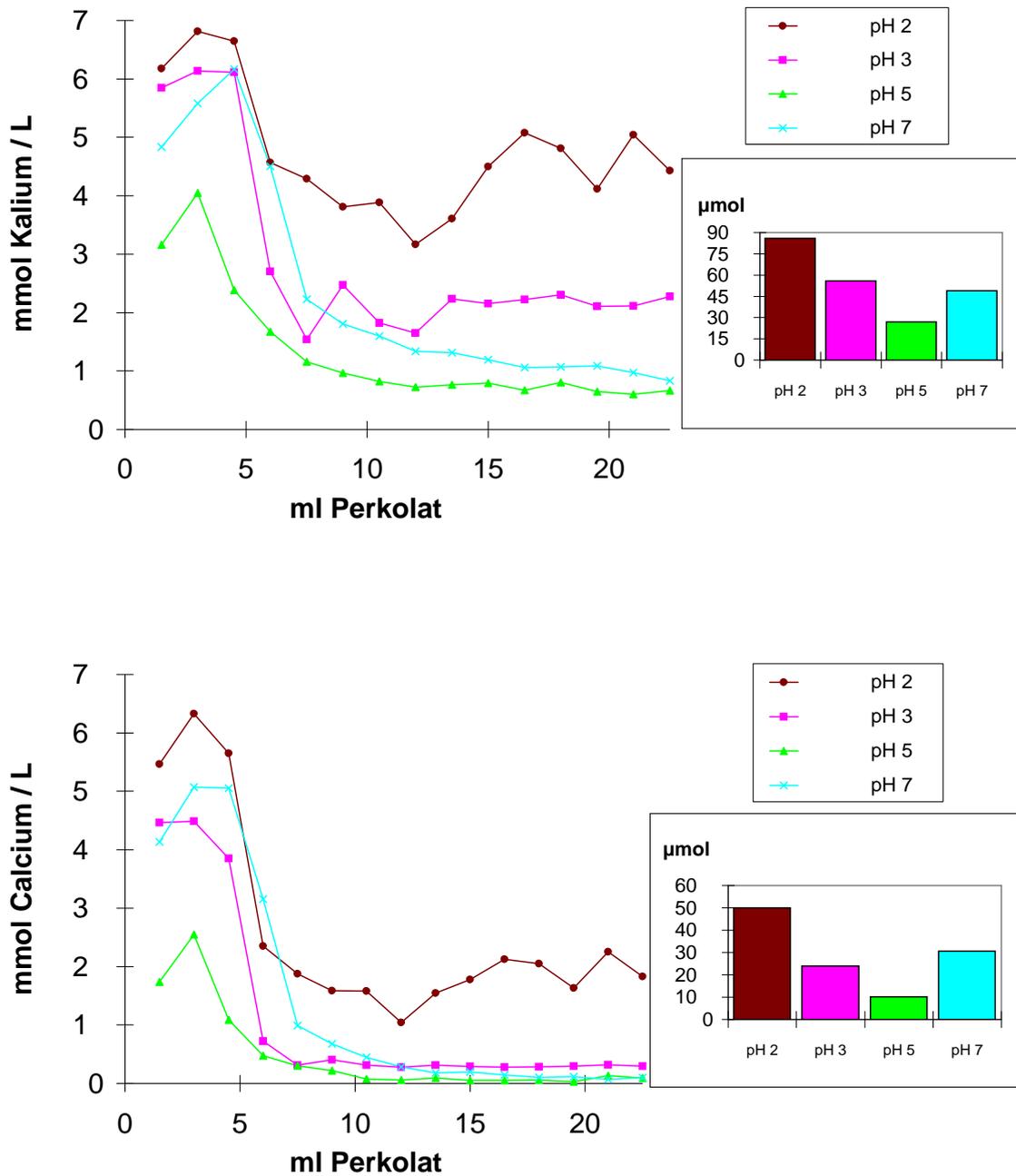


Abbildung 3.10: Gehalte an Kalium (oben) und Calcium (unten) bei Perkolatation mit verschiedenem pH am 27.04.99. Die Säulen zeigen die Gesamtmenge an Kalium bzw. Calcium in den ersten 18 ml Perkolat.

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

Tag	Kalium	Calcium
25.02.	7-5-2-3	7-5-2-3
27.04.	2-3-7-5	2-7-3-5
18.05.	2-7-3-5	7-2-3-5
17.06.	2-5-3-7	2-5-7-3
02.09.	2-7-3-5	2-7-3-5
17.09.	2-3-5-7	2-3-7-5
15.10.	2-7-3-5	2-7-3-5
18.11.	2-7-5-3	2-5-3-7
16.12.	2-7-3-5	3-2-5-7

Tabelle 3.2: Rangfolge der Versuchsansätze bei unterschiedlichem pH anhand der Ionengehalte von Kalium bzw. Calcium im Jahre 1999. Die Folge 7-5-2-3 bedeutet z.B. für Kalium: Die Menge der abgegebenen Kaliumionen in das Perkolat war bei Perkolations mit pH 7 am höchsten, gefolgt von pH 5, pH 2 und zuletzt pH 3.

Bilanzen von Ionenabgabe und Protonenaufnahme bei Vorlage von Medium mit pH 3

Um die Rolle der Kationenfreisetzung aus Zellen und Zellwänden für die pH-Regulation bewerten zu können, ist eine Bilanzierung von Protonenaufnahme und Ionenabgabe in das Perkolat von Interesse. Wenn die Protonenaufnahme durch die Freisetzung von Kationen vollständig kompensiert wird, so ist eine ausgeglichene Bilanz zwischen Protonenaufnahme und Kationenabgabe in das Perkolat zu erwarten. Zu berücksichtigen ist jedoch auch die im Gefäßwasser des geschnittenen Sprossachsenabschnittes gespeicherte Menge an Kationen, die von der aus dem Perkolat gewonnenen Menge abzuziehen ist (s. 2.4.4). Hält sich der pH für die betrachtete Perkolationsdauer über einem Wert von pH 6, so sind über 99,9 % der bei pH 3 angebotenen Protonen neutralisiert worden, das sind etwa 1 mmol Protonen pro ml perkoliertes Medium. Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch eine ausgeglichene Ladungsbilanz (Abb. 3.11, oben), eine deutlich positive Bilanz an Kationen (Abb. 3.11, unten), eine negative Bilanz (Abb. 3.12, oben) und eine leicht negative (Abb. 3.12, unten). Bei einer Auswertung von 23 Versuchstagen im Verlauf des Jahres 1999 ergibt sich bei 18 Tagen für die ersten 18 ml der Perkolations eine positive Ladungsbilanz, d.h. es werden mehr Kationen in das Perkolat abgegeben als Protonen aufgenommen. Bei zwei Analysen im März und September ist die Bilanz in etwa ausgeglichen. Bei drei Analysen im Zeitraum von Juli bis September liegt eine negative Ladungsbilanz vor. Betrachtet man nur die letzte Analyse nach 22,5 ml Perkolations, so ist die Ladungsbilanz für die letzten 1,5 ml noch in 15 von 23 Fällen positiv (ohne Abbildung). Die Ergebnisse zeigen das Potential der Sprossachsen auf,

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

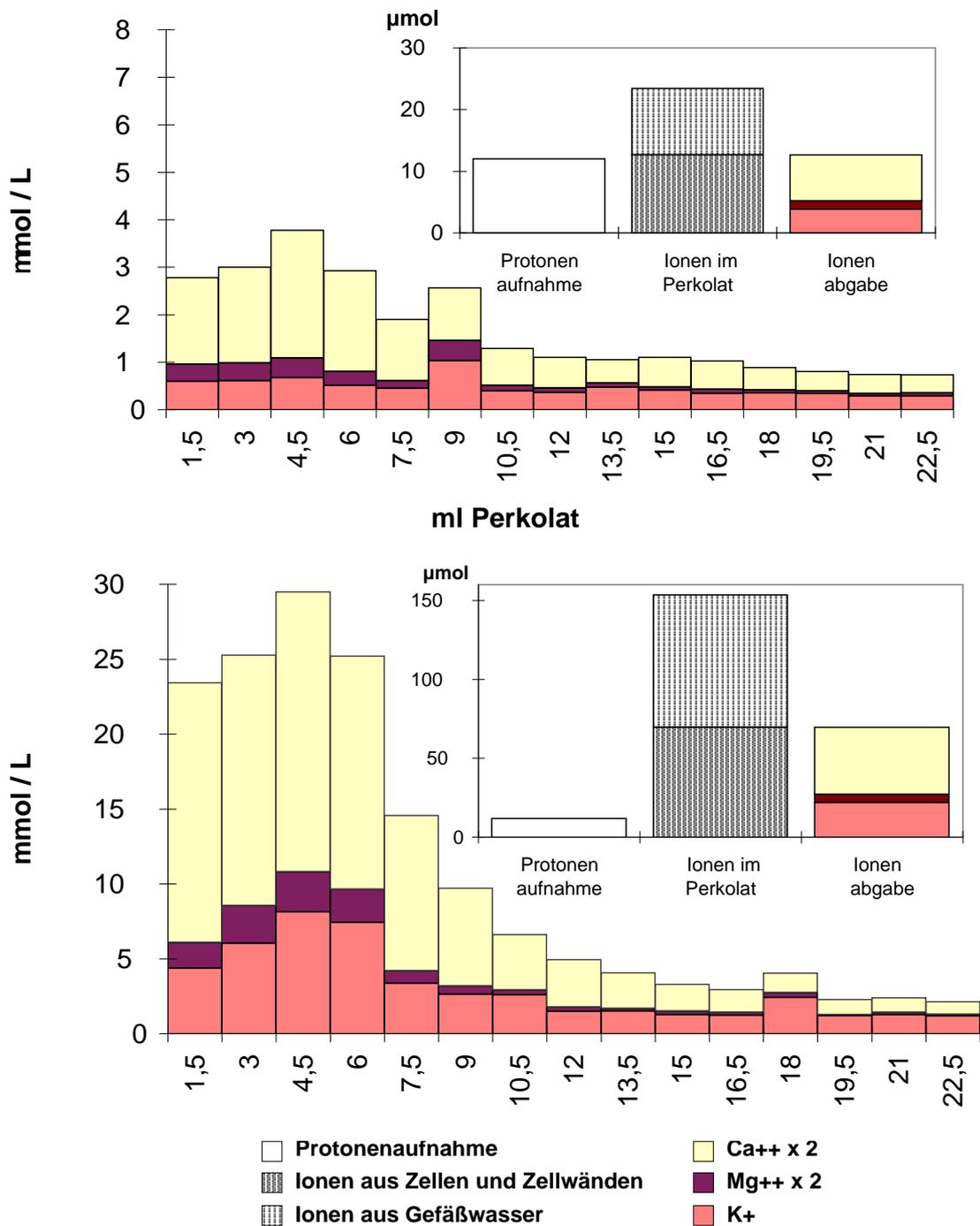


Abbildung 3.11:

Verlauf der Ionenkonzentrationen (bei Ca und Mg x 2) im Perkolat und Bilanzen von Ionenabgabe und Protonenaufnahme bei Perkoliation von Medium mit pH 3 am 03.03.99 (oben) und 07.04.99 (unten). Die Menge an Ladungen der Kationen ist gegen das bisher perkolierte Volumen aufgetragen. Im Inset ist die Menge der Kationen im Perkolat der berechneten Protonenaufnahme gegenübergestellt.

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

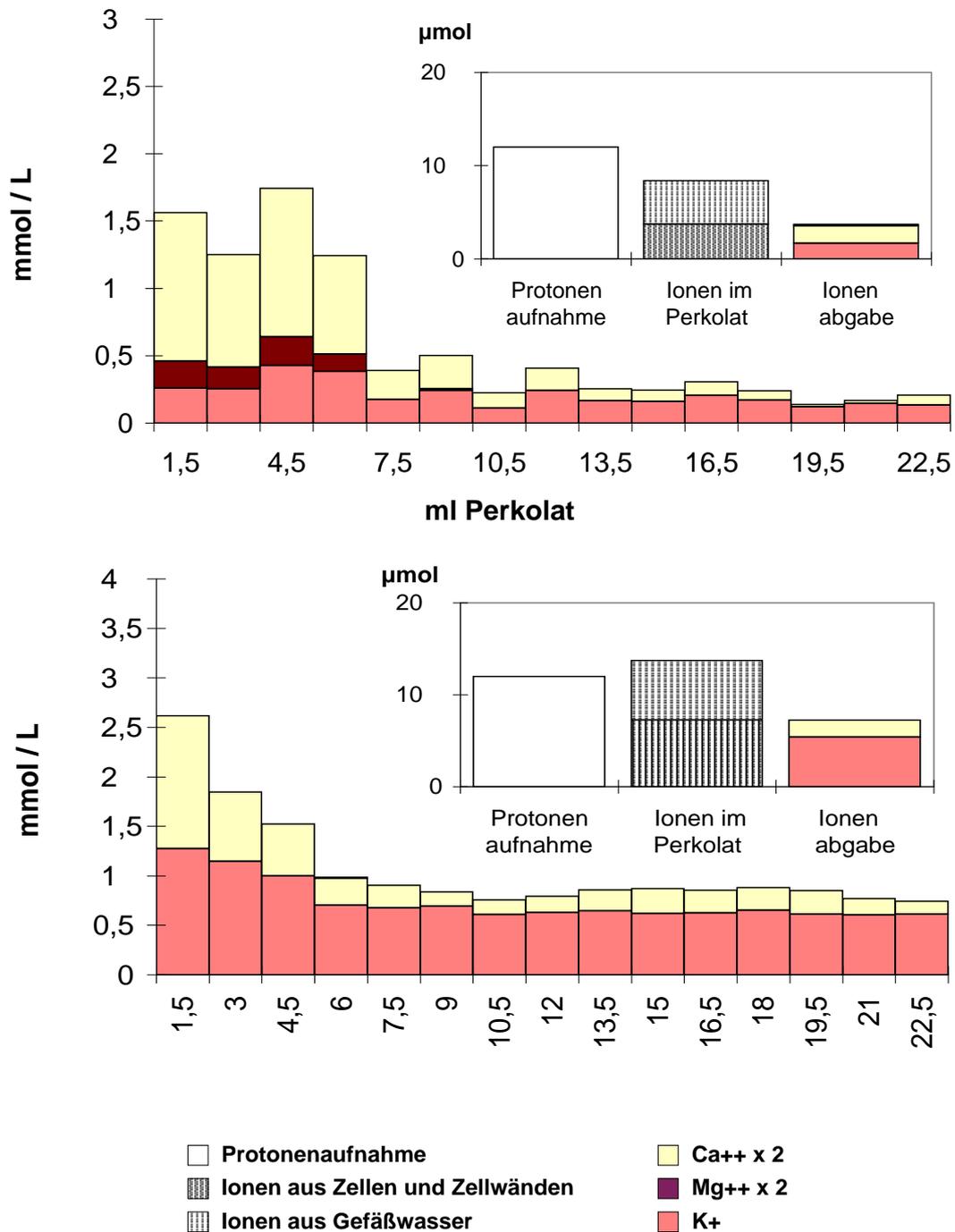


Abbildung 3.12: Verlauf der Ionenkonzentrationen (bei Ca und Mg x 2) im Perkolat und Bilanzen von Ionenabgabe und Protonenaufnahme bei Perkolatation von Medium mit pH 3 am 14.07.99 (oben) und am 18.08.99 (unten). Details siehe Abb. 3.11.

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

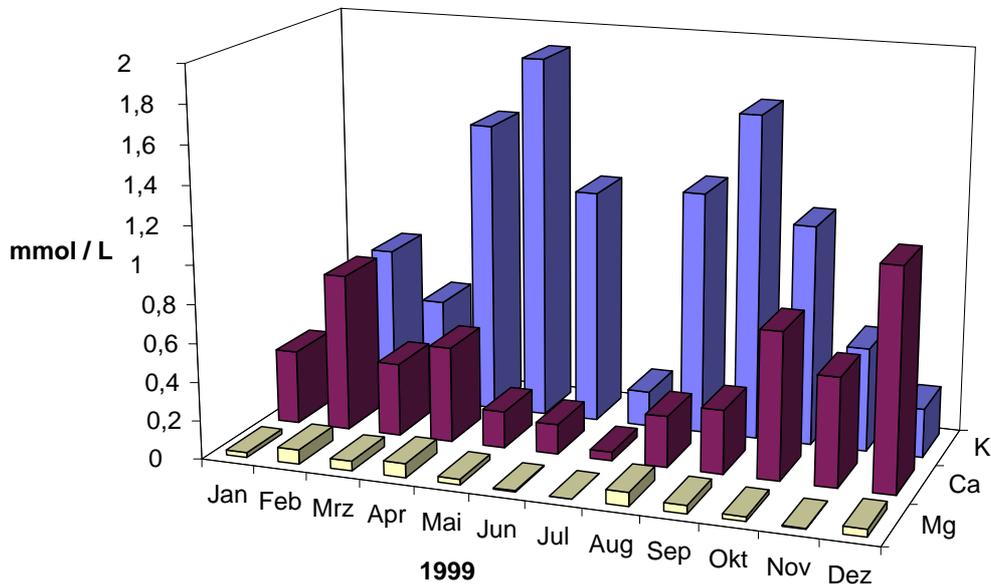


Abbildung 3.13: Kationengehalte in 12 ml Perkolat in den verschiedenen Jahreszeiten bei Perkolatation mit Medium von pH 3. Das Perkolat wurde erst nach vorangegangenem Ausspülen des Gefäßwassers mit 10,5 ml Medium aufgefangen.

die Protonenaufnahme durch Freisetzung von Kationen zu kompensieren. Gleichzeitig werfen sie die Frage auf, ob und wie der Überschuß an positiven Ladungen kompensiert werden kann.

Kationenabgabe in das Perkolat nach Auswaschen des Gefäßwassers

Nach den ersten 10,5 ml Perkolat ist das Gefäßwasser nahezu vollständig ausgespült (siehe 2.4.4). Der in etwa lineare Verlauf der Kationengehalte im folgenden Perkolat spricht dabei für eine mehr oder weniger konstante Abgabe in das Perkolat. Die Abgabe von Kalium und Calcium in das Perkolat bei den darauf folgenden 12 ml Perkolat zeigt deutliche Unterschiede im Jahresgang (Abb. 3.13). Für Kalium steigen die Werte von Jahresbeginn bis zum Mai an, fallen dann im Juli auf ein Minimum, steigen wiederum bis September und fallen dann bis zum Jahresende ab. Für Calcium liegen sie im Winter auffallend hoch und fallen dann von Februar bis auf ein Minimum im Juli. Sie steigen dann im Herbst wieder an und bleiben in den Wintermonaten trotz Schwankungen auf einem recht hohen Niveau. Magnesium zeigt

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

Vorlage pH 3 nach	K	Ca	Mg	Vorlage pH 7 nach	K	Ca	Mg
19,5 ml	668	662	74	19,5 ml	117	132	18
21,0 ml	502	513	56	21,0 ml	132	125	15
22,5 ml	412	351	43	22,5 ml	118	109	14
30,0 ml	497	489	56	30,0 ml	121	117	15
60,0 ml	340	450	45	60,0 ml	141	139	19
300,0 ml	274	477	70	300,0 ml	72	112	9

Tabelle 3.3: Gehalt an K, Ca, Mg im Perkolat in μM in Abhängigkeit des perkolierten Volumens bei Vorlage von pH 3 bzw. pH 7 am 15.07.97

die höchsten Werte von Februar bis April und im Spätsommer, weist aber insgesamt im Vergleich zu Kalium und Calcium sehr geringe Werte auf.

3.2.4 Langzeitexperimente

Bei vielen Experimenten dauert die pH- Regulation über den beobachteten Zeitraum von meist 15 Stunden hinaus an. Deshalb sollte in Langzeitexperimenten geklärt werden, wie lange die Regulation aufrecht erhalten werden kann. Nach Erschöpfung der Speicherkapazität der Zellwände oder der Freisetzung von Kalium aus lebenden Zellen in das Gefäßwasser ist keine Regulation mehr zu erwarten. Auch bei Langzeitexperimenten konnte das Ende der Regulation nicht immer bestimmt werden. So konnte im Oktober 1998 über mehr als drei Tage hinweg der pH bei einer Vorlage von pH 3 reguliert werden, er lag nach drei Tagen noch bei pH 5,9. Bei einer Perkulationsrate von 25 ml pro Stunde entspricht dies einer Menge von 1,8 l Perkolat. Solange die Regulationsfähigkeit des Sprossachsenabschnittes erhalten bleibt, werden Kationen in einer mehr oder weniger konstanten Rate in das Perkolat abgegeben (Tab. 3.3). Erst nach 300 ml tritt Kalium gegenüber Calcium deutlich zurück.

Bricht die Regulation jedoch zusammen, so sind im Perkolat vor allem höhere Mengen an Ca nachzuweisen. Ein Experiment vom 04.07.1996 bei bei Vorlage von pH 3 zeigt die deutlich erhöhte Ca- Abgabe nach einem Einbruch des pH auf etwa pH 3,5 im Vergleich zum Ansatz mit pH 7 (Abb. 3.14).

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

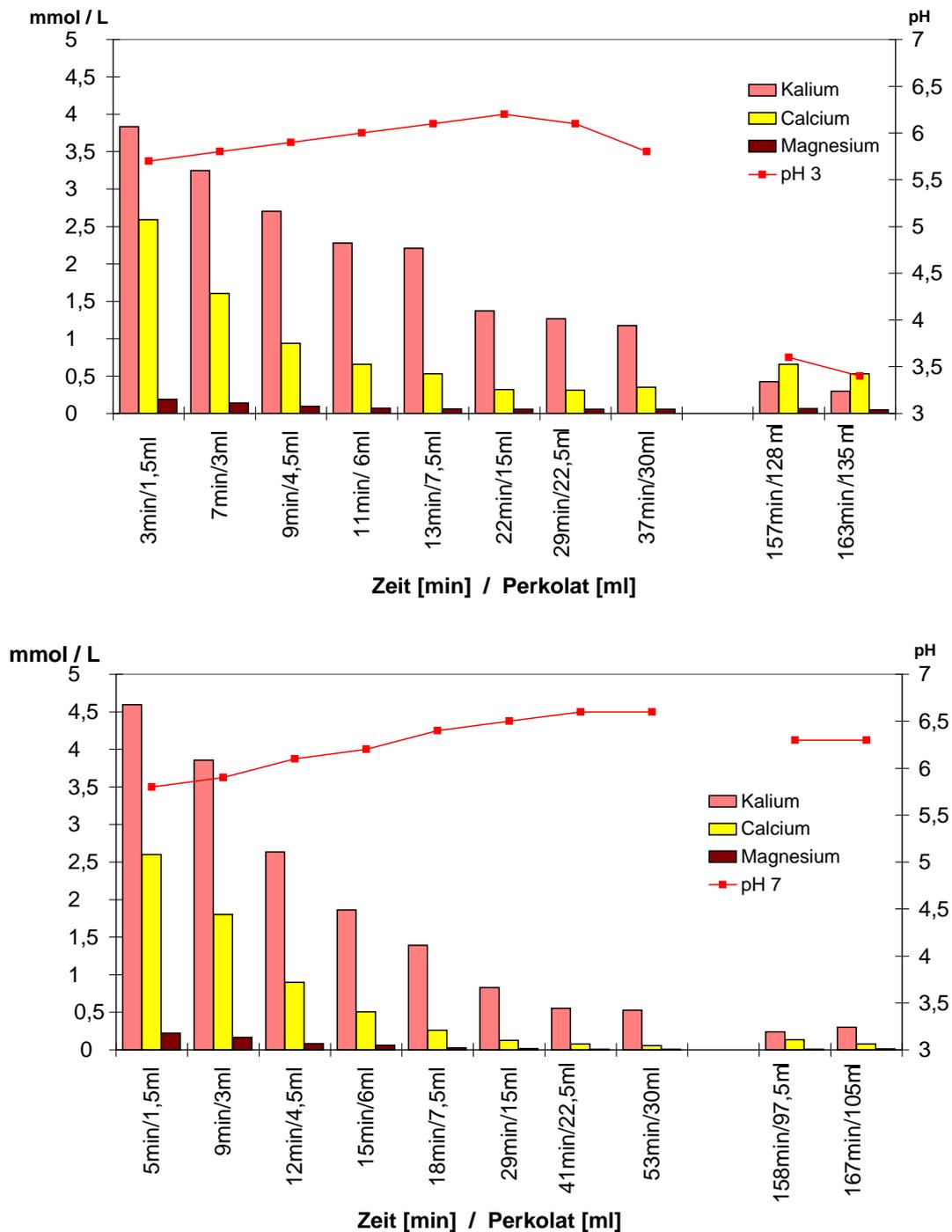


Abbildung 3.14: pH und Kationengehalt (K, Ca, Mg) im Perkolat am 04.07.1996 bei länger anhaltender Perkolation über 3 h mit pH 3 (oben) sowie mit pH 7 (unten). Die Kationengehalte wurden mit einem Atomabsorptionsspektrometer bestimmt.

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

3.2.5 Jahreszeitliche Veränderung des Regulationsvermögens des pH bei Vorlage von Medium mit pH 3

Bei den Experimenten zur pH- Regulation, die unter 3.2.3 schon vorgestellt wurden, wurden die Achsenabschnitte im Jahre 1999 mindestens über 15 Stunden und in der Regel über 500 ml mit der angebotenen Lösung perkoliert. Eine Betrachtung der Ergebnisse im Jahresvergleich zeigt, ob die Fähigkeit zur pH- Regulation sowie die sich einstellenden pH- Werte im Jahresverlauf Unterschiede aufweisen.

Unterschreiten einer pH- Schwelle von pH 5

Bei einer Betrachtung über das Jahr hinweg (Abb. 3.15) zeigt sich von kurzen Phasen im Februar, April, Juli und Oktober abgesehen eine langanhaltende Regulation des pH in einen physiologischen Bereich oberhalb von pH 5. In 17 von 39 Experimenten wurden mehr als 500 ml Lösung von pH 3 neutralisiert, in neun Ansätzen waren es 300 bis 500ml, in weiteren neun 100 bis 300 ml und nur in vier weniger als 100 ml. Betrachtet man die Zeitdauer der Regulation (Abb. 3.15), so liegt bei 16 von 38 Experimenten bei Vorlage mit Medium von pH 3 der pH nach 15 Stunden noch über der Marke von pH 5. Bei 9 Ansätzen wurde diese Marke nach mehr als 8 Stunden, bei 11 Ansätzen nach mehr als 2 Stunden und bei 2 Ansätzen nach weniger als zwei Stunden unterschritten. Dies belegt die langanhaltende Fähigkeit zur Regulation des pH in den Gefäßen.

Einstellung des pH nach mehreren Stunden Perkolation

Die nächste Darstellung (Abb. 3.16) zeigt, welcher pH sich nach einer bestimmtem Zeitdauer der Perkolation einstellt. Vergleicht man den pH nach zwei Stunden sowie nach zehn Stunden, so wird ein ähnlicher Verlauf deutlich. Im Juli und Oktober sind nach zehn Stunden Perkulationsdauer deutliche Einbrüche sogar unterhalb der Marke von pH 3,5 erkennbar. Während nach zwei Stunden Perkolation der pH regelmäßig von pH 3 auf einen pH zwischen pH 6 und pH 7 einreguliert wird und nur an einem Tag der pH unterhalb von pH 5 liegt, wird nach zehn Stunden an 15 von 38 Tagen die Marke von pH 5 unterschritten.

3.2.6 Unterbrechung der Zufuhr von saurem Medium

Bei einigen Experimenten wurde die Zufuhr von saurem Medium für einige Stunden unterbrochen. Damit wurde der Frage nachgegangen, ob die Regulation in der eingelegten Regenerationsphase vervollständigt wird oder gar eine Überkompensation der Regulation stattfindet, d.h. ob höhere pH-Werte

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

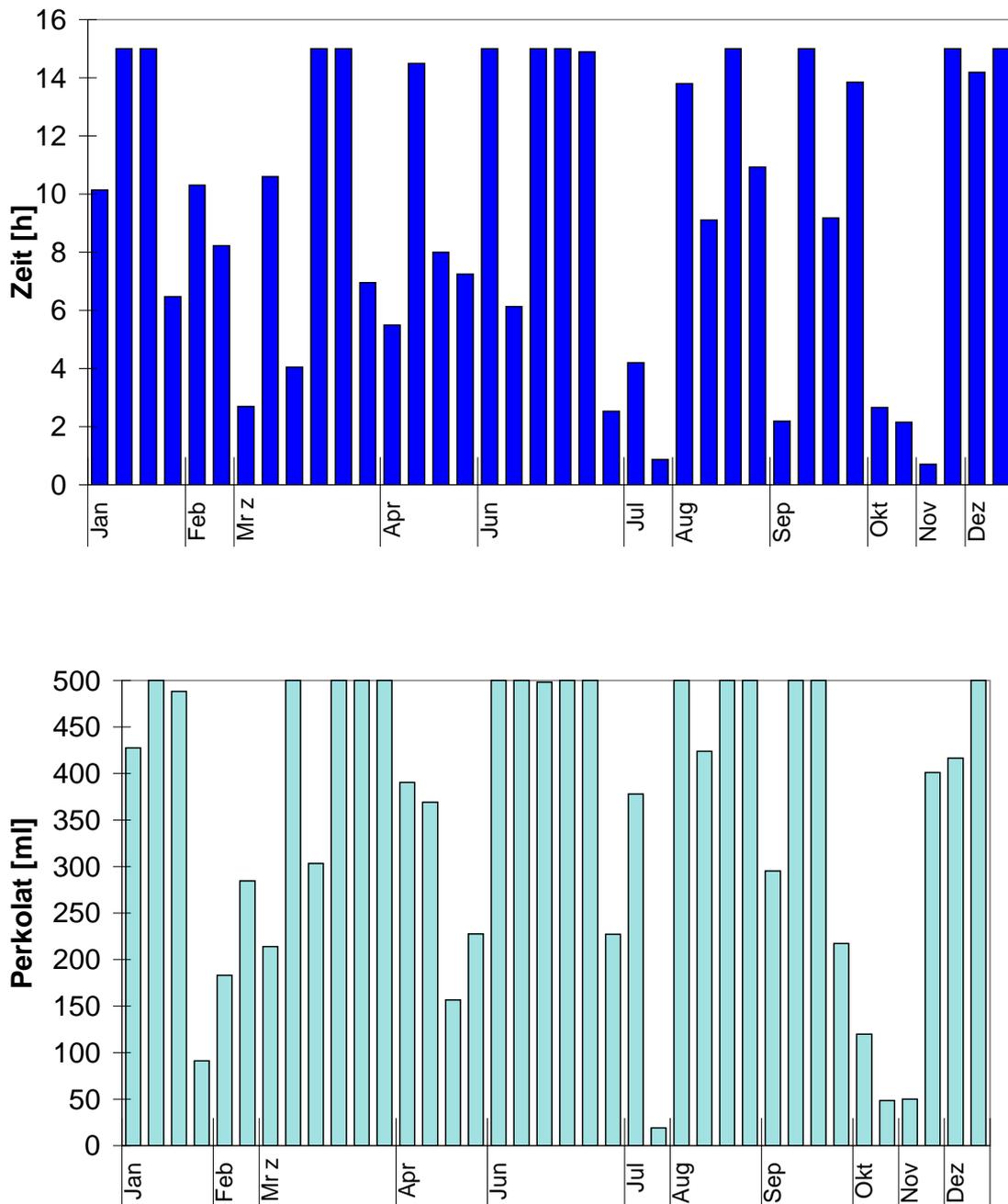


Abbildung 3.15: Perkolationsdauer (oben) und Perkolationsvolumen (unten) bis zur Unterschreitung von pH 5 bei Perkolation mit pH 3 im Jahre 1999 bei einer Versuchsdauer von 15 Stunden.

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

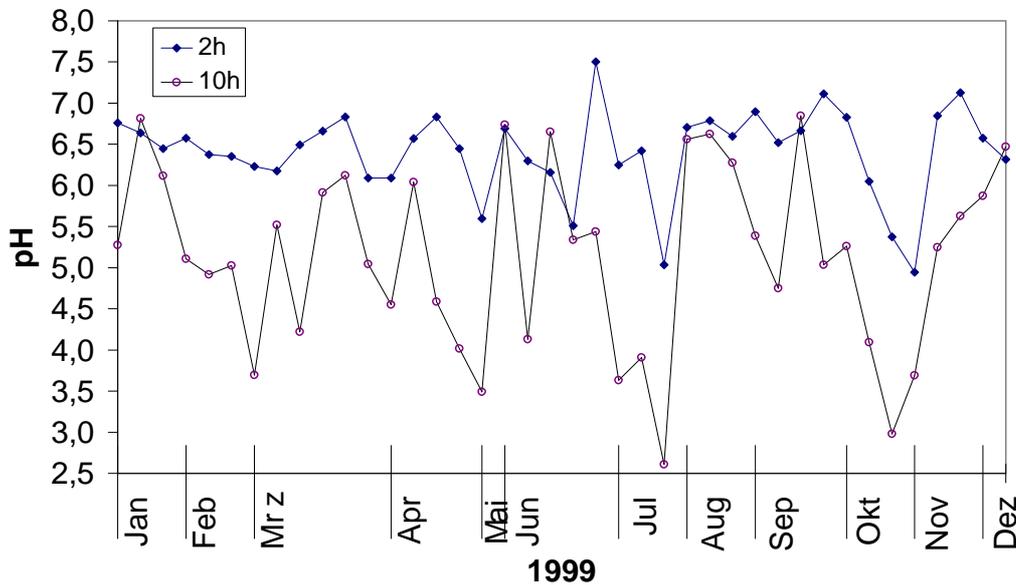


Abbildung 3.16: pH im Perkolat nach 2 h und nach 10 h Perkolationsdauer bei Perkolationsdauer mit pH 3 im Jahr 1999.

als zu Beginn des Experimentes auftreten können. Letzteres wäre ein guter Hinweis auf eine aktiv unterstützte Regulation.

Im folgendem Experiment im August 1996 wurde ein Astabschnitt bei pH 3 und ein Astabschnitt bei pH 7 zunächst für zwei Stunden perkoliert (Abb. 3.17), nach einer Unterbrechung für vier Stunden wurde die Perkolation noch anderthalb Stunden fortgesetzt. Der pH lag zu Beginn des Experimentes bei dem Ansatz mit pH 3 bei pH 5,5 und stieg während der Perkolation leicht auf pH 5,8. Nach Wiederaufnahme der Perkolation nach vier Stunden war der pH auf pH 8,0 angestiegen. Er fiel im Verlauf der folgenden anderthalb Stunden auf einen Wert von pH 6,1. Der Ansatz mit pH 7 zeigte zunächst einen ähnlichen Verlauf: Der pH stieg von einem Startwert von pH 5,2 zunächst auf pH 5,6 an. Nach Fortsetzung der Perkolation blieb der pH bei einem Wert von pH 5,4 jedoch etwa gleich. Bei Versuchsende lag er nur noch bei pH 4,2. Der Achsenabschnitt, der vorher dem sauren Milieu ausgesetzt war, hat also während der Perkulationspause den pH nicht nur neutralisiert, sondern eine deutliche Überkompensation geleistet.

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

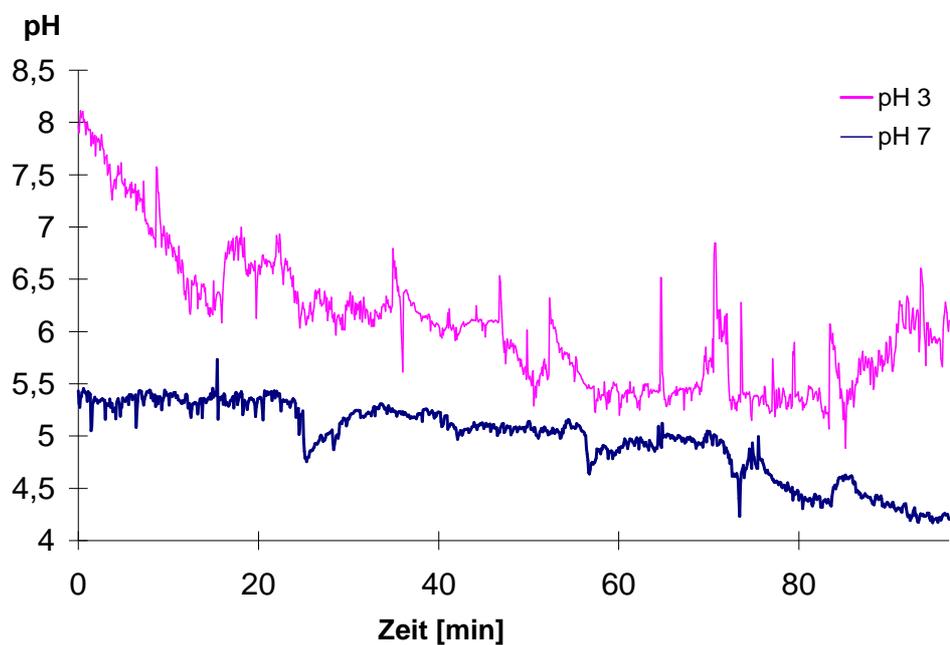
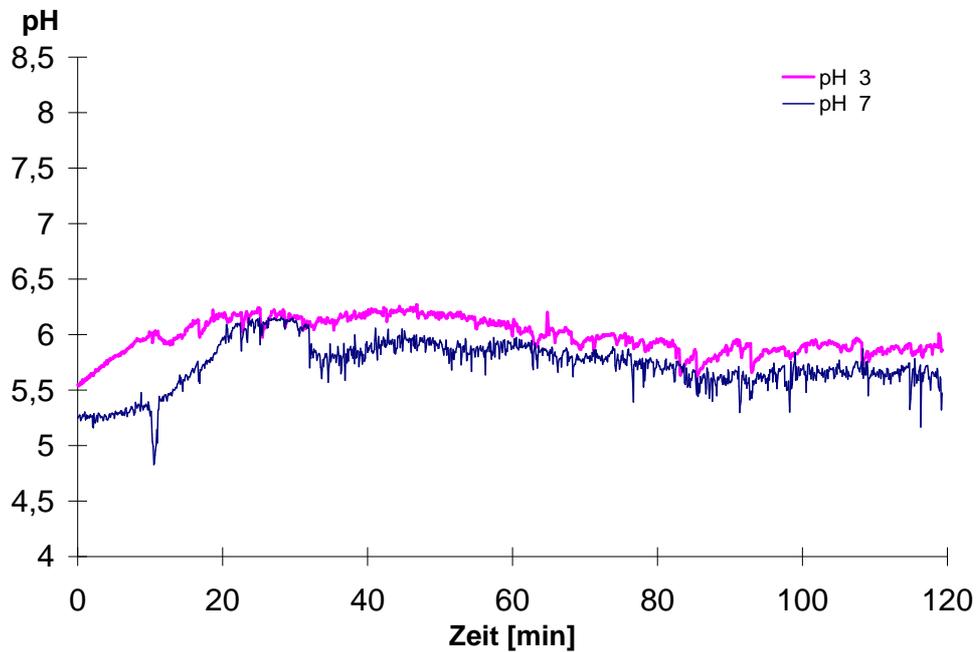


Abbildung 3.17: Verlauf des pH im Perkolat bei der Perkolatation mit pH 3 und pH 7 am 16.08.96 zu Versuchsbeginn (oben) und nach 4 h Unterbrechung der Perkolatation (unten).

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

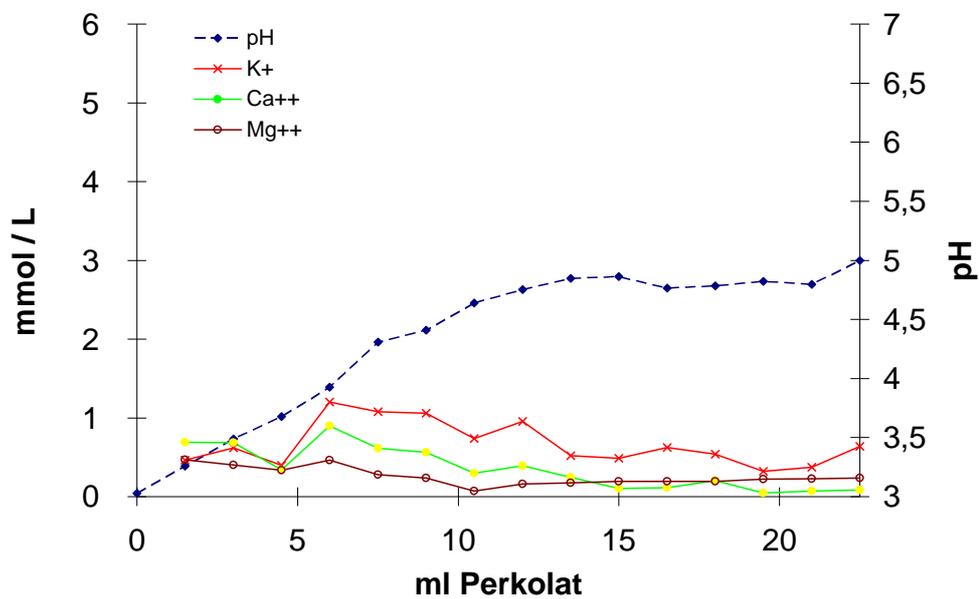
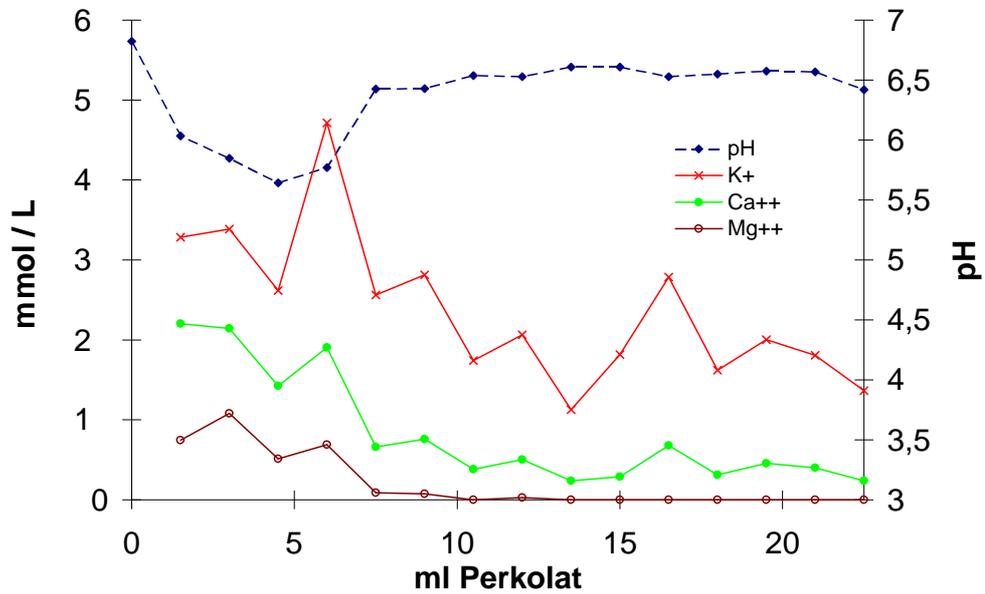


Abbildung 3.18: pH und Kationengehalte nach Perkolation mit pH 3 mit dem frischen Sprossabschnitt (oben) am 25.08.99 und dem gelagerten Sprossabschnitt am 26.08.99 nach 24 h Lagerung (unten).

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

3.2.7 Lagerung des geernteten Sprosses bei Zimmertemperatur

Um insbesondere den Einfluß der Atmungsaktivität auf pH und Kationengehalt im Perkolat und deren Regulationsfähigkeit untersuchen zu können, wurde mit einem Sprossachsenabschnitt sofort eine Perkolation bei Vorlage von pH 3 durchgeführt, eine Parallelprobe wurde hingegen zunächst für 24 Stunden bei Zimmertemperatur gelagert. Die Kationengehalte der Experimente vom 25.08. und 26.08.99 zeigen deutliche Unterschiede (Abb. 3.18). Die Gehalte an Kalium und Calcium der gelagerten Probe liegen über den Verlauf der Perkolation hinweg stets deutlich unter den Gehalten der frischen Probe. Nach 18 ml Perkolation wurden von der frischen Probe eine Kaliumabgabe von 45,8 μmol und eine Calciumabgabe von 17,3 μmol ermittelt. Im Vergleich dazu lagen die Werte für die gelagerte Probe bei 9,8 μmol für Kalium und 6,7 μmol für Calcium. Beide Achsenabschnitte zeigen eine deutliche und langanhaltende pH-Regulation. Die frische Probe zeigt zu Versuchsbeginn einen pH von 7,0, nach 22,5 ml Perkolation liegt er bei pH 6,4 und nach 15 h Perkolation bei pH 5,0. Die Vergleichswerte für die gelagerte Probe liegen bei pH 3,0, pH 5,0 und pH 5,1. Auffällig ist die starke Absenkung des pH nach 24 h Lagerung. Nach Perkolation mit pH 3 ist sie sogar teilweise reversibel, d.h. der pH steigt während der Perkolation wieder deutlich an.

3.2.8 Einfluß von Komplexbildnern (EDTA) auf die Freisetzung von Kationen und auf die pH-Regulation

Im folgenden wurde untersucht, ob und in welchem Umfang durch einen Komplexbildner wie EDTA zusätzliche Kationen etwa aus den Zellwänden mobilisiert werden können und ob die pH-Regulation dadurch schneller zum Erliegen kommt. Die dargestellten Versuche wurden mit Medium von pH 3 durchgeführt.

Bei einem Experiment im März 1999 mit 100 μM Na_2EDTA (Abb. 3.19) zeigt sich eine deutlich erhöhte Freisetzung von Calcium und Kalium im Vergleich zum Ansatz ohne EDTA. Nach 18 ml Perkolation ergibt sich für die Abgabe von Calcium eine Gesamtbilanz von 5,1 μmol ohne und 23,3 μmol mit EDTA und für Kalium von 17,9 μmol ohne und 24,4 μmol mit EDTA. Die Freisetzung an Kalium und Calcium ist damit höher als die Bindungskapazität der perkolierten EDTA, die bei 2·0,1 mmol/L und damit für 18 ml bei 3,6 μmol liegt. Die Freisetzung von Calcium ist somit deutlich höher, als bei einer stöchiometrischen Reaktion zu erwarten wäre. Der pH wird in beiden Ansätzen während der Versuchsdauer vollständig reguliert, er bleibt beim Ansatz ohne EDTA bei pH 6,3 und beim Ansatz mit EDTA fällt er nicht signifikant von pH 6,6 auf pH 6,5.

Ein Experiment mit höherer Konzentration an EDTA (5 mmol/L) am

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

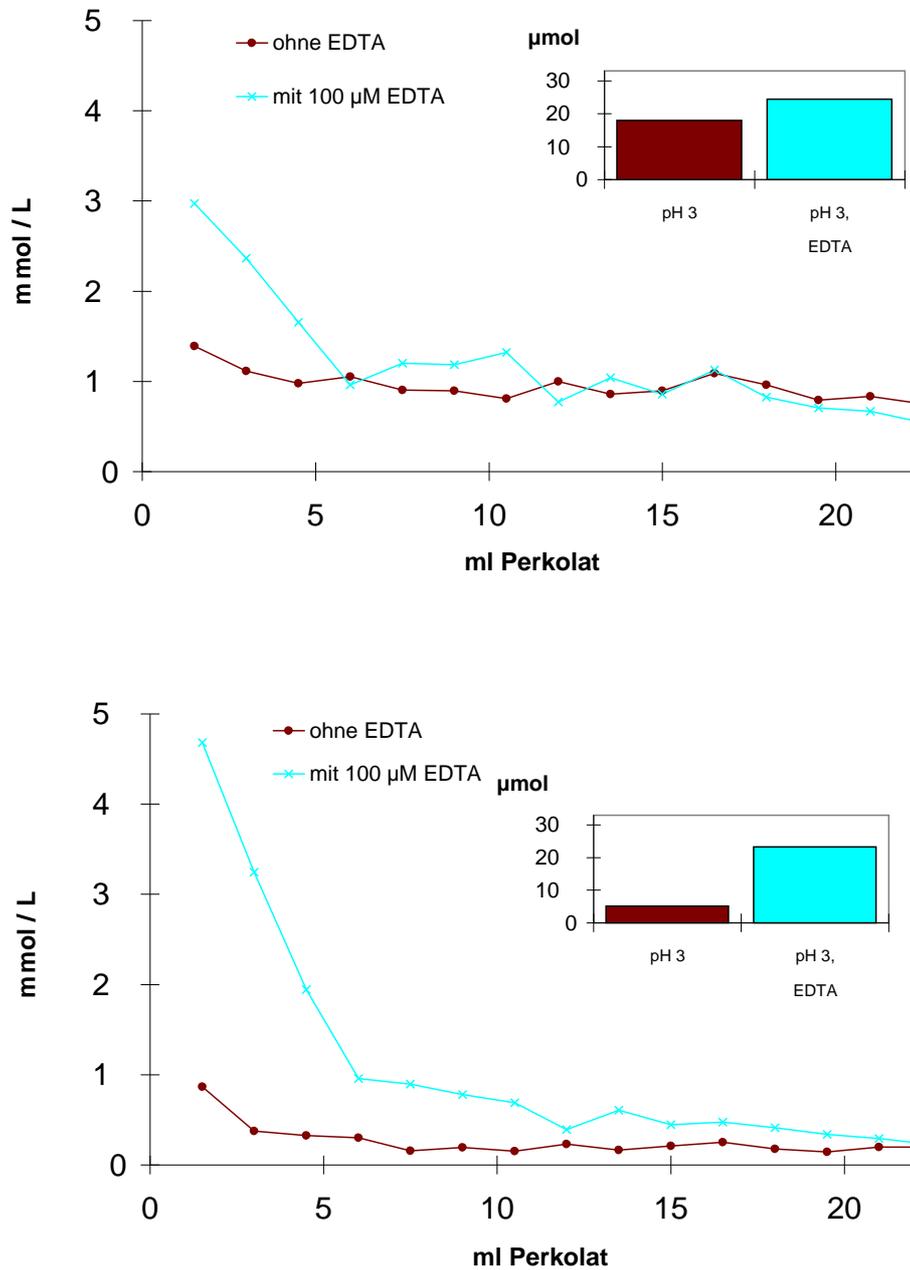


Abbildung 3.19: Gehalte von Kalium (oben) und Calcium (unten) bei Perkolatation mit und ohne 100µM EDTA bei pH 3 am 24.03.99. Die Säulen zeigen die Gesamtmenge an Kalium bzw. Calcium in den ersten 18 ml Perkolat.

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

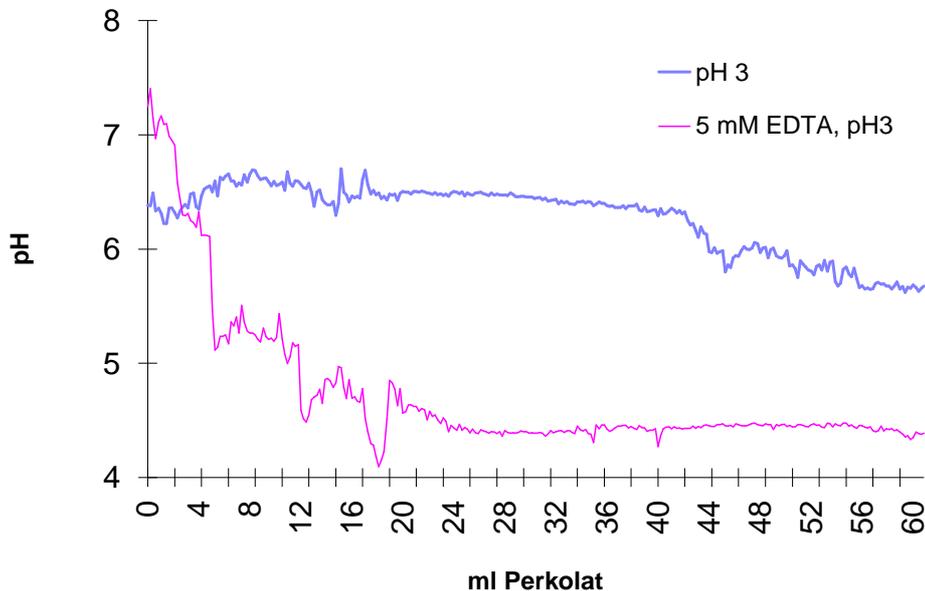


Abbildung 3.20: Verlauf des pH im Perkolat bei Perkolations mit und ohne 5 mM EDTA bei pH 3 am 06.02.97.

06.02.97 (Abb. 3.20) zeigt eine schnellere Absenkung des pH bei Vorlage mit EDTA als ohne: Im Ansatz mit EDTA fällt der pH von einem Startwert von pH 7,2 nach 10 ml Perkolations unter die Marke von pH 5 und liegt nach 60 ml Perkolations noch bei pH 4,4. Im Ansatz ohne EDTA kann der Achsenabschnitt die Vorlage von pH 3 wesentlich besser auf ein neutrales Milieu einregulieren: Nach einem Startwert von pH 6,4 wird nach 60 ml Perkolations immerhin noch ein Wert von pH 5,7 erreicht.

3.2.9 Quantifizierung der Kationenabgabe am Gefäßwandapoplasten

Im folgenden sollen die oben dargestellten Kationenfreisetzungen aus den Sprossproben (Abb. 3.13) in Bezug zum biologischen Material, d.h. den Gefäßwänden, dargestellt werden. Dabei interessiert die Kationenfreisetzung an den Gefäßwänden pro Zeiteinheit bei weitgehend natürlichen Flußraten in den Gefäßen. Aus der inneren Oberfläche der Gefäße (4712 cm², siehe 2.4.4) und der ermittelten Perkolationsdauer für das hier betrachtete Perkolationsvolumen von 22,5 ml läßt sich die Kationenabgabe in Bezug auf die Gefäßwandfläche errechnen (Tab. 3.4).

Individuelle Unterschiede der perkolierten Achsenabschnitte machen es

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

Probetag	a.) Kalium				b.) Calcium			
	pH 2	pH 3	pH 5	pH 7	pH 2	pH 3	pH 5	pH 7
25.02.	3,74	3,13	3,88	4,40	6,51	6,08	6,90	7,64
24.03.		3,80		3,66		1,08		1,06
27.04.	18,26	11,85	5,72	10,41	10,63	5,09	2,15	6,50
18.05.	15,99	10,74	7,37	12,36	4,32	2,97	1,74	4,48
17.06.	14,84	6,85	7,48	5,38	9,98	2,16	3,94	3,38
02.09.	2,87	2,18	1,75	2,64	1,94	1,03	0,81	1,24
17.09.	5,89	4,06	3,55	3,35	3,72	2,51	1,34	2,13
15.10.	6,75	4,28	2,78	5,20	9,24	4,67	3,24	5,14
18.11.	3,89	1,97	2,16	2,50	6,99	3,17	6,17	2,50
16.12.	1,26	1,14	1,06	1,19	4,48	5,07	3,42	3,37

Tabelle 3.4: Kationenfreisetzung pro Gefäßwandfläche in pmol/cm^2 bei unterschiedlichem pH des Perkolationsmediums im Jahre 1999 für a.) Kalium und b.) Calcium.

notwendig, für jede Sprossprobe die Perkolationsdauer einzeln anzugeben (Tab. 3.5).

Aus den Tabellen 3.4 und 3.5 ergibt sich die Kationenfreisetzung pro Gefäßwandfläche und Zeit (Tab. 3.6).

Betrachtet man für Kalium nur die anatomisch prädestinierten Übergangsstellen an den Kontakttüpfeln der Kontaktzellen, bzw. deren Plasmalemma, die nur etwa $1/16$ der Gefäßwandfläche betragen (siehe 2.4.4), so läßt sich die Größenordnung der Effluxrate von Kalium abschätzen und mit Literaturangaben (Sauter und van Cleve 1992) für andere Untersuchungsobjekte vergleichen (Tab. 3.7).

Bei einem Langzeitexperiment am 04.07.96 wurden je ein Achsenabschnitt bei Vorlage von pH 3 und einer bei pH 7 perkoliert. Dabei war der pH nach 163 min im Ansatz mit pH 3 auf etwa pH 3,5 gefallen. Im Ansatz mit pH 7 waren nach 167 min und einem Perkolationsvolumen von 105 ml nach Abzug ursprünglich im Gefäßwasser vorliegender Kationen 30 μmol K und 4,6 μmol Ca im Perkolat zusätzlich aufgetreten. Dies ergibt eine Kationenfreisetzung für K von $6,4 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ Gefäßwandfläche und für Ca von $0,97 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ Gefäßwandfläche oder bei Bezug auf die Zeiteinheit $38,2 \text{ pmol K}/\text{cm}^2/\text{min}$ und $5,5 \text{ pmol Ca}/\text{cm}^2/\text{min}$. Im Ansatz mit pH 3 liegen die entsprechenden Werte für zusätzlich auftretendes K bei 86 μmol und für Ca bei 67 μmol . Dies ergibt eine Kationenfreisetzung für K von $18 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ Gefäßwandfläche und für Ca von $14 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ Gefäßwandfläche oder $88 \text{ pmol K}/\text{cm}^2/\text{min}$ und $111 \text{ pmol Ca}/\text{cm}^2/\text{min}$.

3.2 Regulation des pH und Freisetzung von Kationen im Jahresgang

Probetag	pH 2	pH 3	pH 5	pH 7
25.02.	18	21	13	24
24.03.	26	34	24	33
27.04.	53	103	73	73
18.05.	130	84	54	127
17.06.	47	66	28	68
02.09.	46	29	53	19
17.09.	33	46	116	130
15.10.	19	36	58	32
18.11.	26	47	21	24
16.12.	23	97	136	95

Tabelle 3.5: Perkolationsdauer in Minuten bei unterschiedlichen pH- Werten des Perkolationsmediums im Jahre 1999.

Kalium						Calcium			
Probetag	pH 2	pH 3	pH 5	pH 7		pH 2	pH 3	pH 5	pH 7
25.02.	208	149	298	183		361	289	531	318
24.03.		112		111			32		32
27.04.	344	115	78	142		200	49	29	89
18.05.	123	128	137	97		33	35	32	35
17.06.	316	104	267	79		212	33	141	50
02.09.	62	75	33	139		42	36	15	65
17.09.	178	88	31	26		113	55	12	16
15.10.	355	119	48	162		486	130	56	161
18.11.	150	42	103	104		269	67	294	104
16.12.	55	12	8	13		195	52	25	35

Tabelle 3.6: Kationenfreisetzung pro Gefäßwandfläche und Zeit in pmol/cm²/min bei unterschiedlichen pH- Werten des Perkolationsmediums im Jahre 1999.

3.3 Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte

Probetag	pH 2	pH 3	pH 5	pH 7
25.02.	3327	2388	4770	2935
24.03.		1790		1775
27.04.	5511	1840	1254	2282
18.05.	1967	2045	2184	1557
17.06.	5053	1660	4274	1266
02.09.	999	1205	528	2224
17.09.	2855	1414	489	413
15.10.	5681	1900	768	2599
18.11.	2392	671	1648	1667
16.12.	874	188	124	200

Tabelle 3.7: Kalium- Efflux aus Kontakttüpfeln in pmol/cm²/min.

3.3 Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte

Während im vorangegangenen Abschnitt die Freisetzung von Kationen in das Gefäßwasser dargestellt wurde, zeigen die folgenden Ergebnisse nun die Aufnahme von Kationen aus dem perkolierenden Medium. Diese Experimente sollen zeigen, ob und in welchem Umfang ein Überangebot von Kationen im Gefäßwasser reguliert wird, sei es durch Adsorption an den Wänden, sei es durch Aufnahme in den Symplasten. Eine solche Situation kann unter natürlichen Bedingungen durch Mobilisierung im Frühjahr mit einem Anstieg der Ionenkonzentrationen in den Gefäßen eintreten. Die Untersuchungen geben auch Hinweise über die Selektivität der Aufnahme oder das Austauschverhalten bei Konkurrenz um Bindungsplätze an der Zellwand. Das Aufnahmevermögen pro Zeit wurde geprüft und quantifiziert. Der Einfluß der beschriebenen Aufnahmeprozesse auf den pH wurde ebenfalls erfaßt.

3.3.1 pH- Regulation bei Angebot der Kationen Na, K, Mg und Ca als Chloride und Gluconate

Bei den folgenden Experimenten wurden einwertige (Na, K) und zweiwertige Kationen (Ca, Mg) in hohen, aber durchaus noch physiologischen Konzentrationen angeboten (10 mM). Die Ionen wurden einerseits als leicht lösliche Chloride angeboten, wie sie auch im Gefäßwasser natürlich vorkommen können. Andererseits wurden diese Ionen auch als Gluconate angeboten, um einen Einfluß der Chloridionen auszuschalten. Um von pH- abhängigen Effekten zu trennen (siehe 3.2), wurde ein neutraler pH für die perkolierenden

3.3 Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte

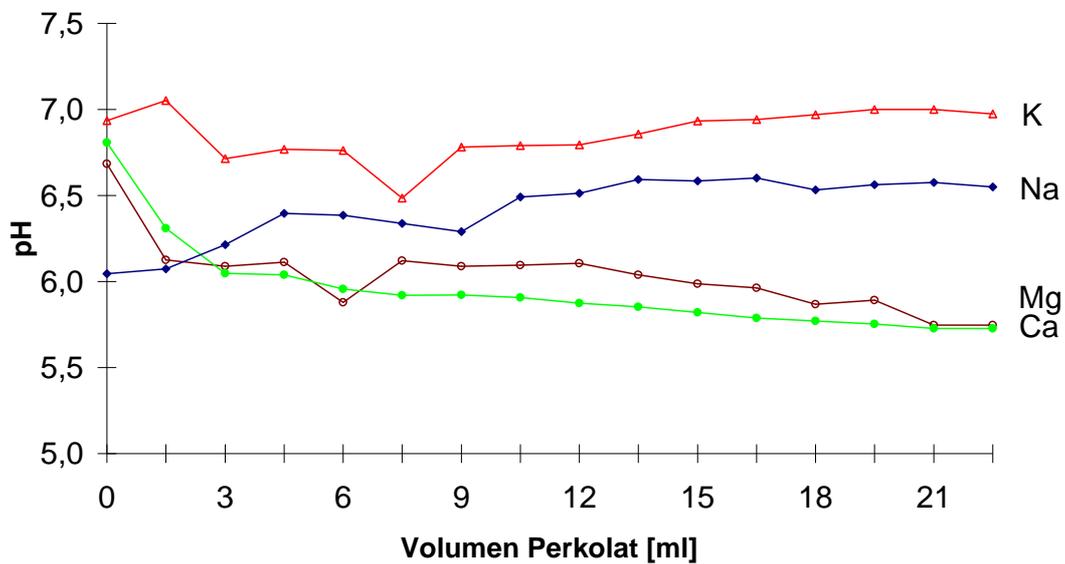
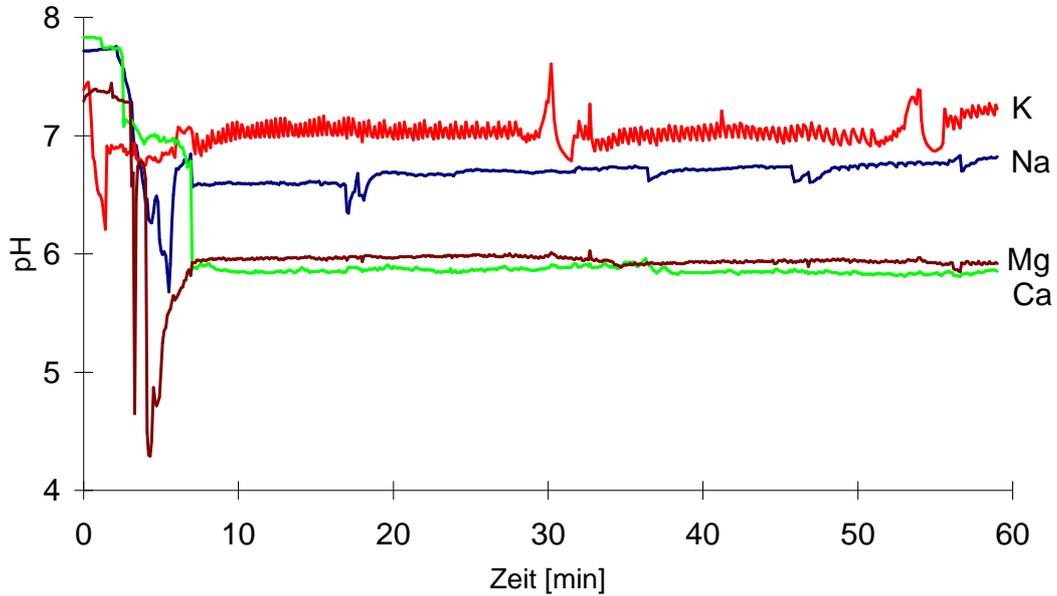


Abbildung 3.21: Verlauf des pH bei Perkolation mit Kationen bei pH 7 bei Angebot der Kationen als Gluconat (10 mM) am 09.07.98 (oben) und am 30.06.98 (unten).

3.3 Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte

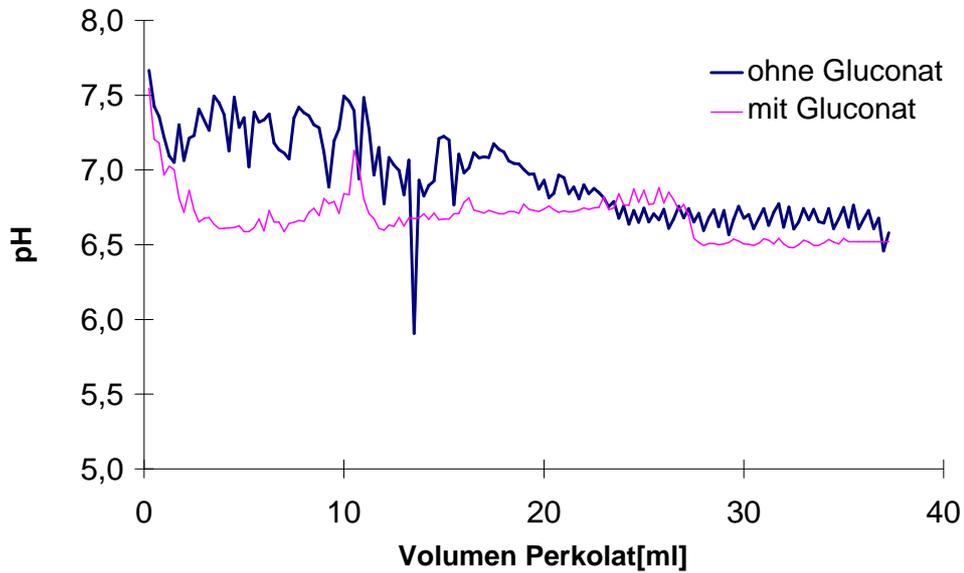
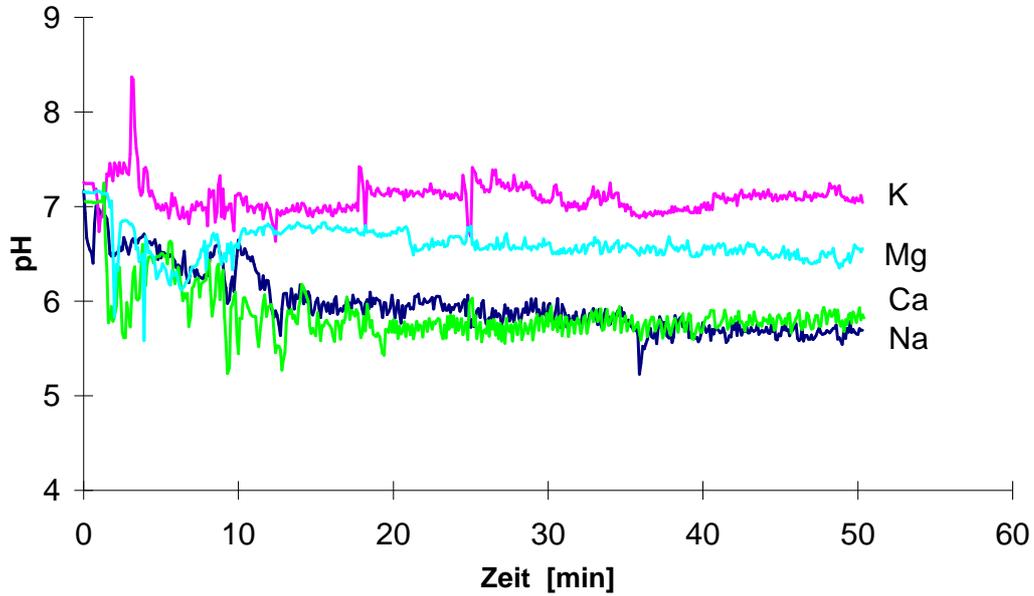


Abbildung 3.22: Verlauf des pH bei Perkolation mit Kationen bei pH 7 bei Angebot der Kationen als Chlorid (10 mM) am 18.08.98 (oben) und Angebot von Kalium als Gluconat (10 mM) am 10.11.97 (unten).

3.3 Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte

Lösungen gewählt. Der pH des Perkolates wurde aufgezeichnet, um einen Hinweis auf Austauschvorgänge mit Protonen an den Zellwänden sowie über einen möglichen Austausch über Kaliumkanäle zu erhalten.

Bei einem Experiment mit Zusatz von Na, K, Mg und Ca als Gluconat vom 09.07.98 wurde nach 50 min der höchste pH bei einem Ansatz mit Kalium mit pH 7,2 ermittelt, gefolgt von Natrium mit pH 6,8 und etwas Abstand von Magnesium und Calcium mit pH 5,9 (Abb. 3.21). Bei einem vergleichbaren Experiment vom 30.06.98 konnte nahezu das gleiche Resultat erreicht werden. Nach 22,5 ml Perkolation hielt der Ansatz mit K- Gluconat den wiederum höchsten pH mit einem Wert von pH 7,0. Na folgte mit pH 6,6 und Mg und Ca mit pH 5,7 (Abb. 3.21). In beiden Fällen haben somit Mg und Ca im Gegensatz zu K und Na zu einem deutlichen pH- Abfall geführt.

Bei einem Experiment vom 18.08.98 mit Na, K, Mg und Ca als Chlorid (Abb. 3.22) wurde wiederum nach einem Start von etwa pH 7 nach 50 min im Ansatz mit Kalium der höchste pH mit pH 7,1 gemessen, gefolgt von Magnesium mit pH 6,6 sowie Calcium und Natrium mit pH 5,8 bzw. pH 5,7. Im Vergleich zum Experiment mit den Kationen in Gluconatform fällt der niedrige pH- Wert für Natrium auf, hingegen ist der pH für Mg kaum abgesenkt. Beim Vergleich von K- Gluconat mit entionisiertem Wasser zeigten sich für den pH bei einem Experiment am 10.11.97 keine Unterschiede. Beide Ansätze starteten bei etwa pH 7,6 und wiesen nach 36 ml Perkolation noch einen pH von 6,5 auf (Abb. 3.22). Die Untersuchungen haben gezeigt, daß mit Kalium die geringste Wirkung bezüglich der Freisetzung von Protonen durch Austausch an den Zellwänden zu erreichen ist. Es wurde ferner gezeigt, daß Chlorid einen Einfluß auf die pH- Regulation hat.

3.3.2 Regulation der Kationen bei Perkolation mit KCl und K-Gluconat im Vergleich

Um zu überprüfen, ob das perkolierende Anion einen Einfluß auf die Aufnahme von Kalium hat, wurden in einem Experiment am 27.01.98 Sprossproben mit 10 mM KCl bzw. 10 mM K- Gluconat perkoliert (Abb. 3.23). Im Ansatz mit KCl wurde stets geringfügig weniger Kalium im Perkolat gefunden als im Ansatz mit K- Gluconat. Der Anstieg der Kaliumgehalte erfolgte zudem mit K- Gluconat auch schneller als mit KCl. Nach 63 ml Perkolation lag die Kaliumkonzentration im Ansatz mit KCl bei ca. 7000 μM und im Ansatz mit K-Gluconat bei ca. 7400 μM , wenn man die Mittelwerte der letzten fünf Messungen zugrunde legt. Insgesamt wurden in den ersten 63 ml Perkolation im Ansatz mit Chlorid 137 μmol und im Ansatz mit Gluconat 164 μmol Kalium freigesetzt. Die Kaliumaufnahme ist somit bei Angebot von KCl höher als bei Angebot von K- Gluconat.

3.3 Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte

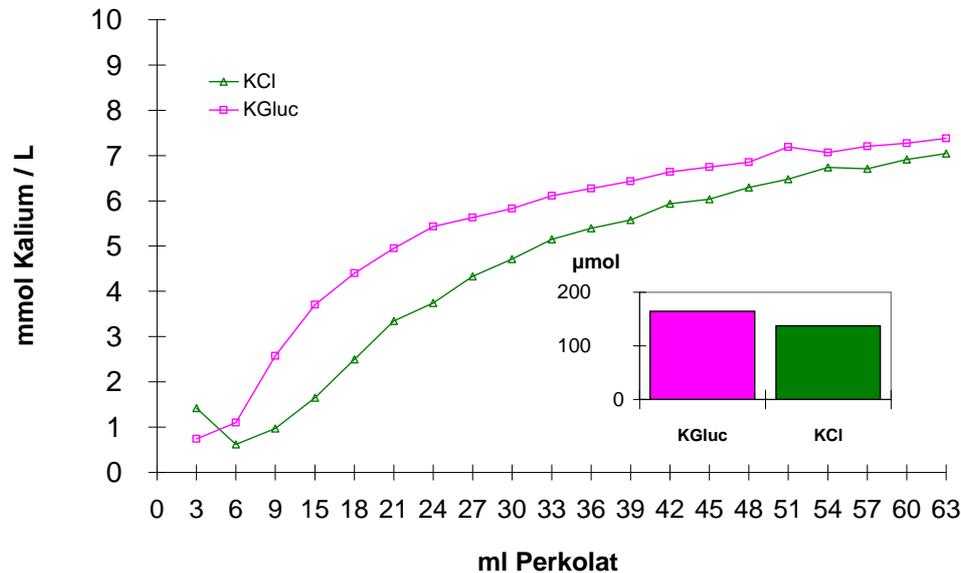


Abbildung 3.23: Kaliumgehalte im Perkolat bei Vorlage von 10 mM KCl und 10 mM K- Gluconat bei pH 3 am 27.01.98. Die Säulen zeigen die Gesamtmenge an Kalium in den ersten 63 ml Perkolat.

3.3.3 Regulation der Kationen bei Angebot der Kationen Na, K, Mg und Ca als Gluconate

Um den Einfluß von Chlorid auf die Ionenkanäle auszuschließen, wurden bei dem oben genannten Experiment (Abb. 3.24 und 3.25) vom 30.06.98 die Kationen als Gluconate angeboten. Im folgenden sollte geprüft werden, inwieweit durch die Perkolatation mit Na, K, Ca und Mg als Gluconate die Kationengehalte im Perkolat reguliert werden. Es zeigte sich, daß bei einer Vorlage von jeweils 10 mM Kationen bei Natrium nach 18 ml Perkolatation etwa 5 mM Na im Perkolat nachgewiesen wurden. Somit wird etwa 50 % des in der Vorlage angebotenen Natriums während der Perkolatation aufgenommen (Abb. 3.24). Bei Kalium stieg die Konzentration im Perkolat zunächst auf ein Maximum von 8 mM, geht dann aber wieder auf 5 mM zurück (Abb. 3.24). Auch Kalium wird somit in großem Umfang aufgenommen. Dagegen bleibt bei Calcium (Abb. 3.25) die Konzentration mit annähernd 10 mM auf dem Niveau der Vorlage. Calcium wird demnach unter diesen Versuchsbedingungen weder aufgenommen noch nennenswert an die Gefäßwände gebunden. Bei Magnesium wird mit 3 mM nur ca. 30% der Vorlagenkonzentration im Perkolat gefunden. Magnesium wird somit in großem Umfang aufgenommen bzw. gebunden (Abb. 3.25). Die Aufnahmeraten nach 22,5 ml Perkolatation wurden für Mg zu 6 mmol/L, für Na zu 5 mmol/L, für K zu 4 mmol/L und für Ca zu weniger als 1 mmol/L bestimmt. Die Kontrolle des pH während der Perkolatationen ist unter 3.3.1 aufgeführt.

3.3 Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte

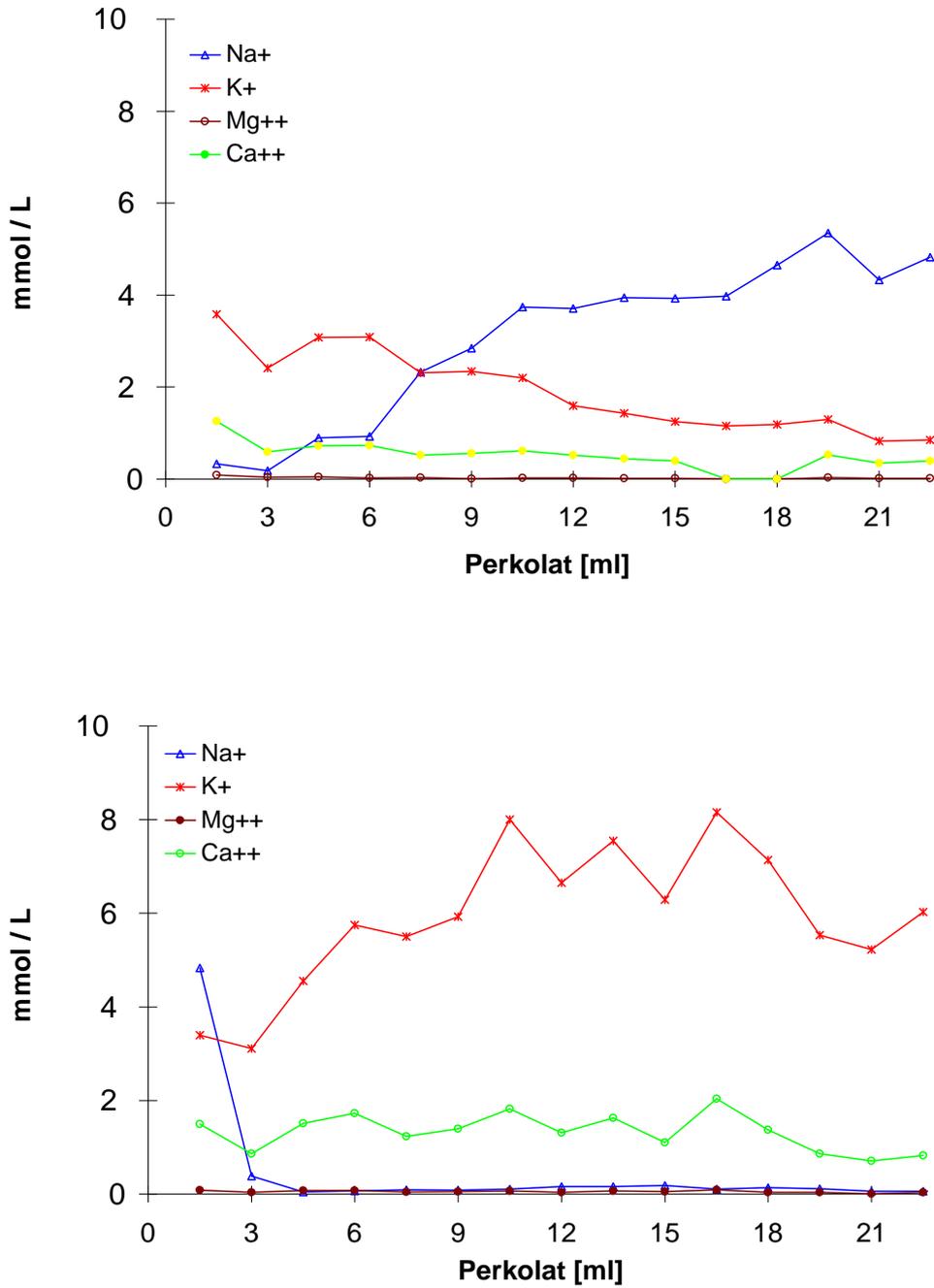


Abbildung 3.24: Kationengehalte im Perkolat, Angebot von 10 mM Na⁺ (oben) und K⁺ (unten) als Gluconat bei pH 7 am 30.06.98.

3.3 Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte

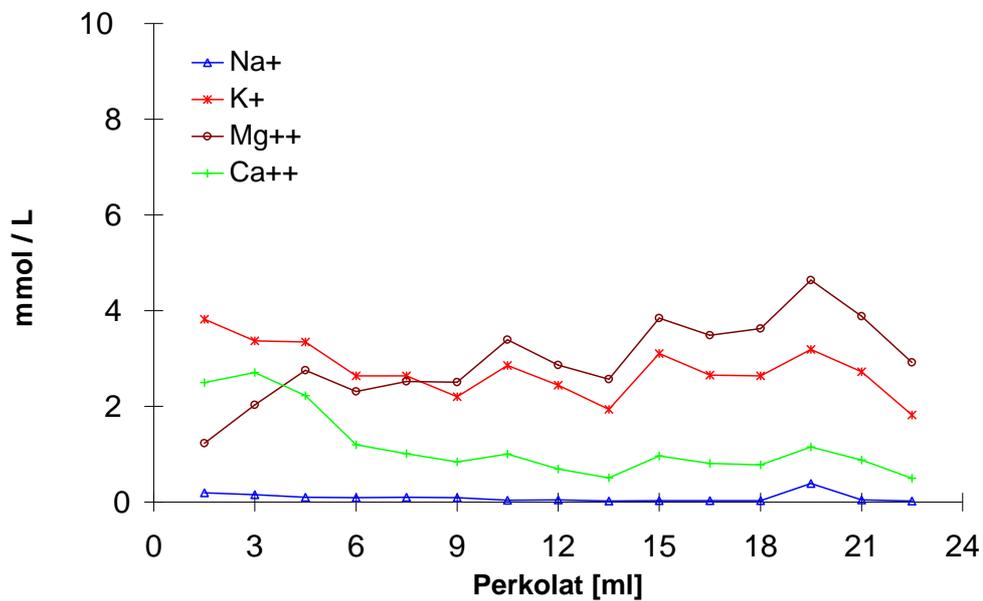
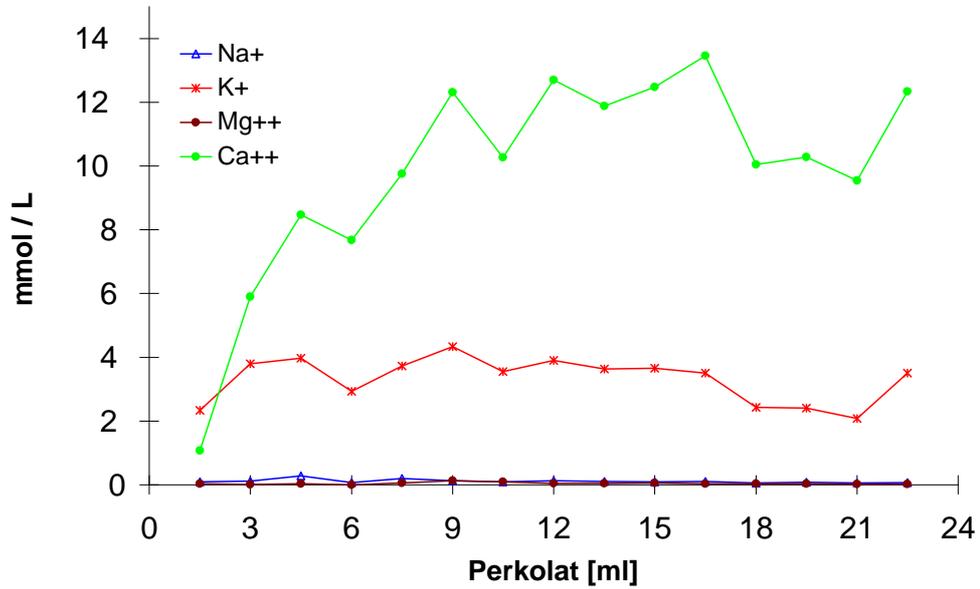


Abbildung 3.25: Kationengehalte im Perkolat, Angebot von 10 mM Ca⁺⁺ (oben) und Mg⁺⁺ (unten) als Gluconat bei pH 7 am 30.06.98.

3.3 Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte

3.3.4 Angebot von weiteren mehrwertigen Kationen wie Ca, La, Mn und Mg in Chloridform

In den folgenden Experimenten wurden im Vergleich zu Calcium und Magnesium zwei weitere mehrwertigen Kationen, Lanthan und Magnesium, eingesetzt, die natürlich nur in Spuren vorkommen. Sie wirken in Konkurrenz zu den in den Zellwänden natürlich vorkommenden Kationen Calcium und Magnesium um die Bindungsplätze an den Zellwänden.

Es wurde untersucht, ob und in welchem Umfang die Freisetzung von Ca und Mg in das Perkolat erreicht werden kann. Bei einem Experiment am 28.02.99 wurden je 10 mM Mg, Ca, Mn und La als Chloride angeboten (Abb. 3.26 und 3.27). Vergleicht man den Verlauf der Gehalte des angebotenen Kations, so zeigen sich erkennbare Unterschiede im Aufnahmeverhalten.

Bei Perkolation mit MgCl_2 startet Mg mit einem Gehalt von $300 \mu\text{M}$, steigt dann kurzfristig auf $9000 \mu\text{M}$ und fällt nach 22,5 ml Perkolation auf $7120 \mu\text{M}$ (Abb. 3.26). Kalium und Calcium bleiben bei Perkolation mit MgCl_2 gleichzeitig weitgehend konstant. Ob der Gehalt an Mg weiter fällt, konnte im untersuchten Zeitraum nicht gezeigt werden. Die Aufnahme rate dürfte somit höher als $2,9 \mu\text{mol/ml}$ liegen.

Bei Perkolation mit CaCl_2 liegen die Ca- Gehalte zu Versuchsbeginn bei $2100 \mu\text{M}$ und steigen kontinuierlich auf etwa $10000 \mu\text{M}$ (Abb. 3.26). Diese Ergebnisse lassen eine weitere Aufnahme von Ca nach 22,5 ml Perkolation als unwahrscheinlich erscheinen.

Bei Perkolation mit MnCl_2 wurde Mangan nach 4,5 ml Perkolation nachgewiesen: Es steigt rasch auf ein Maximum von $9000 \mu\text{M}$, und fällt dann leicht auf $6400 \mu\text{M}$ zu Versuchsende (Abb. 3.27). Der Verlauf läßt auf eine weitere Abnahme schließen, wobei die Aufnahme rate dann bei mindestens $3,6 \mu\text{mol/ml}$ liegt.

Bei Perkolation mit LaCl_3 war Lanthan erst nach 7,5 ml im Perkolat nachweisbar. Es erreicht ein Maximum bei $9000 \mu\text{M}$ und fällt dann ab auf zuletzt $5800 \mu\text{M}$ nach 22,5 ml Perkolation (Abb. 3.27). Zuletzt liegt die Aufnahme rate bei ca. $4,2 \mu\text{mol/ml}$.

Vergleicht man die vier Einzelexperimente, so steht die geringe Aufnahme von Calcium im Gegensatz zur deutlichen Aufnahme der anderen Kationen. Eine zusätzliche Freisetzung von Calcium bei Angebot der konkurrierenden Kationen war nicht zu beobachten.

Die pH- Werte fallen vom Start aus dem neutralen Bereich mehr oder weniger deutlich ab (Abb. 3.28). Nach 200 ml Perkolation liegen die Werte für Mg bei pH 6,2, für Mn bei pH 6,1, für Ca bei pH 6,0 und schließlich für La bei pH 5,3. Die verstärkte pH- Abnahme bei Angebot der dreiwertigen La^{3+} - Ionen fällt auf.

3.3 Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte

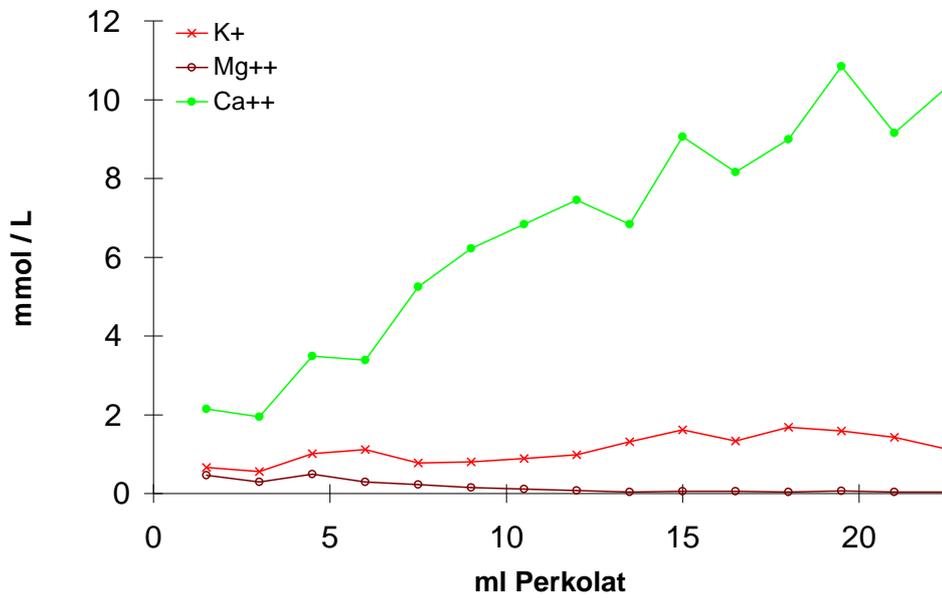
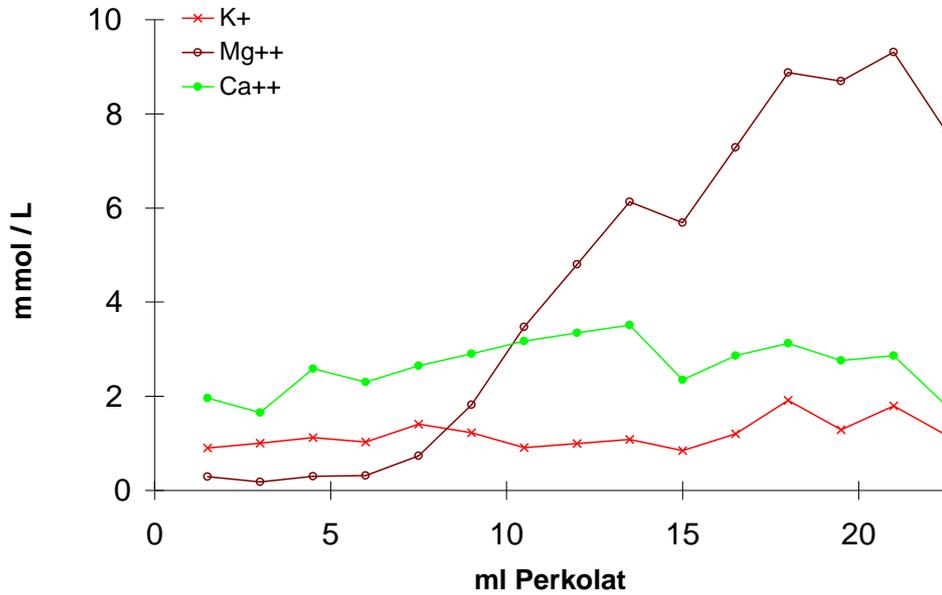


Abbildung 3.26: Kationengehalte im Perkolat, Angebot von 10 mM Mg^{++} (oben) und Ca^{++} (unten) als Chlorid bei pH 7 am 28.02.99.

3.3 Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte

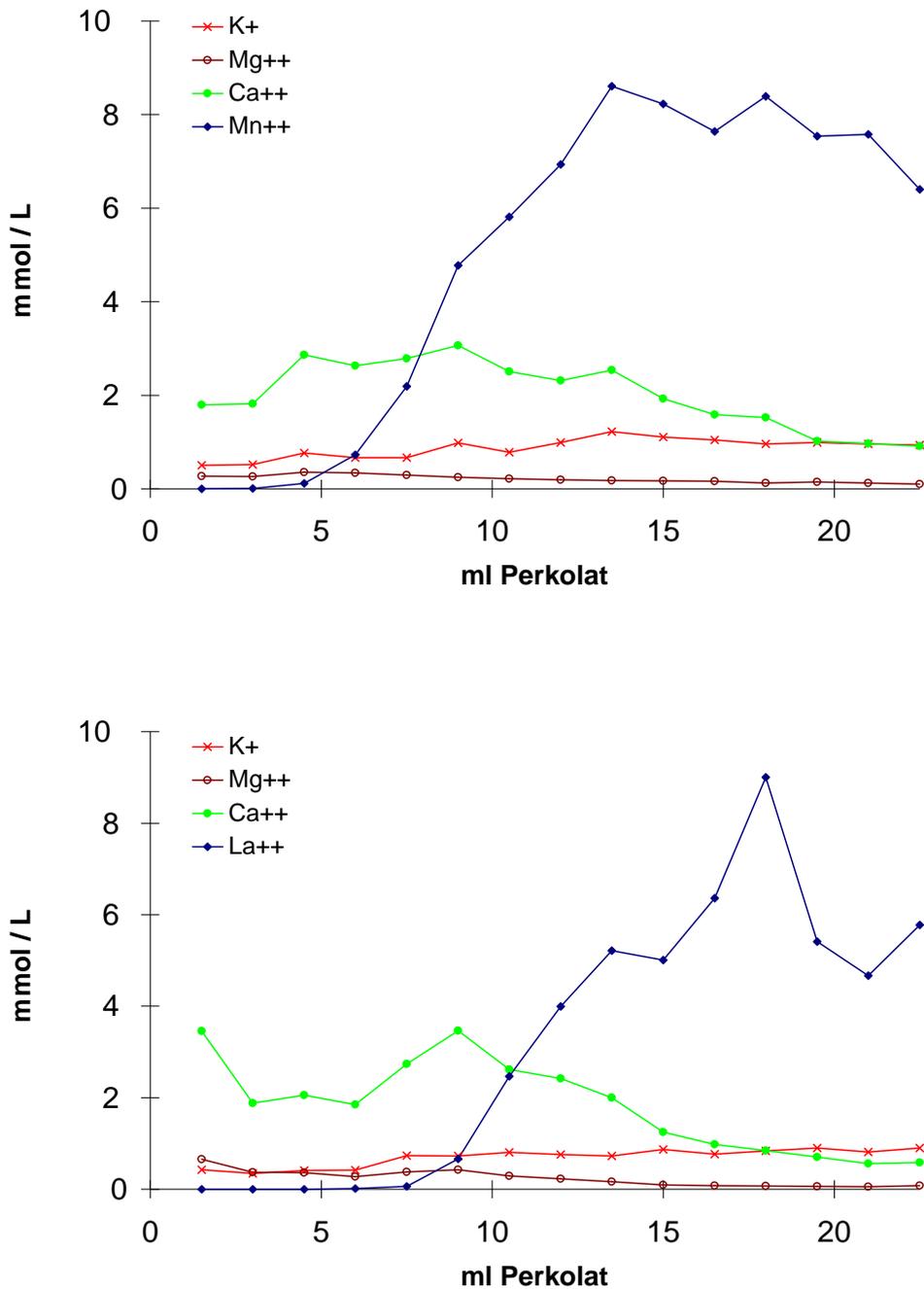


Abbildung 3.27: Kationengehalte im Perkolat, Angebot von 10 mM Mn⁺⁺ (oben) und La³⁺ (unten) als Chlorid bei pH 7 am 28.02.99.

3.3 Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte

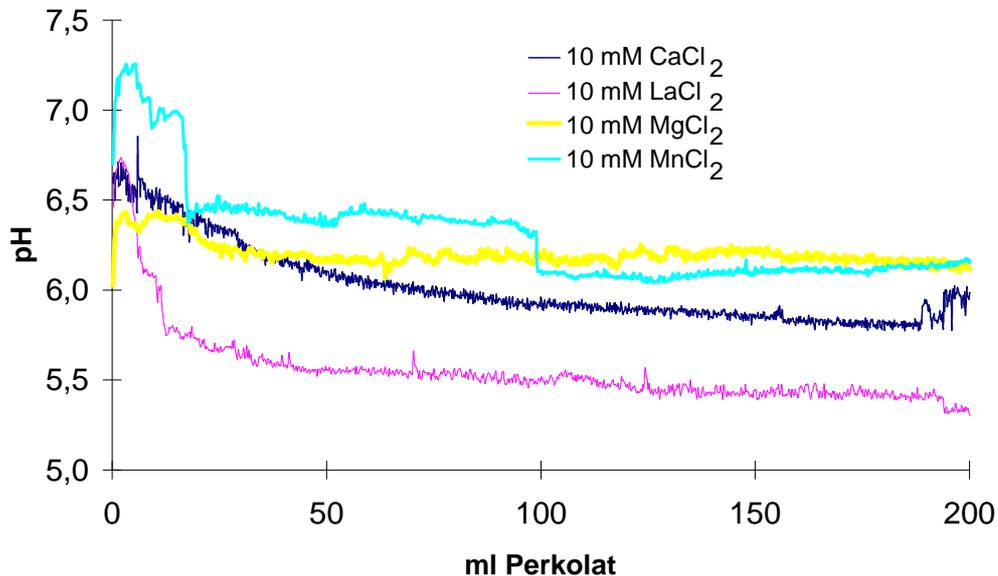


Abbildung 3.28: Verlauf des pH im Perkolat bei Perkolation mit 10 mM Kationen in Chloridform bei pH 7 am 28.02.99.

3.3.5 Angebot von Barium

Das Angebot von Barium kann zwei unterschiedliche Effekte auslösen. Zum einen kann es wie die anderen zweiwertigen Kationen (siehe 3.3.4) an den Zellwänden Ionen austauschen. Zum anderen kann Barium als Blocker von Kaliumkanälen wirken (siehe 3.4). Barium kommt im natürlichen System nur in Spuren vor, es ist also nur nachzuweisen, wenn es über die Vorlage angeboten wurde.

In einem Experiment am 29.01.99 wurden in insgesamt vier parallelen Ansätzen je zwei mit und zwei ohne 10 mM BaCl₂ durchgeführt (Abb. 3.29 und 3.30). Jeweils ein Ansatz wurde dabei bei pH 3 und einer bei pH 7 durchgeführt. Im Ansatz bei pH 3 mit BaCl₂ stieg die Konzentration von Barium von null kontinuierlich auf einen Wert von etwa 7500 μ M, der nach etwa 15 ml Perkolation beibehalten wurde. Etwa 25% des angebotenen Bariums ist somit in der Sprossprobe verblieben (Abb. 3.29).

Um einen Hinweis auf Austauschvorgänge zu erhalten, wurden auch die Gehalte von Calcium und Kalium bestimmt. Die Calciumgehalte stiegen gleichzeitig von einem Ausgangswert von etwa 1500 μ M auf ein kurzfristiges Maximum von 3000 μ M und fielen nach 22,5 ml Perkolation auf 1300 μ M ab (Abb. 3.29). Bei der Kontrolle ohne BaCl₂ fiel der Calciumgehalt kontinu-

3.3 Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte

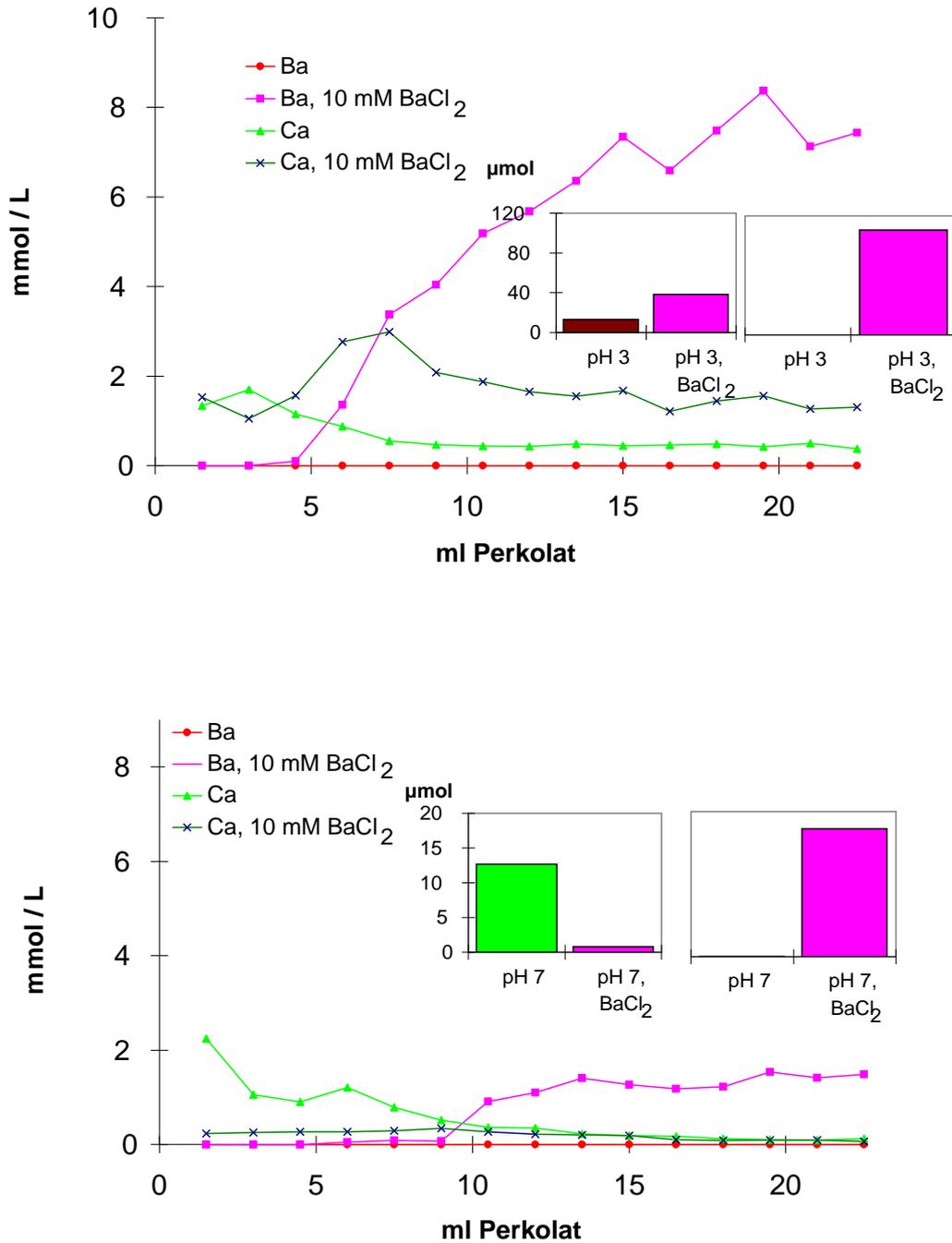


Abbildung 3.29: Gehalte an Barium und Calcium bei Perkolatation mit und ohne 10 mM BaCl₂ bei pH 3 (oben) und pH 7 (unten) am 29.01.99. Die Säulen geben die Gesamtmenge an Calcium (links) und Barium (rechts) in den ersten 18 ml Perkolat wieder.

3.3 Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte

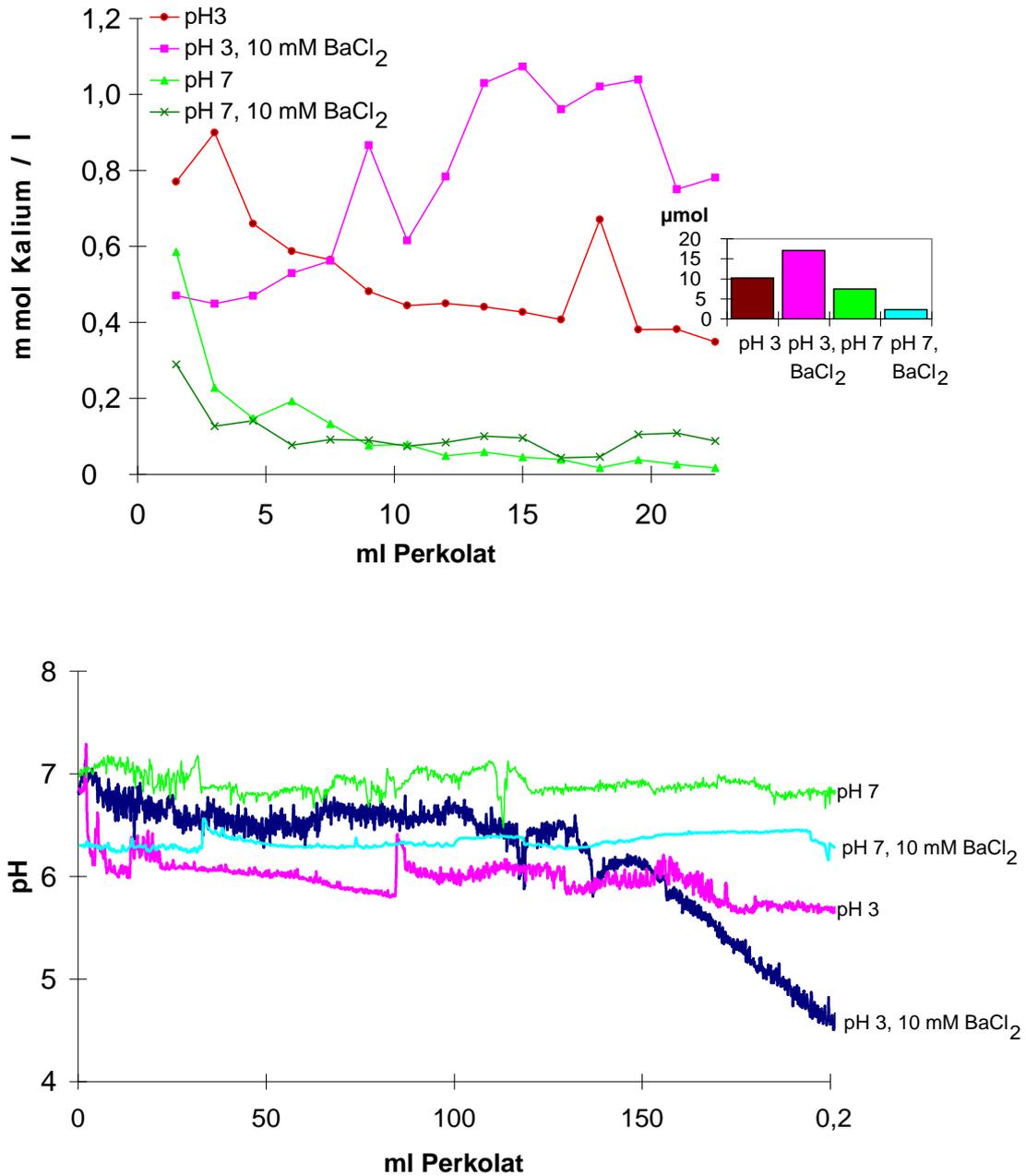


Abbildung 3.30: Kaliumgehalte (oben) und pH (unten) bei Perkolatation mit und ohne 10 mM BaCl₂ bei pH 3 und pH 7 am 29.01.99. Die Säulen (oben) geben die Gesamtmenge an Kalium in den ersten 18 ml Perkolat wieder.

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

ierlich auf etwa 400 μM ab. Vergleicht man die Calciumabgabe nach 18 ml Perkolation in den Ansätzen mit und ohne BaCl_2 , so liegt diese ohne BaCl_2 bei 13 μmol und mit BaCl_2 bei 38 μmol . Unter dem Einfluß von Barium wurde also die dreifache Menge von Calcium in das Perkolat abgeben als ohne diesen.

Bei den beiden Ansätzen mit pH 7 wurden deutlich niedrigere Ionen-gehalte gemessen im Vergleich zu den Ansätzen bei pH 3 (Abb. 3.29). Mit Barium in der Vorlage ergibt sich nach 22,5 ml Perkolation ein Gehalt von 1500 μM für Ba und 120 μM für Ca. Ohne Barium in der Vorlage erreicht Ca einen Wert von nur noch 70 μM . Damit wurde gezeigt, daß bei Perkolation mit pH 7 angebotenes Barium (10 mM) zu etwa 85% in der Sprossprobe verbleibt. Dabei werden aber keine nachweisbaren Mengen an Calcium freigesetzt.

Vergleicht man die K- Gehalte nach 22,5 ml Perkolation (Abb. 3.30), so liegen sie im Ansatz mit pH 3 und BaCl_2 mit 780 μM am höchsten, gefolgt vom Ansatz mit pH 3 ohne BaCl_2 mit 350 μM . In den Ansätzen bei pH 7 lassen sich nur noch 20 μM ohne und 90 μM mit BaCl_2 nachweisen. Die Ergebnisse weisen also auf eine höhere Kaliumabgabe unter dem Einfluß von Barium bei pH 3 hin. Vergleicht man die pH- Werte der vier Ansätze (Abb. 3.30), so fällt der pH- Wert bei den Ansätzen mit BaCl_2 um ΔpH 0,7 niedriger aus als in den Ansätzen ohne BaCl_2 . Die Ergebnisse zeigen somit eine Absenkung des pH unter dem Einfluß von Barium.

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

Eine Vielzahl von Kaliumkanälen (KORC, NORC, Na^+/K^+ - Symporter) ist aus pflanzlichen Zellen bekannt (de Boer und Wegner 1997). Ebenso wurde eine Vielzahl an Kanalblockern (Cs^+ , Na^+ , Ba^{++} , TEA^+) nachgewiesen, mit deren Hilfe sich die Kanäle untersuchen lassen. So passieren Cs^+ , Na^+ , Ba^{++} und TEA^+ nicht die Kanäle, sondern blockieren sie (Bertl et al. 1997). Zunächst ist die Existenz der Kanäle überhaupt in dem betrachteten System zu überprüfen. In weiteren Experimenten wird Hinweisen auf den Typ der Kanäle nachgegangen. Dabei interessieren die Fragen, ob die Kanäle selektiv Kalium transportieren, ob der Transport in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus stattfindet und ob die Regulation nur passiv oder auch aktiv verläuft.

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

3.4.1 Blockierung der K- Abgabe aus dem Symplasten in die Gefäße

Bei Vorlage von saurem Medium (s.o.) können Protonen aus dem Gefäßwasser gegen Kalium aus den lebenden Zellen getauscht werden. Geht dieser Austausch über spezifische Ionenkanäle, so können Kanalblocker den K- Ausstrom unterdrücken und die Aufnahme von Protonen im Gegenzug findet nicht statt. Da bei pH 3, aber nicht bei pH 7 ein mehr oder weniger starker Austausch von Kalium aus dem Gefäßwandapoplasten gegen Protonen stattfindet, kann die Größenordnung dieses Vorgangs unter Umständen durch den Einsatz der Kanalblocker abgeschwächt werden.

Cäsium als K- Kanalblocker

Cäsium wird als Blocker der Kaliumkanäle häufig eingesetzt, auch eine Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung wurde für *Arabidopsis* (Bertl et al. 1997) gezeigt. Cs^+ ist mit 169 nm Ionendurchmesser größer als K^+ mit 133 nm und blockiert den Ionenkanal räumlich. In unserem System wurde untersucht, ab welcher Konzentration Cs^+ die Kaliumabgabe in das Gefäßwasser blockiert. Dabei ist zu beachten, daß Cs^+ in höheren Konzentrationen quantitativ auch als Tauschpartner gegen K^+ an den Gefäßwänden auftreten kann. Dieser Effekt ist bei der Interpretation der Kaliumgehalte zu berücksichtigen.

In einem Versuch vom Dezember 1998 (Abb. 3.31) bei Vorlage von pH 3 zeigten die Ansätze mit 100 μM CsCl und ohne CsCl deutliche Unterschiede: Obgleich bei dem Ansatz ohne CsCl zu Versuchsbeginn im Gefäßwasser eine niedrigere Kaliumkonzentration (3100 μM) als bei dem Ansatz mit 100 μM CsCl (4400 μM) ermittelt wurde, lag schon nach 4,5 ml Perkolation der Kaliumgehalt ohne CsCl höher als mit CsCl. Nach ca. 20 ml Perkolation lag die Kaliumkonzentration bei dem Ansatz ohne CsCl mit 1400 μM deutlich höher als beim Ansatz mit 100 μM CsCl wo der Wert nur bei 800 μM lag. Für die Menge an freigesetztem Kalium in den ersten 18 ml Perkolat ergeben sich 32 μmol für den Ansatz ohne bzw. 26 μmol für den Ansatz mit 100 μM CsCl.

Ein entsprechendes Experiment im Februar 1999 mit steigender CsCl-Konzentration in Parallelansätzen ohne, mit 10 μM , 100 μM und 1000 μM CsCl - die Vorlage wurde wiederum mit HCl auf pH 3 eingestellt - zeigt die Abhängigkeit der Kaliumfreisetzung von der eingesetzten Konzentration an CsCl (Abb. 3.31). Ohne Zusatz von CsCl wird eine höhere Kaliumkonzentration als mit 10 μM erhalten, mit 10 μM eine höhere als mit 100 μM CsCl. Bei 100 μM CsCl erscheint die K- Abgabe am stärksten gehemmt. Gegenüber der Kontrolle liegt die Hemmung bei mehr als 50%. Die Kaliumgehalte bei 1000 μM liegen interessanterweise noch etwas höher als bei

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

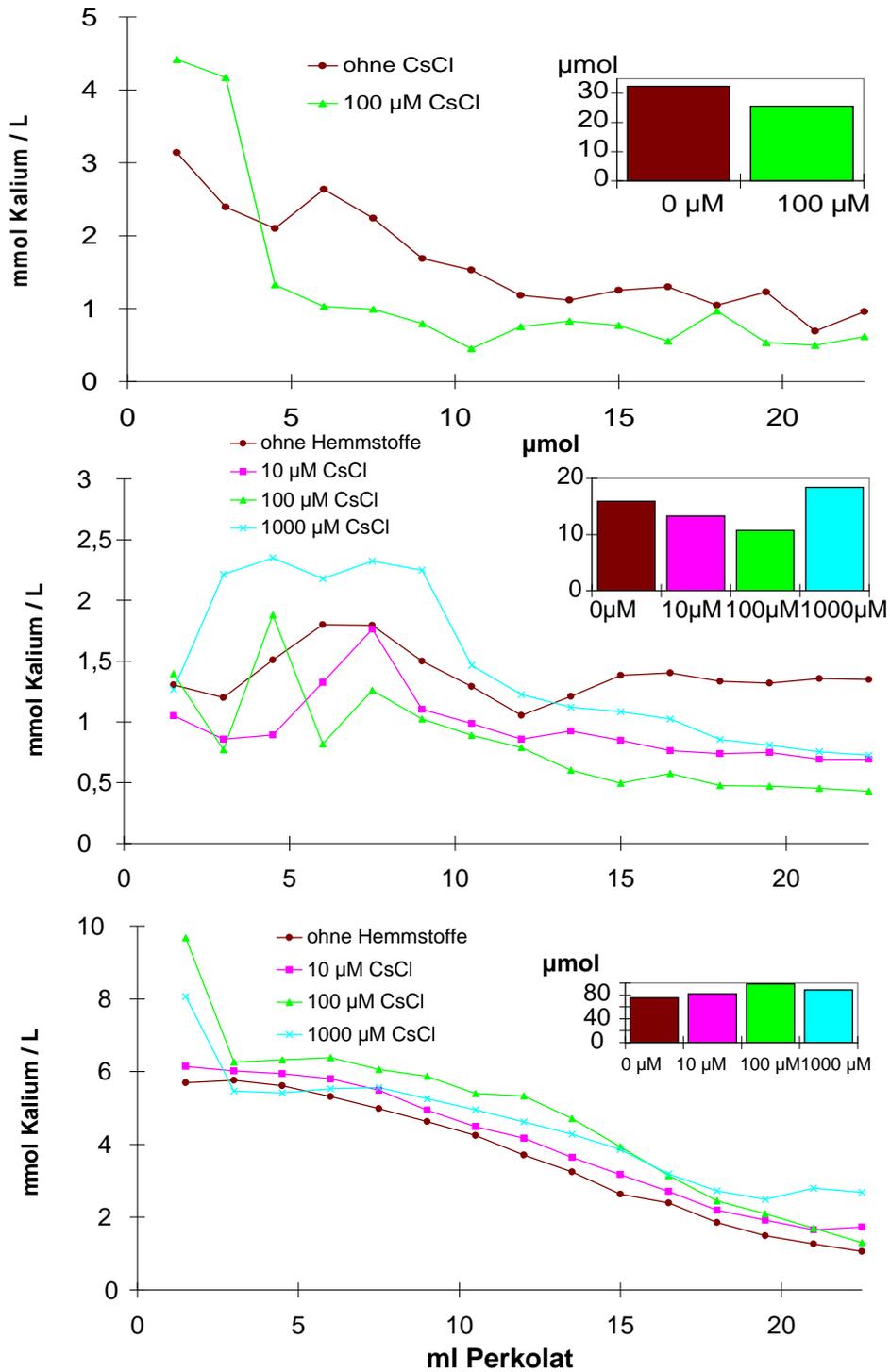


Abbildung 3.31: Kaliumgehalte bei Perkolat bei pH 3 ohne und mit 100 µM CsCl am 02.12.98 (oben), ohne und mit CsCl in versch. Konzentrationen am 22.02.99 (mitte) und am 22.07.99 (unten). Die Säulen geben die Kaliummengen in den ersten 18 ml Perkolat wieder.

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

der Kontrolle, was auf mögliche Austauschvorgänge - Cäsium gegen Kalium - an den Gefäßwänden hinweisen könnte (vgl. Diskussion). Zu Beginn des Experimentes (nach 4 ml Perkolat) treten beim Ansatz mit 1000 μM CsCl Maxima an Kalium von etwa 2300 μM auf. Eine Schwelle, ab der Cs wirkt, zeigt das Ergebnis nicht.

Im Vergleich zum Experiment im Februar, wo die Startkonzentration von Kalium im Gefäßwasser mit 1100 bis 1400 μM sehr niedrig lag, wurden bei einem vergleichbaren Ansatz im Sommerstadium (Juli 1999) mit 5 bis 10 mM sehr hohe Startkonzentrationen von Kalium gemessen (Abb. 3.31). In diesem Stadium verlaufen die Kaliumwerte während der Perkolation weitgehend parallel und lassen keinen deutlichen Einfluß der CsCl- Zugabe erkennen.

Die Tatsache, daß mit Ausnahme des Ansatzes mit 1000 μM CsCl die umgekehrte Reihenfolge der K- Konzentrationen im Vergleich zum Winter vorliegt, könnte allerdings auf eine Hemmung der K- Aufnahme in den Symplasten hinweisen. Das heißt, die höhere CsCl- Konzentration (100 μM) hat gegenüber der niedrigeren (10 μM) und der Kontrolle, die höchsten K- Gehalte im Perkolat, und somit die geringste K- Aufnahme.

Der Ansatz mit 1000 μM CsCl zeigt nach 22,5 ml Perkolation den höchsten Kaliumwert, was auf einen Austausch mit Kaliumionen der Gefäßwand hinweist. Eine Hemmung der Kaliumabgabe durch CsCl können die Ergebnisse im Juli im Gegensatz zu denen vom Februar nicht aufzeigen.

Versuche bei pH 7 sollen zeigen, ob eine Kaliumabgabe in die Gefäße auch im neutralen Milieu stattfindet, obgleich keine pH- Regulation bei neutralem pH notwendig ist und wenn, ob sie dann durch CsCl hemmbar ist. Im September 1999 wurde das folgende Experiment (Abb. 3.32) ohne, mit 10 μM , 100 μM bzw. 1000 μM CsCl durchgeführt. Während die Startwerte für Kalium relativ tief liegen und noch erkennbar streuen, verlaufen die Kaliumgehalte nach etwa 10 ml Perkolation annähernd parallel. Eine Hemmung der K- Kanäle erscheint nur bei 100 μM deutlich gegeben. Im weiteren Verlauf ist eine Abhängigkeit von Cs nicht mehr erkennbar. Die Kaliumkonzentration liegt nach 22,5ml noch bei über 500 μM , das entspricht der Hälfte bis einem Drittel des Startwertes, was auf eine anhaltende K- Abgabe in das Gefäßwasser hinweist.

Wie der Vergleich von Ca und K nach 22,5 ml Perkolation bei pH 7 zeigt, stabilisiert sich die Kaliumabgabe auf hohem Niveau (Abb. 3.32), während die Abgabe von Calcium unter denselben Bedingungen fast zum Erliegen kommt (Abb. 3.32). Dies deutet darauf hin, daß dann, wenn keine umfangreiche pH- Regulation notwendig ist, auch kein Anstieg der Ca-Ionen im Gefäßwasser auftritt (vgl. Diskussion). Die Kaliumkonzentration erreicht nach 22,5 ml Perkolation immer noch 32 % bis 62 % des Startwertes, während die Calciumkonzentration danach nur noch zwischen 3,6 % und 6,1 % des Startwertes liegt.

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

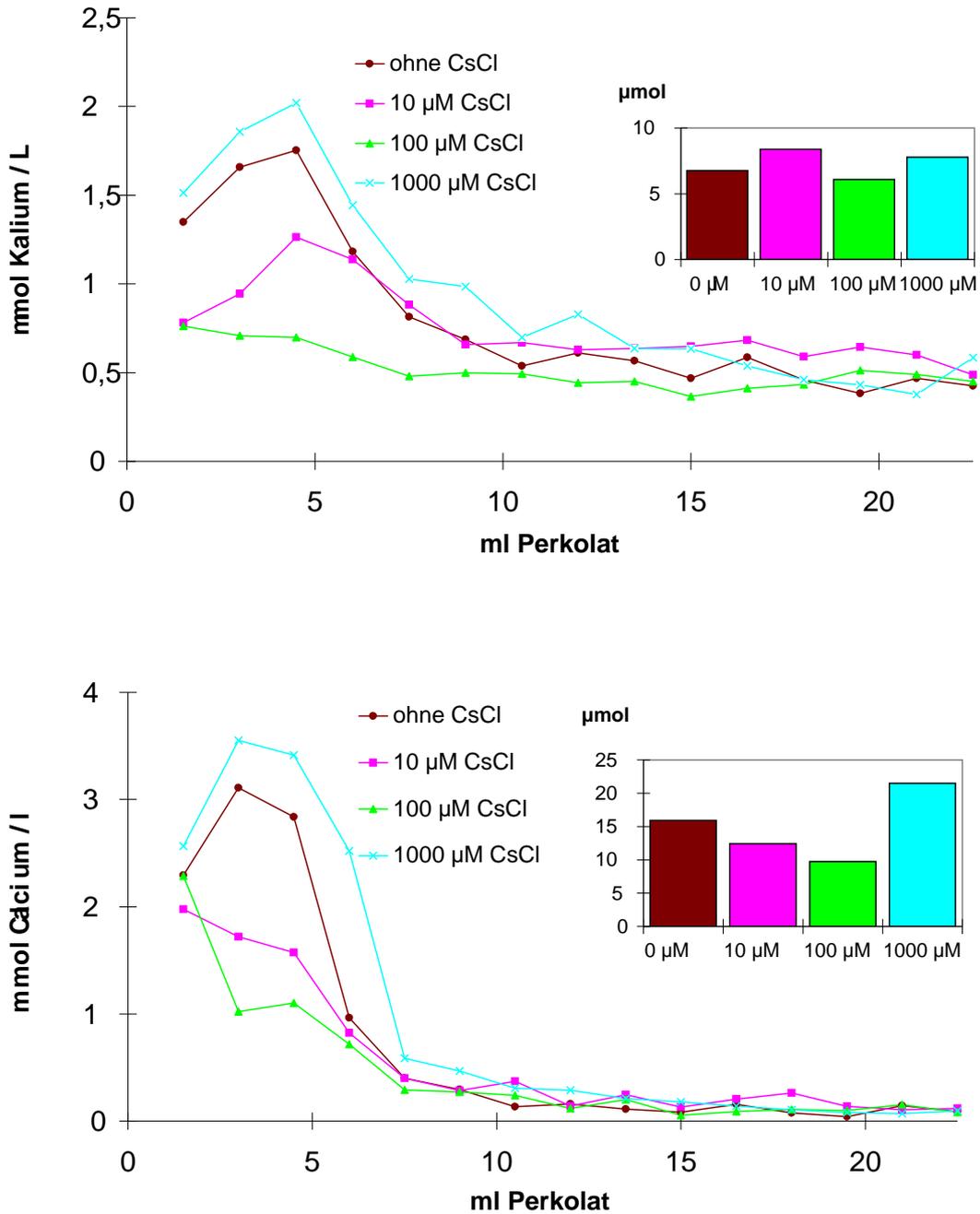


Abbildung 3.32: Gehalte an Kalium (oben) und Calcium (unten) bei Perkolatation ohne und mit CsCl in verschiedenen Konzentrationen bei pH 7 am 23.09.99. Die Säulen geben die Gesamtmengen an Kalium bzw. Calcium nach 18 ml Perkolatation wieder.

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

Vanadat als K- Kanalblocker

Auch Vanadat wird wie Cs⁺ als Kaliumkanalblocker eingesetzt. In Wurzeln von *Atriplex nummularia* Lindl. blockiert Vanadat schon in Konzentrationen von 150µM die Na⁺ Pumpe (Braun et al. 1988).

Bei den folgenden Experimenten im Jahre 1999 (siehe Abb. 3.33) wurde die Wirkung von Cs und Vanadat in Ansätzen mit 100 µM CsCl und 100 µM Na- Vanadat bei pH 3 miteinander verglichen. Die Kaliumgehalte nach 18 ml Perkolation sind in Tab. 3.8 dargestellt.

Datum	Kontrolle µM	Cs µM K	Vanadat µM K	Cs % K	Vanadat % K
10.02.	13,36	11,27	12,60	84,3	94,3
07.04.	63,76	26,63	31,30	41,8	49,1
31.05.	30,08	22,58	24,66	75,1	82,0
14.07.	4,20	2,71	3,59	64,4	85,4
18.08.	13,90	14,07	17,68	101,2	127,4

Tabelle 3.8: Kaliumabgabe in den ersten 18 ml Perkolat bei Perkolation bei pH 3 mit 100µM Cs und 100µM Vanadat sowie ohne Blocker zur Kontrolle bei pH 3 zu verschiedenen Jahreszeiten im Jahre 1999. Angaben in µM und in % der Kontrolle.

Trotz der erheblichen Schwankungsbreite beim jeweiligen Versuchsstart von 1000 µM bis 4300 µM am 07.04. (Abb. 3.33) und 100 µM bis 400 µM am 14.07. (ohne Abbildung) und dem unterschiedlichen zeitlichen Verlauf wurde außer im August stets ohne Hemmstoffe am meisten Kalium in das Gefäßwasser abgegeben, gefolgt vom Ansatz mit Vanadat. Mit Cs war die Kaliumabgabe am geringsten (Tab. 3.8).

Auffallend ist der unterschiedliche Verlauf der Kaliumwerte im Perkolat (Abb. 3.33): Während meist (wie am 10.02.99) die Konzentrationen gegen Ende des Versuches nach 22,5 ml Perkolation tiefer lagen als zu Beginn, lagen sie am 07.04 etwa gleich - mit Ausnahme des Ansatzes ohne Hemmstoff - und am 31.05. sogar höher als die Startwerte. Im April und Mai lagen die Kaliumgehalte im Gefäßwasser im Jahresgang betrachtet stets höher und der pH niedriger als im Jahresdurchschnitt (Abb. 3.3). Vanadat hat sich somit als wirksamer Blocker der Kaliumkanäle erwiesen, wenn auch die beobachtete Hemmwirkung geringer ausfiel als bei Cäsium.

TEA und Na als weitere K- Kanalblocker

TEA wirkt in Konzentrationen von 10 mM (Bertl et al. 1997) oder 90 mM (Tyerman 1997) als Kaliumkanalblocker. Auch Na⁺ wirkt in höheren Kon-

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

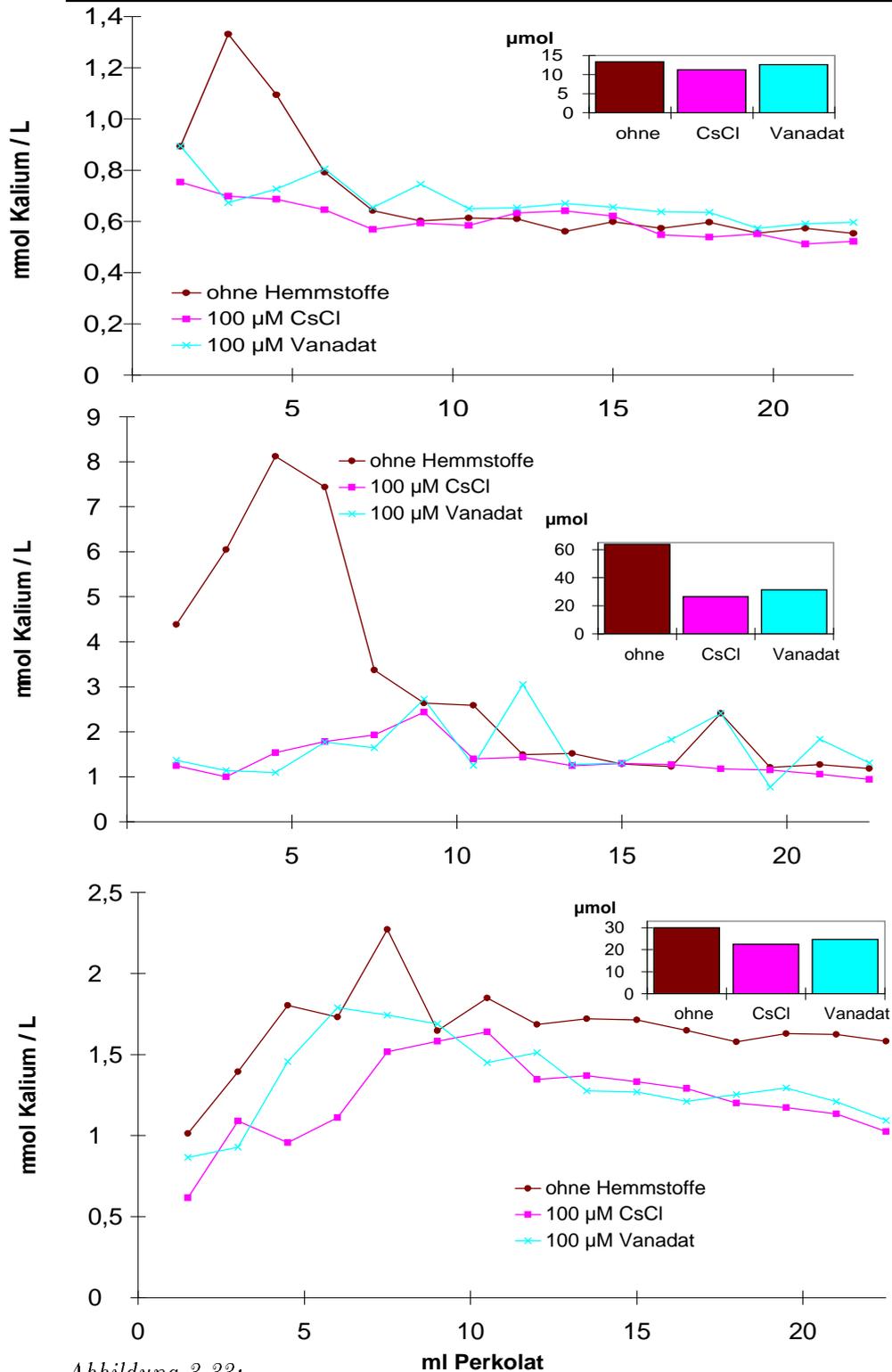


Abbildung 3.33:

K-Gehalte bei Perkolatation mit pH 3 mit K-Kanalblockern am 10.02.99 (oben), 07.04.99(mitte) und 31.05.99(unten). Die Säulen zeigen die Kaliummengen der ersten 18 ml Perkolat.

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

zentration von etwa 125 mM als Blocker der Kaliumkanäle (Hansen et al. 1996).

In unserem Versuch am 10.02.99 konnte durch Zugabe von 100 mM TEA keine Hemmung der K- Abgabe ins Gefäßwasser festgestellt werden, während CsCl und Vanadat zur gleichen Zeit eine deutliche Hemmung zeigten. Der Einsatz von 100 μ M TEA brachte sogar leicht höhere Werte als ohne Blocker (ohne Abbildung). Dieser Blocker wurde daher nicht weiter untersucht.

3.4.2 Blockierung der Aufnahme von Kalium in den Symplasten

Bei einem Überangebot von Kalium im Gefäßwasser wäre eine Kaliumaufnahme in die lebenden Zellen zu erwarten. Bei Zugabe von Cs⁺ sollte der einwärtsgerichtete Kaliumstrom an den Kaliumkanälen möglicherweise blockiert werden können und das eingesetzte Kalium wäre dann vollständig im Perkolat wiederzufinden. Nicht kaliumselektive Kanäle würden dagegen keinen Unterschied zeigen. Wenn man für das Cytoplasma eine Kaliumkonzentration von etwa 100 mM annimmt (siehe 4.5.3), erfolgt die Aufnahme von Kalium in die Zelle bei einer Konzentration über 100 mM entlang des Konzentrationsgradienten, sonst gegen diesen. Bei Vorlage von 5 bis 10 mM KCl könnten zusätzlich passive Austauschvorgänge an den Zellwänden erfolgen, die in einem Absinken des pH resultieren.

Perkolation bei pH 3

Einige Versuche wurden im sauren Milieu durchgeführt. Ein Antiport K⁺/H⁺ zur Kompensation der Kaliumaufnahme würde gegen einen Protonengradienten erfolgen. Falls ferner in den Ansätzen mit Gluconat statt Chlorid weniger Kalium im Perkolat nachzuweisen ist, wäre dies ein Hinweis auf einen Symport von H⁺ und Cl⁻ Ionen in die lebenden Zellen. Da durch den Symport der Protonengradient zwischen den lebenden Zellen und dem Apoplasten herabgesetzt wird, findet der Austausch von K⁺ aus den Gefäßen gegen H⁺ aus den Zellen gegen einen geringeren Gradienten statt. Eine geringere pH- Regulation mit CsCl wäre ein weiterer Hinweis auf aktive Kaliumkanäle.

Bei dem folgenden Experiment vom Januar 1998 wurden als Medium 10 mM KCl vorgelegt, wobei ein Ansatz mit und einer ohne 100 μ M CsCl (Abb. 3.34) ablief. Die Kaliumkonzentration im Perkolat stieg bei dem Ansatz mit CsCl rasch auf den Wert der Vorlage an. Nach 21 ml Perkolat waren mit CsCl- Zusatz schon 78% der vorgelegten Konzentration erreicht gegenüber 34% ohne CsCl. Nach 60 ml Perkolation erreicht der Kaliumgehalt im Ansatz mit CsCl schon 93% und ohne 76% der eingesetzten Ausgangskonzentration.

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

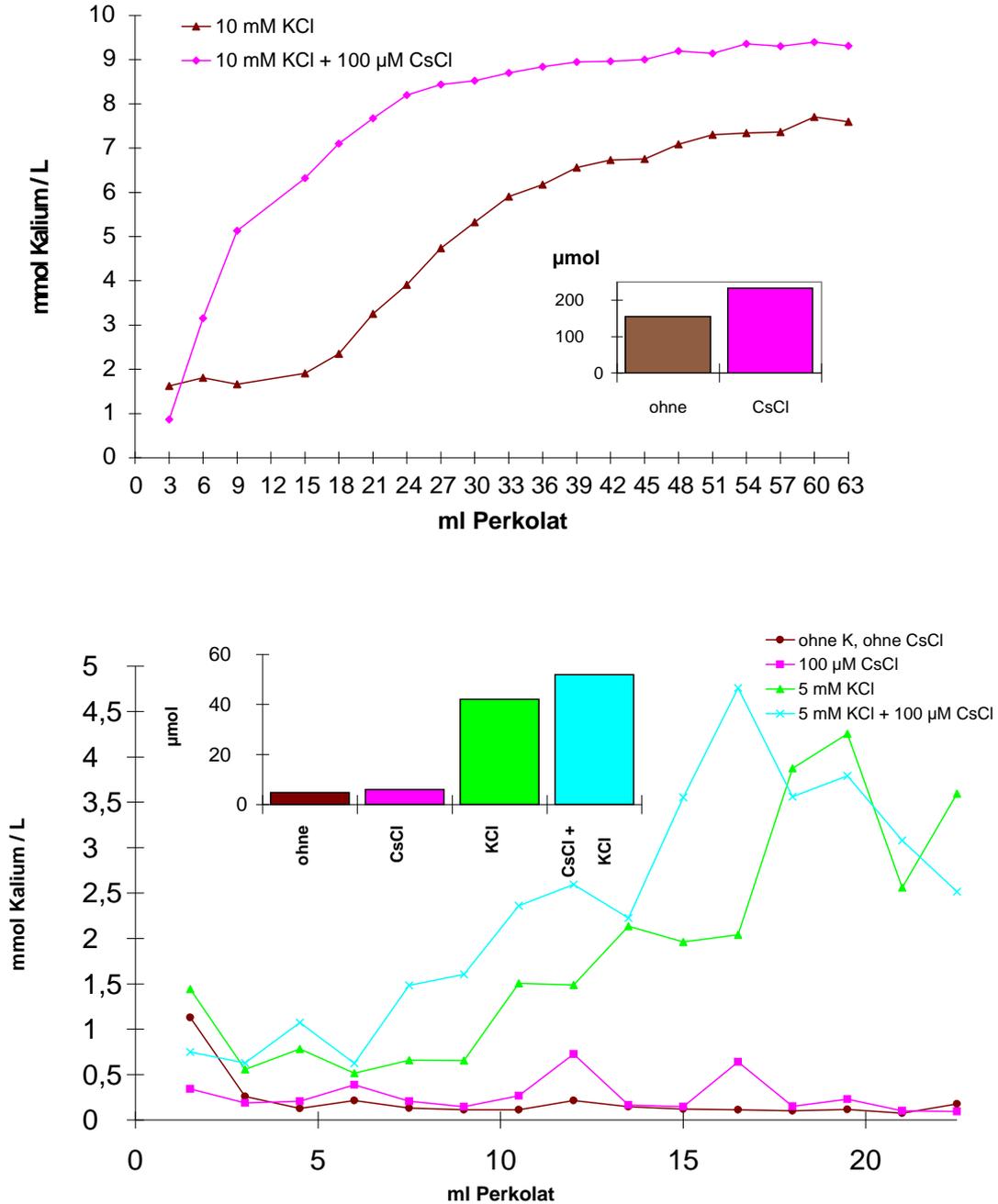


Abbildung 3.34: Kaliumgehalte bei Perkolation bei pH 3 mit 10 mM KCl und 100 µM CsCl am 21.01.98 (oben) und mit und ohne 5 mM KCl bzw. 100 µM CsCl am 22.01.99 (unten). Die Säulen geben die Kaliummengen in den ersten 60 ml (oben) bzw. 18 ml (unten) Perkolat wieder.

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

Dieses Ergebnis zeigt erstens, daß eine deutliche und kontinuierliche Kaliumaufnahme erfolgt, und zweitens, daß diese durch Cs deutlich hemmbar ist.

Bei Experimenten mit nur 5 mM KCl im perkolierten Medium im Januar des Folgejahres (Abb. 3.34) war der Unterschied zwischen den Ansätzen mit bzw. ohne CsCl nicht mehr so deutlich. Jedoch zeigt die Bilanz der Kaliumabgabe nach 18 ml mit 42 μmol K (ohne CsCl) wiederum niedrigere Werte als mit 52 μmol K (100 μM CsCl). CsCl hemmt also die Kaliumaufnahme, jedoch in geringerem Umfang als bei Vorlage von 10 mM Kalium.

Im Experiment vom 25.06.1999 liegen die Konzentrationen von Kalium im Gefäßwasser mit 1,7 mM bis 2,7 mM wesentlich höher (Abb. 3.36) als im Januar mit 0,4 mM bis 1,4 mM (Abb. 3.34). Die Wirkung von CsCl ist hier nicht mehr eindeutig auszumachen. Die Kaliumbilanzen nach 22,5 ml liegen mit 87,8 μmol bei KCl im Ansatz bzw. 84,4 μmol bei KCl und CsCl etwa gleichauf. Jedoch deutet der Mittelwert der letzten drei Meßwerte bei fortgeschrittener Perkolation in der Sprossachse mit 4,6 mM (ohne CsCl) bzw. 4,7 mM (mit CsCl) auf eine höhere Kaliumaufnahme als ohne CsCl hin, was als Hinweis auf eine Hemmwirkung von CsCl auch in diesem Stadium gelten kann.

Perkolation bei pH 7

Die Perkolation mit neutralem Medium kommt den natürlichen Bedingungen im Spross näher. Ein Antiport K^+/H^+ müßte nicht gegen einen Protonengradienten erfolgen.

Im Vergleich zum oben beschriebenen Versuch (Abb. 3.36) wurden am Vortag Versuche im neutralen Milieu (pH 7) durchgeführt (Abb. 3.35). Die Konzentrationen von Kalium im Gefäßwasser liegen zu Beginn in vivo schon zwischen 2,8 mM (mit KCl, mit CsCl) und 3,7 mM (mit KCl, ohne CsCl). Die Kaliumbilanzen nach 22,5 ml liegen bei 86,5 mmol (ohne CsCl) bzw. bei 86,4 mmol (mit CsCl), wodurch erneut eine Hemmung der K- Aufnahme durch Cs bei hohen Ausgangsgehalten von Kalium nicht nachweisbar ist. Der Mittelwert der letzten drei Meßwerte mit 4,3 mM (ohne CsCl) bzw. 4,6 mM (mit CsCl) deutet andererseits wieder auf eine höhere Kaliumaufnahme ohne CsCl hin, und damit auf eine Hemmwirkung von CsCl.

3.4.3 Hemmung der pH- Regulation durch CsCl im neutralen und sauren Medium

Zuletzt wird hier die Frage aufgegriffen, ob die Hemmung der K-Kanäle Einfluß auf die pH- Regulation hat, d.h. ob die K- Kanäle für die beobachtete pH- Regulation wirklich von Bedeutung sind. Es wurde ferner untersucht,

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

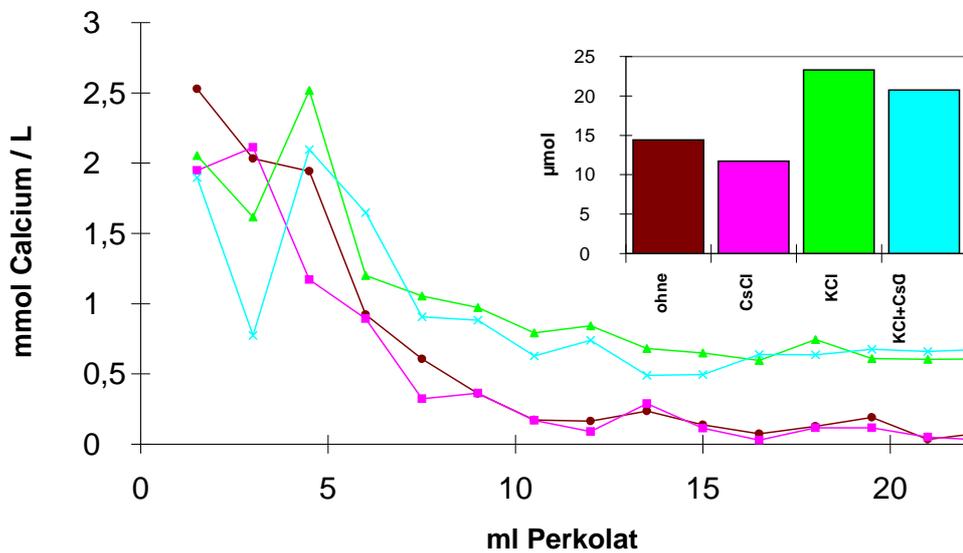
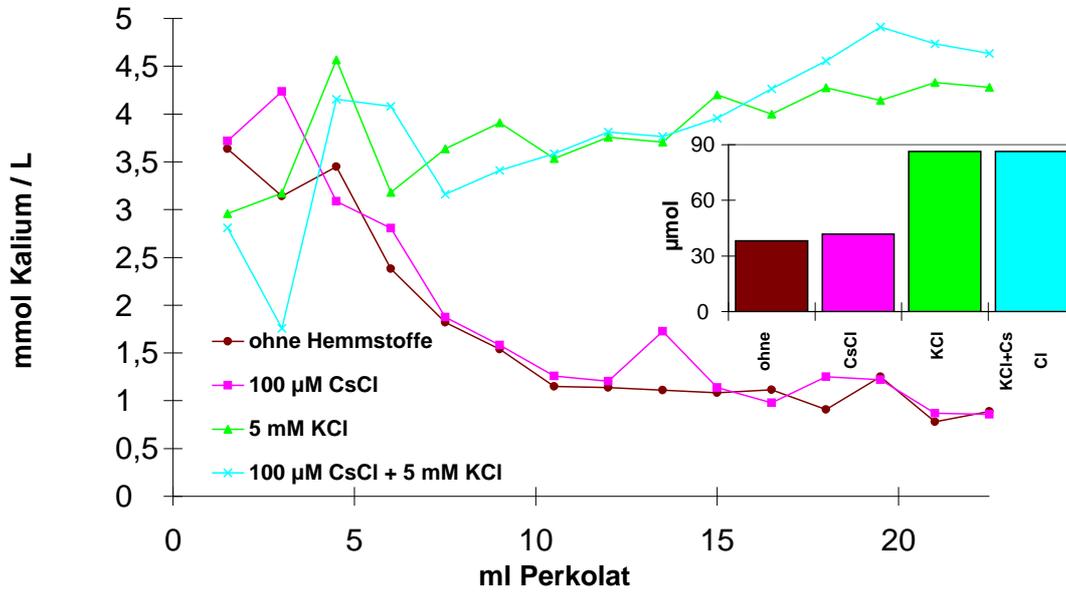


Abbildung 3.35: Kaliumgehalte (oben) und Calciumgehalte (unten) bei Perkolation mit CsCl bei pH 7 am 24.06.99. Die Säulen geben die Kationmengen in den ersten 18 ml Perkolat wieder.

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

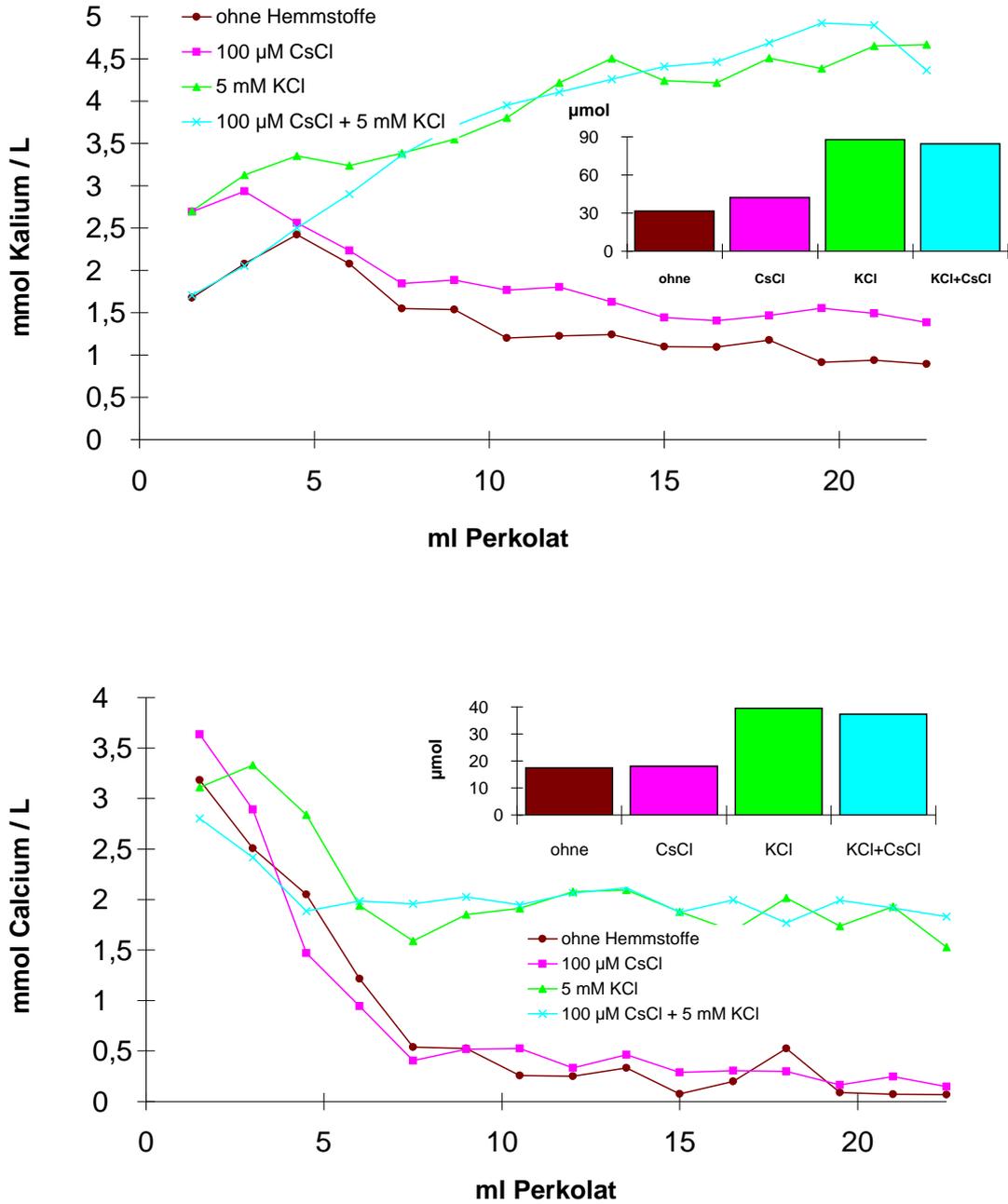


Abbildung 3.36: Kaliumgehalte (oben) und Calciumgehalte (unten) bei Perkolatation mit CsCl bei pH 3 am 25.06.99. Die Säulen geben die Kationenmengen in den ersten 18 ml Perkolat wieder.

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

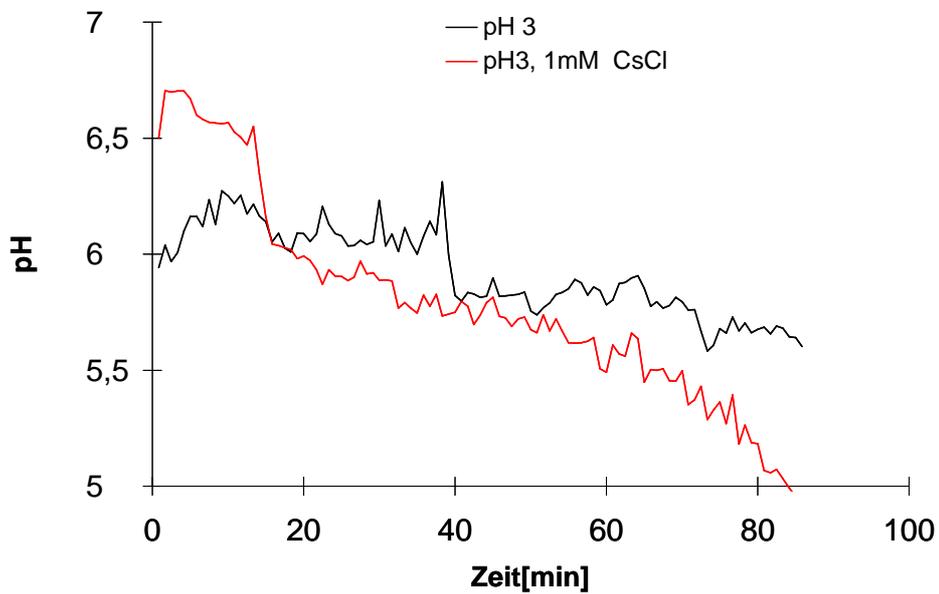
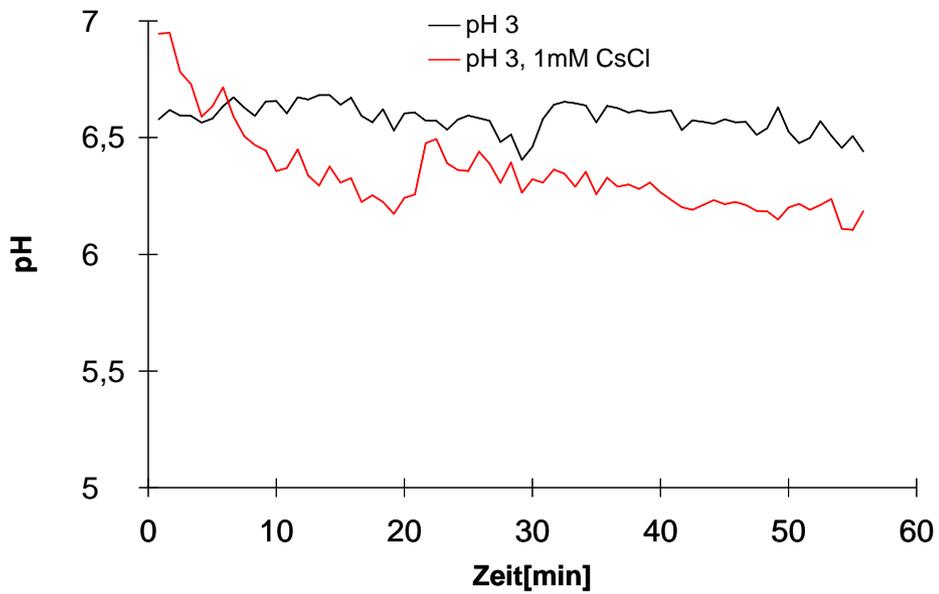


Abbildung 3.37: pH bei Perkolation mit 1 mM CsCl bei pH 3 am 23.01.97 zu Versuchsbeginn (oben) sowie nach einer Perkolationspause von 3 Stunden (unten).

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

ob die pH- Regulation von der Konzentration des Kanalblockers abhängt, ob Vanadat und Cäsium vergleichbare Effekte zeigen und ob auch bei einem Überangebot an Kalium der pH noch einreguliert wird.

Im folgendem Experiment im Januar 1997 wurde ein Ansatz bei pH 3 ohne CsCl und ein Ansatz mit 1 mM CsCl zunächst für 60 min perkoliert (Abb. 3.37). In beiden Fällen wurde der pH sofort von pH 3 auf pH 6 bis pH 7 reguliert. Während der pH mit CsCl in 60 min von pH 6,9 auf pH 6,2 fiel, nahm er ohne CsCl dagegen nur von pH 6,6 auf pH 6,4 ab. Damit erscheint CsCl eine Hemmung der pH- Regulation zu bewirken. Dann wurde die Zufuhr von Medium für drei Stunden unterbrochen. Bei Zimmertemperaturbedingungen hatte sich in dieser Zeit der pH im Gefäßwasser ohne CsCl von pH 6,4 auf pH 5,9 erniedrigt, mit CsCl von pH 6,2 auf pH 6,5 erhöht. In den folgenden 90 min erneuter Perkolation fiel der pH ohne CsCl von pH 5,9 auf pH 5,6 und mit CsCl deutlich stärker von pH 6,5 auf 5,0 ab (Abb. 3.37). Die Regulation des pH wurde durch CsCl somit deutlich gehemmt.

Im April 1999 fällt bei Perkolation mit pH 3 der pH im Ansatz mit CsCl von pH 5,3 nach gut zwei Stunden auf pH 4 und liegt nach 12 Stunden nur noch bei pH 3,4, während die Parallele ohne CsCl zunächst von pH 6,0 auf pH 6,3 ansteigt und nach 12 Stunden noch bei pH 5,8 liegt (Abb. 3.38). Wiederum wurde die Regulation des pH durch CsCl somit deutlich gehemmt. Hier zeigt CsCl jedoch schon bei einer niedrigeren Konzentration von 10 μ M Wirkung.

Während im Juli 1998 die Ansätze mit 100 μ M und 1000 μ M CsCl nach 140 min einen deutlichen Abfall des pH von pH 7,2 auf pH 5,9 im Vergleich zu einem Abfall von pH 7,2 auf pH 6,8 im Ansatz ohne CsCl zeigen (Abb. 3.38), unterscheiden sich im November 1998 die Ansätze ohne, mit 10 μ M, 100 μ M, und 1000 μ M CsCl nicht mehr sichtbar. Der pH fällt innerhalb von 16 Stunden von pH 6,7 bis pH 6,8 auf pH 5,6 bis pH 6,0 (Abb. 3.39). Die pH- Regulation über den Austausch von Kalium gegen Protonen ist also nicht zu allen Jahreszeiten zu beobachten.

Mit Vanadat zeigt sich im Januar 1999 (Abb. 3.40) bei pH 3 nach etwa 200 ml Perkolation ein Abfall des pH von pH 7,0 auf pH 5,4, während die Ansätze ohne Vanadat (pH 3, pH 7) bzw. Vanadat bei pH 7 den pH etwa im neutralen Bereich halten. Im sauren Bereich bewirkt Vanadat also eine Hemmung der Regulation. Beim Vergleich von CsCl mit Vanadat fällt der pH in den Ansätzen mit Vanadat bei pH 3 mal stärker (Abb. 3.41), mal weniger stark (Abb. 3.40) ab. Die Versuche lassen keinen Schluß darauf zu, welcher der effektivere Hemmstoff ist. Die Perkolation mit 100 μ M TEA brachte keine pH- Absenkung (16.09.98) im Gegensatz zum Ansatz mit CsCl (ohne Abbildung).

Die Hemmung der Aufnahme von Kalium wurde in Experimenten mit bzw. ohne 5 mM KCl und 100 μ M CsCl untersucht (Abb. 3.35 und 3.36), der

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

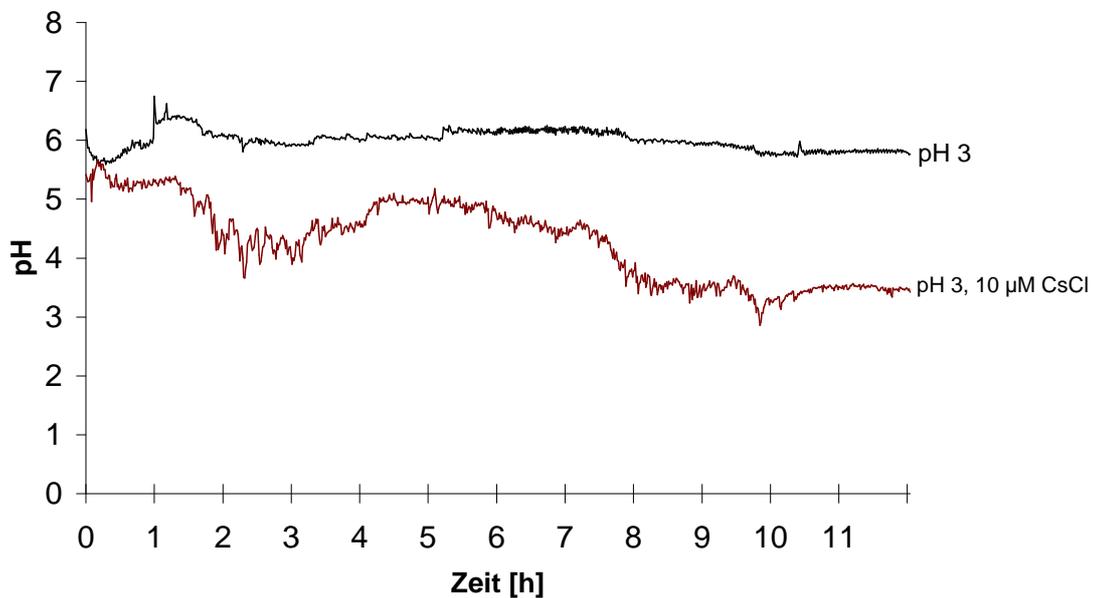
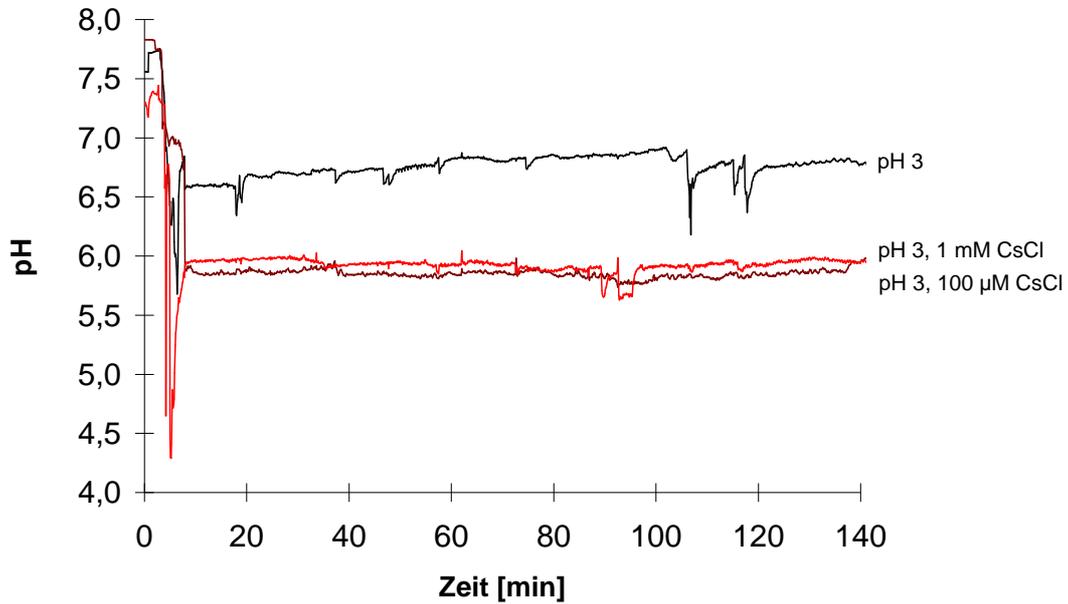


Abbildung 3.38: Verlauf des pH bei Perkolation mit CsCl bei pH 3 am 09.07.98 ohne, mit 100 µM und mit 1 mM CsCl (oben) sowie am 22.04.99 ohne und mit 10 µM CsCl (unten).

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

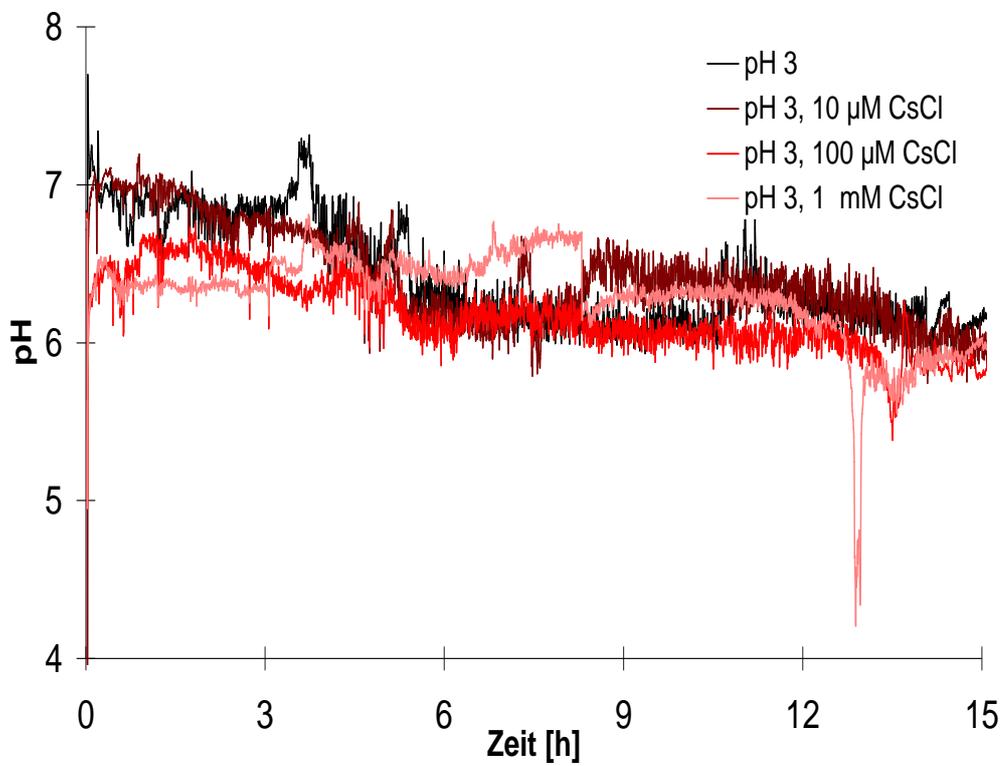


Abbildung 3.39: Verlauf des pH bei Perkolations mit CsCl bei pH 3 am 23.11.98 ohne, mit 10 µM, mit 100 µM und mit 1000 µM am 23.11.98.

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

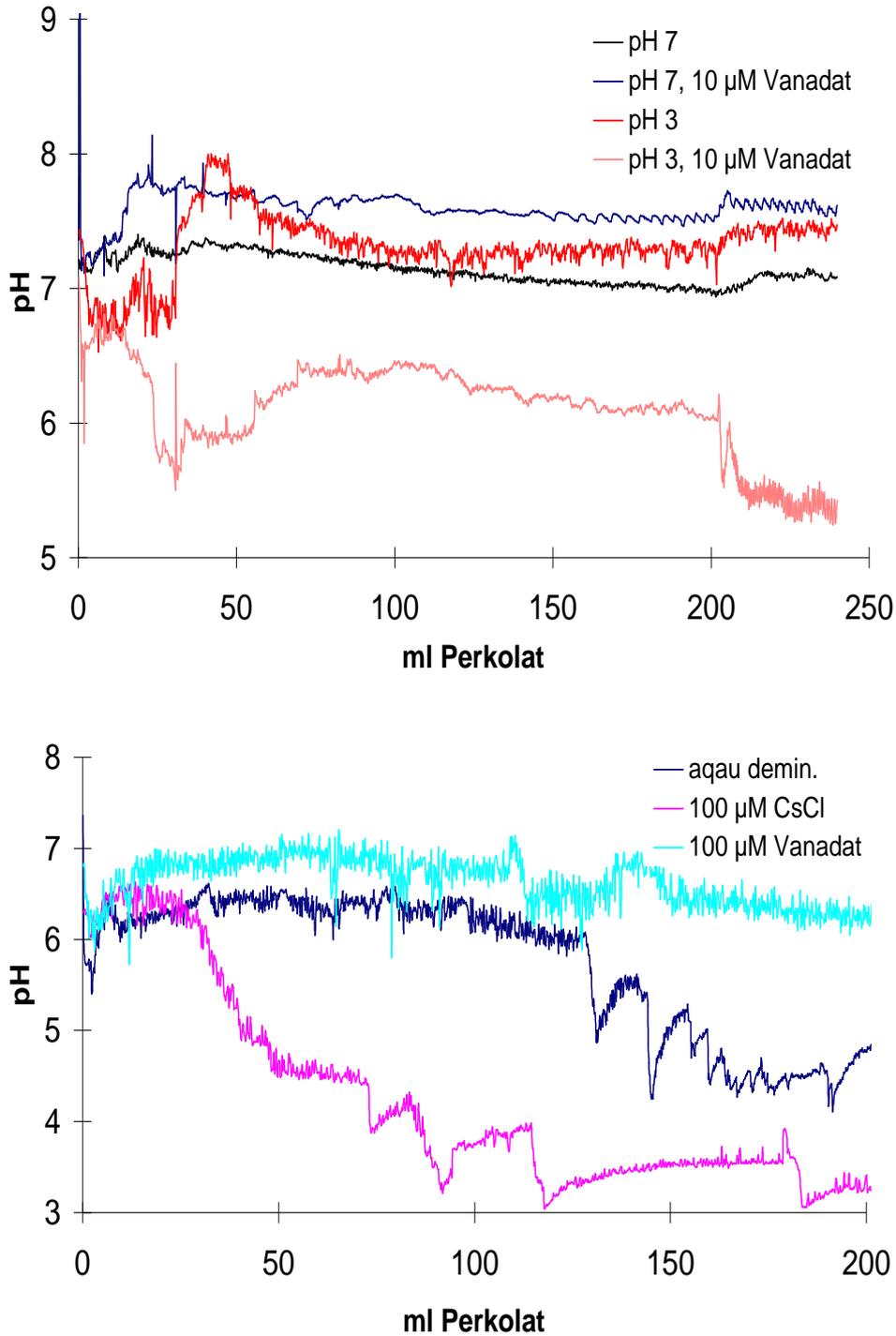


Abbildung 3.40: Verlauf des pH bei Perkolation mit Kaliumkanalblockern mit 10 µM Vanadat bei Vorlage von pH 3 und pH 7 am 21.01.99 (oben) sowie mit 100 µM Cs und 100 µM Vanadat bei pH 3 am 07.04.99 (unten).

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

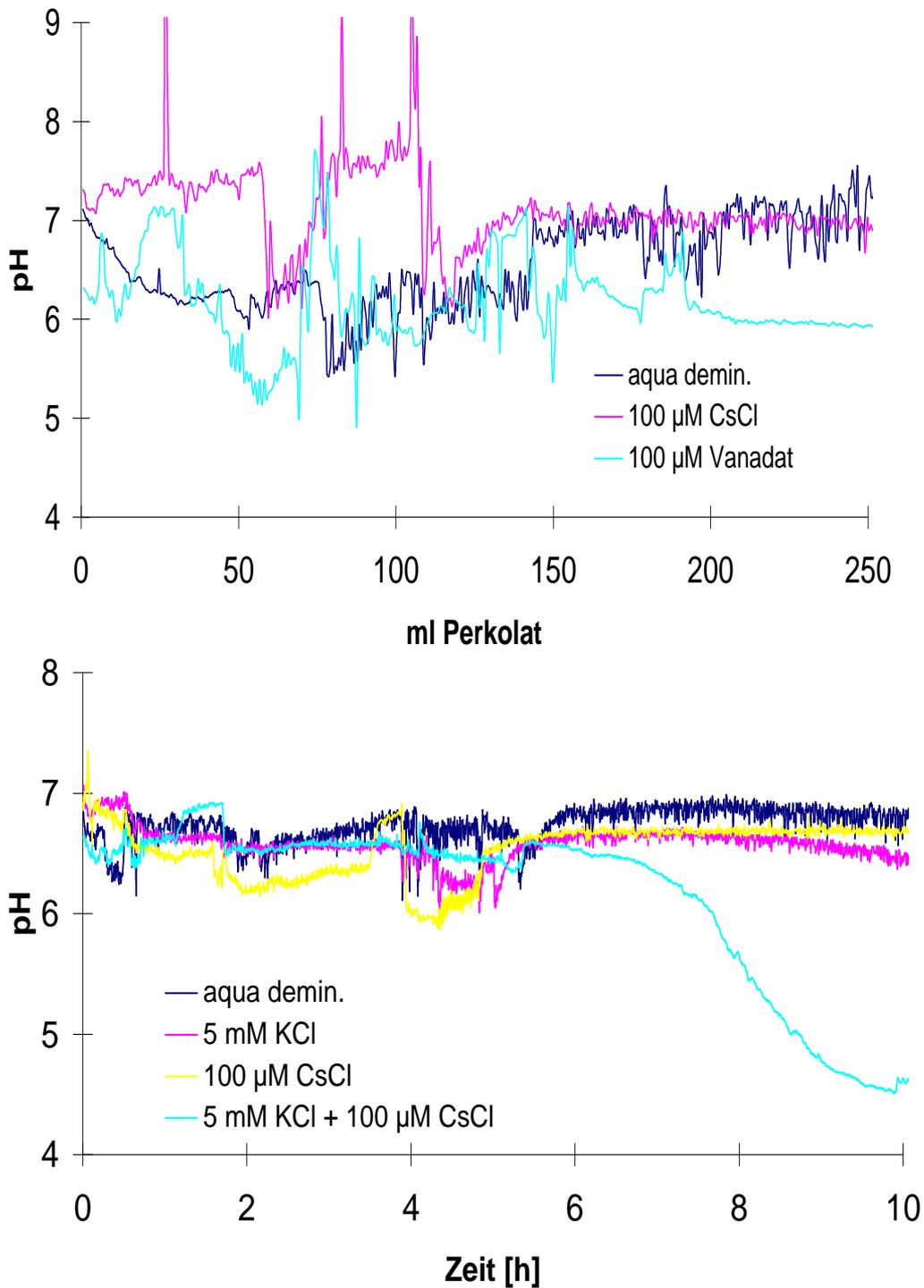


Abbildung 3.41: Verlauf des pH bei Perkolation mit Kaliumkanalblockern mit 100 µM Cs und Vanadat bei pH 3 am 14.07.99 (oben) sowie mit und ohne 100 µM Cs und 5 mM K bei pH 3 am 22.01.99.

3.4 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

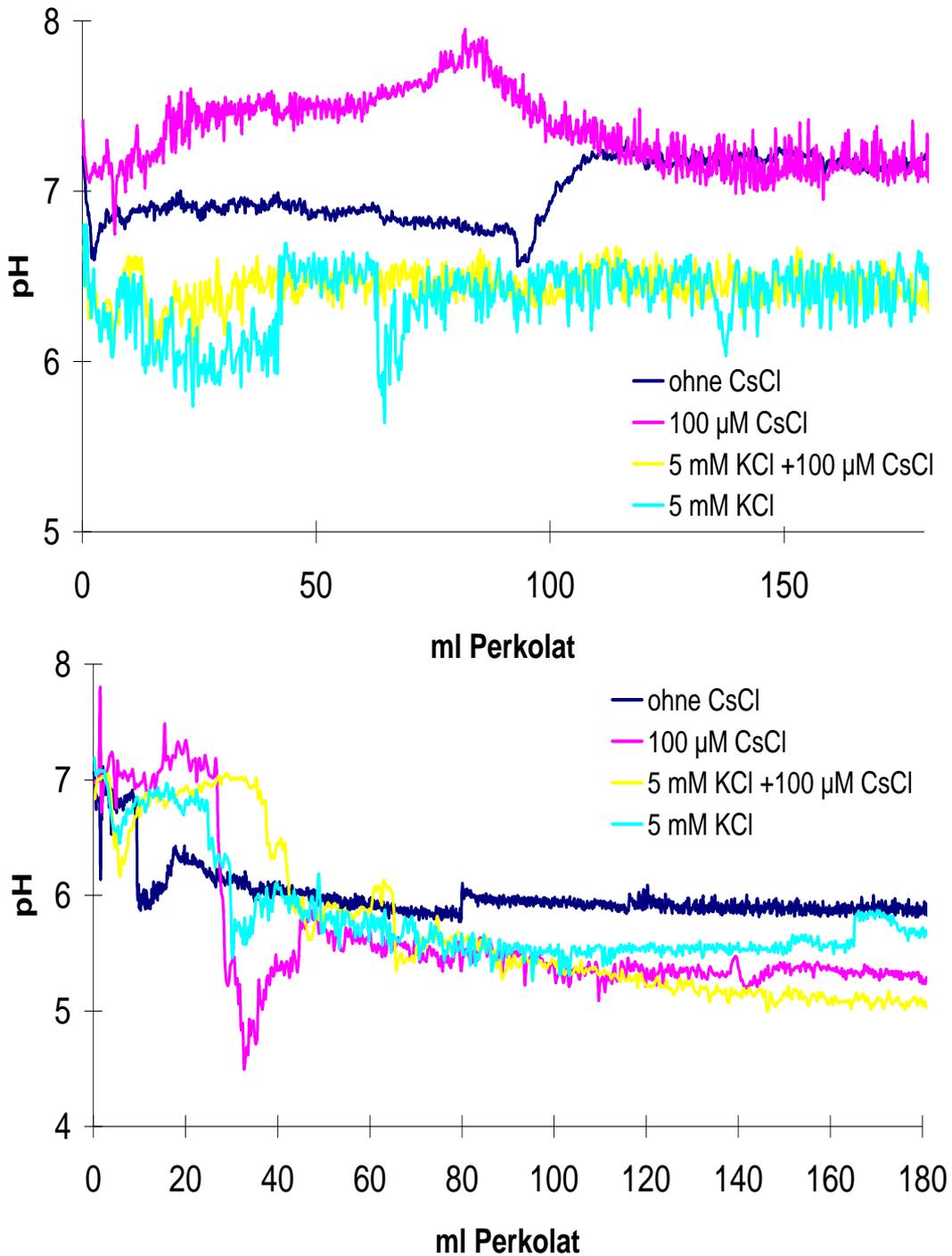


Abbildung 3.42: Verlauf des pH bei Perkolatation mit und ohne CsCl, mit und ohne 5 mM KCl bei Vorlage von pH 7 am 24.06.99 (oben) sowie bei Vorlage von pH 3 am 25.06.99 (unten).

3.5 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

Einfluß auf den pH wird im folgenden dargestellt. Im Januar 1999 regulieren die Achsenabschnitte über 6 Stunden den pH von pH 3 der Vorlage in den neutralen Bereich (Abb. 3.41). Bei dem Ansatz mit KCl und Cs fällt dabei der pH nach 7 Stunden auf pH 6 und nach 10 Stunden auf pH 4,6. In einem weiteren Experiment vom 24.06.99 mit pH 7 regulieren die Ansätze mit KCl auf pH 6,4 und ohne KCl auf pH 7,2, unabhängig von CsCl (Abb. 3.42). Im Vergleich dazu zeigen die Ansätze bei pH 3 einen deutlichen Einfluß von CsCl. Mit CsCl und KCl fällt der pH nach 12 Stunden auf pH 4,5, nur mit Cs auf pH 4,9, nur mit KCl auf pH 5,4 und ohne KCl und CsCl wird der pH auf pH 5,7 gehalten (Abb. 3.42). Diese Ergebnisse sprechen für eine pH-Regulation bei pH 3, aber nicht bei pH 7, die im Winter wie im Sommer stattfinden kann.

3.5 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

Mit dem Einsatz von Stoffwechsellinhibitoren wurde ein weiterer experimenteller Weg beschritten, die aktive Regulation von pH und Kationengehalt in den Gefäßen nachzuweisen und zu quantifizieren. Mit den verwendeten Hemmstoffen läßt sich zum einen ein aktiver, energieabhängiger Protonentransport unterdrücken, zum anderen kann die Permeabilität der Zellmembran herabgesetzt werden, wodurch Ionengradienten abgebaut werden können. Die Hemmwirkung etwa auf den Protonentransport kann sich jedoch oft erst dann auswirken, wenn in der Zelle gespeichertes ATP aufgebraucht ist. Unterschiede bei den Kationengehalten in den Ansätzen mit und ohne Hemmstoffe liefern jedoch Hinweise auf eine Wirkung der Hemmstoffe schon während der ersten 22,5 ml Perkolation.

3.5.1 2,4-D

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) ist ein in den Wasserleitbahnen (Bolard 1960) transportierbares Herbizid. Ein Einfluß auf die pH- oder Ionenregulation sollte in den im folgenden dargestellten Experimenten geprüft werden. Bei einem Experiment vom 06.05.98 (Abb. 3.43) bei pH 3 mit 10 μ M 2,4-D und einer Parallelen ohne 2,4-D wurde der pH während der folgenden 120 ml Perkolation in beiden Ansätzen vollständig auf Werte zwischen pH 6,5 und pH 7,0 einreguliert. Dagegen fiel bei einem Experiment am gleichen Tag mit höherer Konzentration (100 μ M) der pH im Ansatz mit 2,4-D im Vergleich zur Kontrolle deutlich zurück (Abb. 3.43). So lag der pH mit und ohne 2,4-D zu Versuchsbeginn etwa bei pH 6. mit 2,4-D fiel er dann deutlich auf einen pH von 4,3 nach 180 ml Perkolation im Vergleich zu pH 5,2 im Ansatz ohne 2,4-D.

3.5 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

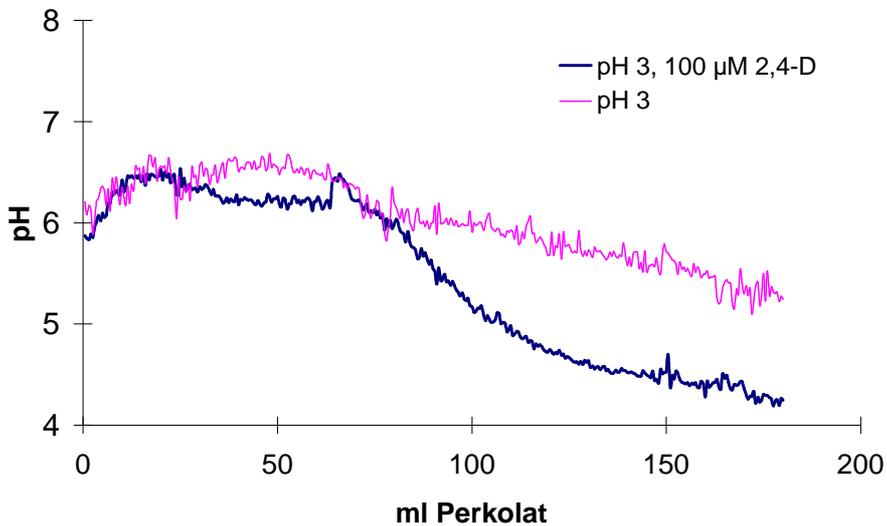
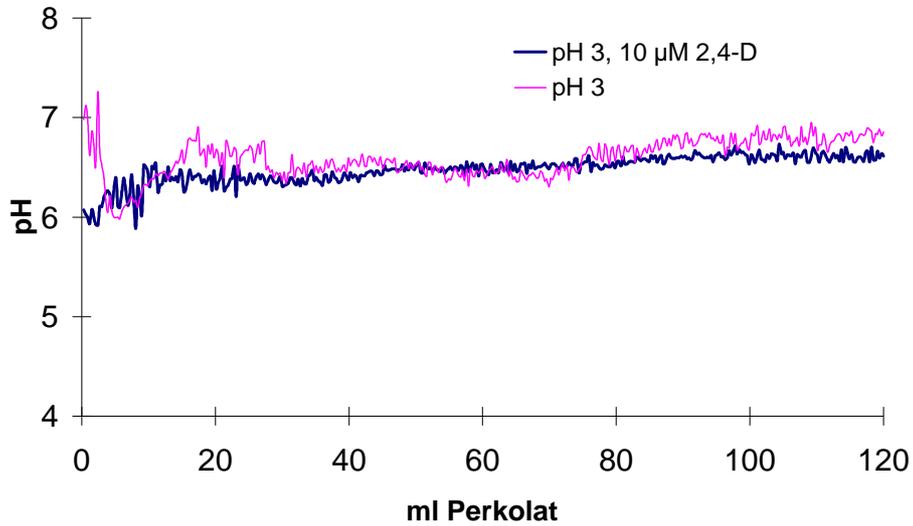


Abbildung 3.43: pH bei Perkolatation mit 2,4-D bei pH 3 am 06.05.98 ohne und mit 10 µM 2,4-D (oben) sowie ohne und mit 100 µM 2,4-D (unten).

3.5 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

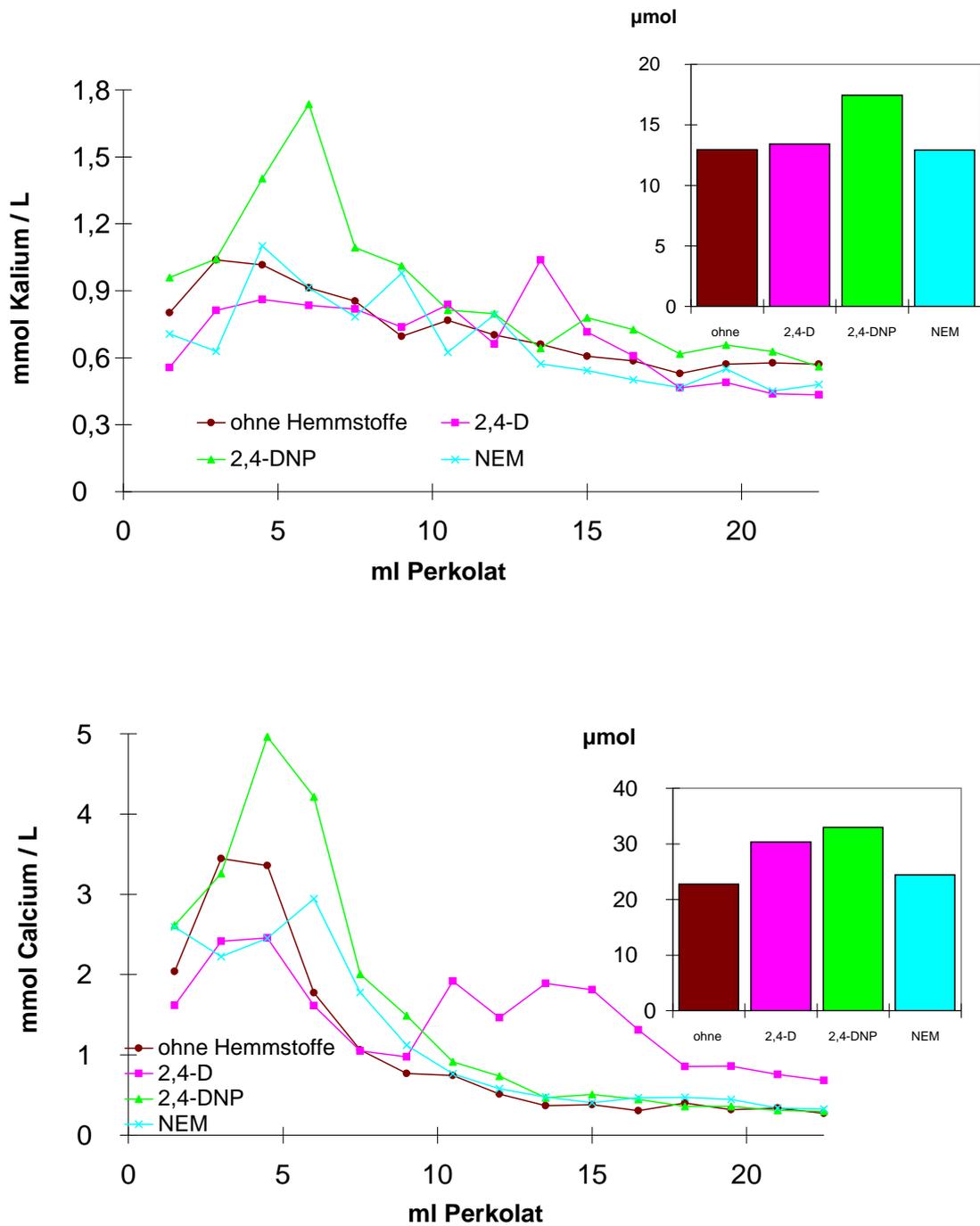


Abbildung 3.44: Kaliumgehalte (oben) und Calciumgehalte (unten) bei Perkolation ohne Hemmstoffe und mit je $100 \mu\text{M}$ 2,4-D, 2,4-DNP und NEM bei pH 3 am 02.03.99. Die Säulen geben die Kationenmengen in den ersten 18 ml Perkolat wieder.

3.5 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

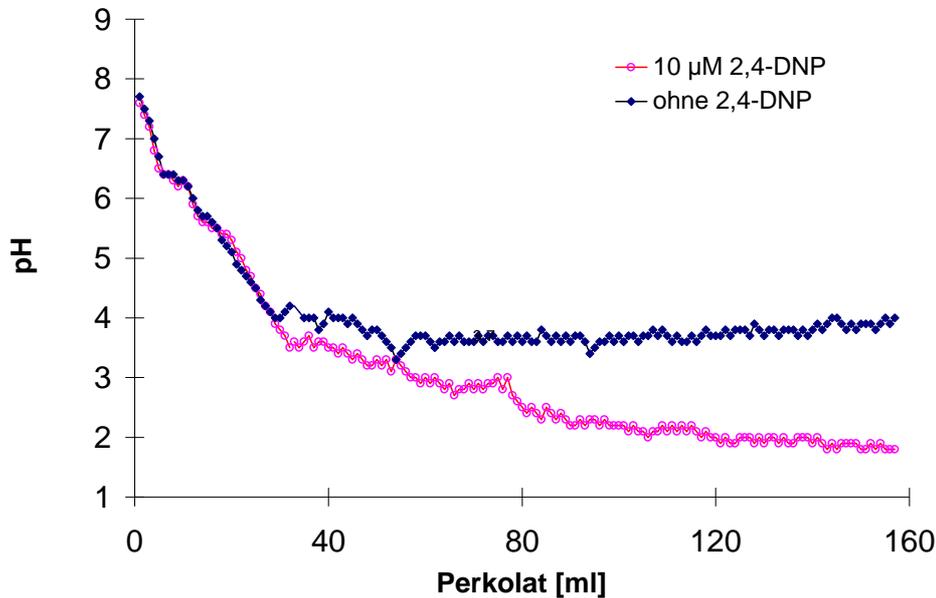


Abbildung 3.45: pH im Verlauf der Perkolation mit und ohne 10 µM 2,4-DNP bei pH 2 am 22.09.97.

Bei der Überprüfung der Ionengehalte bei einem Experiment am 02.03.99 (Abb. 3.44) mit 100 µM 2,4-D zeigte sich nach dem ersten Maximum nach 9 ml Perkolation ein erneutes Ansteigen der Ca- und in geringerem Umfang auch der K- Konzentration, die nach weiteren 9 ml Perkolation wieder stark zurückging. Der Ansatz ohne Hemmstoff (Abb. 3.44) zeigt im Vergleich dazu lediglich bei Versuchsbeginn für Calcium ein deutliches Maximum.

Der pH- Wert, der sowohl im Ansatz mit wie auch ohne 2,4-D mit pH 5.5 zu Versuchsbeginn sehr niedrig lag (ohne Abb.), stieg nach 22,5 ml Perkolation auf pH 5,9 mit und pH 6,2 ohne 2,4-D und fiel nach 250 ml Perkolation auf pH 4,8 bzw. pH 4,5 zurück. Ein Einfluß von 2,4-D auf den pH war in diesem Versuch am Ende der Winterruhe, im Gegensatz zum Mai (Abb. 3.43) somit nicht zu erkennen.

3.5.2 2,4-DNP

2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP) ist ein protonophorer Entkoppler von Oxidation und Phosphorylierung (Aloni et al. 1985). Es unterbindet die ATP-Synthese (Balke und Hodges 1979) und damit die Option einer aktiven Regulation. Die Wirkung setzt relativ schnell ein.

Bei einem Versuch am 22.09.97 (Abb. 3.45) mit und ohne 10 µM 2,4-

3.5 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

DNP und 10 mM HCl (pH 2) fiel der pH in beiden Ansätzen während der ersten 50 ml Perkolation von pH 7,5 auf pH 3,5. Danach zeigt sich im Ansatz ohne 2,4-DNP ein leichter Anstieg auf pH 4,0. Dieser pH wurde nach 250 ml Perkolation noch gehalten, während mit 2,4-D nach 150 ml Perkolation der pH schon auf etwa pH 2 gefallen war.

Von sieben Experimenten im Jahr 1999 zeigte die Ionenbilanz nach 18 ml Perkolation im Ansatz mit 100 μ M 2,4-DNP bei vier Versuchen im März (Abb. 3.44) und April für Kalium höhere Werte als im Vergleich mit dem Ansatz ohne 2,4-DNP, in den folgenden drei Versuchen bis zum August lagen die Gehalte niedriger. Der pH- Wert des Gefäßwassers konnte auch über 250 ml Perkolation auch mit 2,4-DNP stets im neutralen Bereich gehalten, einmal im August gar in den alkalischen Bereich verschoben werden. Im Ansatz mit 2,4-DNP konnte der pH bisweilen (wie am 07.04.99) länger im neutralen Bereich als ohne Hemmstoffe gehalten werden.

3.5.3 PCMB

Parachlormercuribenzoessäure (PCMB) ist ein Thiolhemmstoff, der mit -SH Gruppen Mercaptidbindungen eingeht und dadurch Proteine wie die ATPase blockiert. Das schwer wasserlösliche PCMB zeigt eine langsamere Wirkung als die übrigen Hemmstoffe. Bei einem Perkolationsexperiment bei pH 3 am 03.03.99 (Abb. 3.46) zeigte die Ionenbilanz nach 18 ml Perkolation für Kalium im Ansatz mit 100 μ M PCMB etwa die gleichen Werte wie im Ansatz ohne PCMB, für Calcium lagen sie mit PCMB etwas höher. Bei diesem Versuch lag der pH mit PCMB zu Versuchsbeginn bei pH 6,2 im Vergleich zu pH 6,0 bei der Kontrolle, nach 22,5 ml Perkolation bei pH 6,2 bzw. pH 6,3 und nach 250 ml bei pH 6,4 bzw. pH 6,1 (ohne Abb.). Ein Einfluß von PCMB auf die pH- Regulation war in diesem Versuch somit nicht zu erkennen.

3.5.4 CCCP

Carbonylcyanid-m-cyclophenylhydrazon (CCCP) ist ein protonophorer Entkoppler, der wie 2,4-DNP die Permeabilität von Membranen erhöht. Durch diesen Effekt kann die Atmung von der Phosphatkettenphosphorylierung entkoppelt werden (Aloni et al. 1986).

Ein Perkolationsexperiment bei pH 3 am 18.07.97 zeigt für den Ansatz mit 10 μ M CCCP durchweg niedrigere pH- Werte im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.48). So liegt nach 60 ml Perkolation der pH für den Ansatz mit CCCP bei pH 6,5 und für den Ansatz ohne CCCP bei pH 7,5. Bei einem Versuch mit pH 3 vom 15.09.97 (Abb. 3.47) fallen die Ergebnisse noch deutlicher aus. Mit CCCP fällt der pH nach ca. 30 ml Perkolation plötzlich von pH 6,0 auf pH 3,5. Ohne CCCP liegt der pH- Wert nach 30 ml Perkolation noch bei

3.5 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

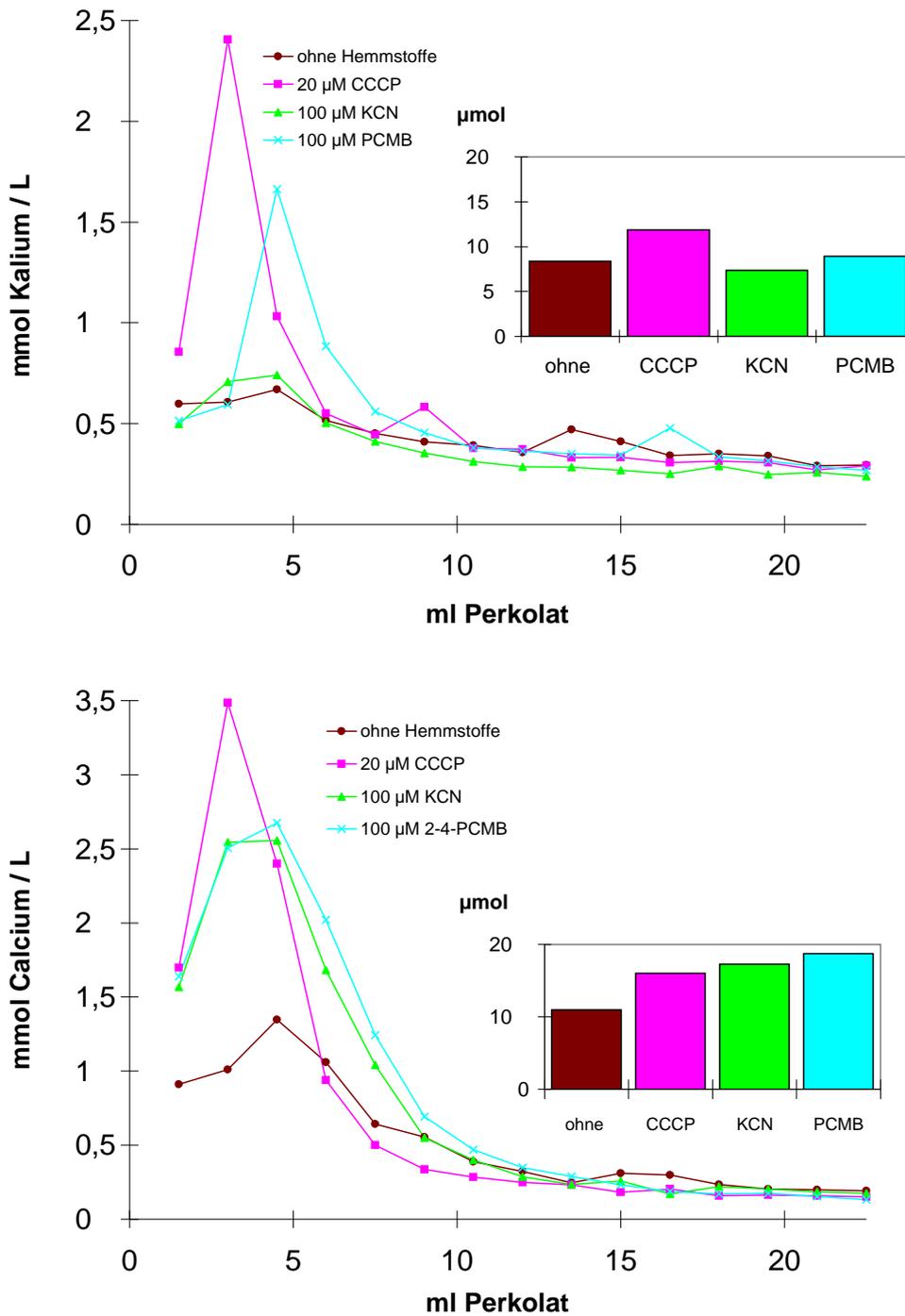


Abbildung 3.46: Kaliumgehalte (oben) und Calciumgehalte (unten) bei Perkolation ohne Hemmstoffe und mit 20 µM CCCP, 100 µM KCN und 100 µM PCMB bei pH 3 am 03.03.99. Die Säulen geben die Kationenmengen in den ersten 18 ml Perkolat wieder.

3.5 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

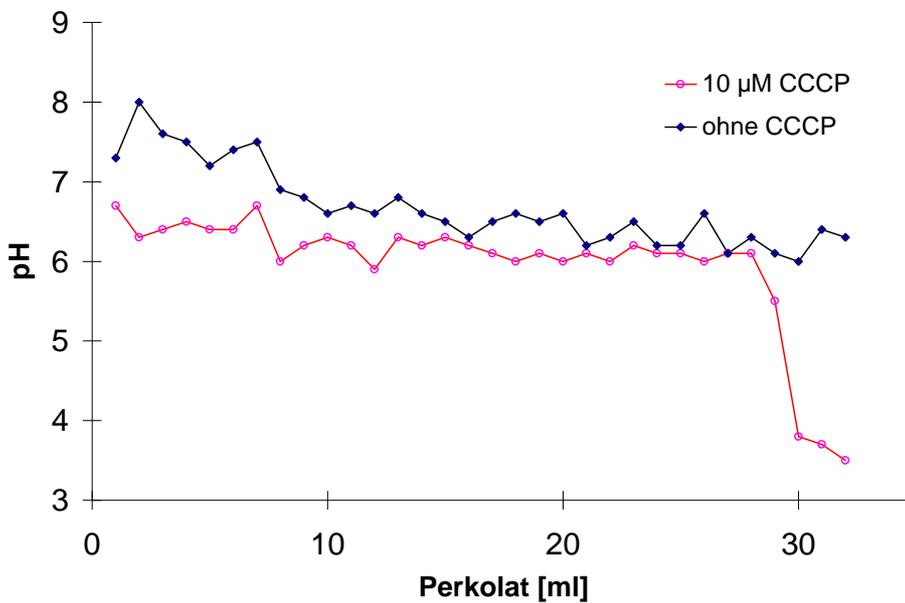
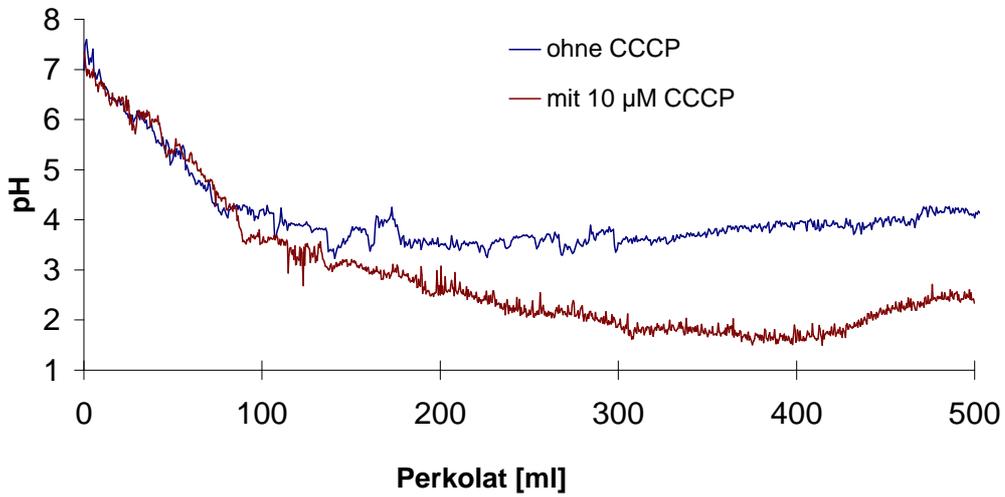


Abbildung 3.47: Perkolations mit und ohne 10 µM CCCP am 22.09.97 bei Vorlage von pH 2 (oben) und am 15.09.97 bei Vorlage von pH 3 (unten).

3.5 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

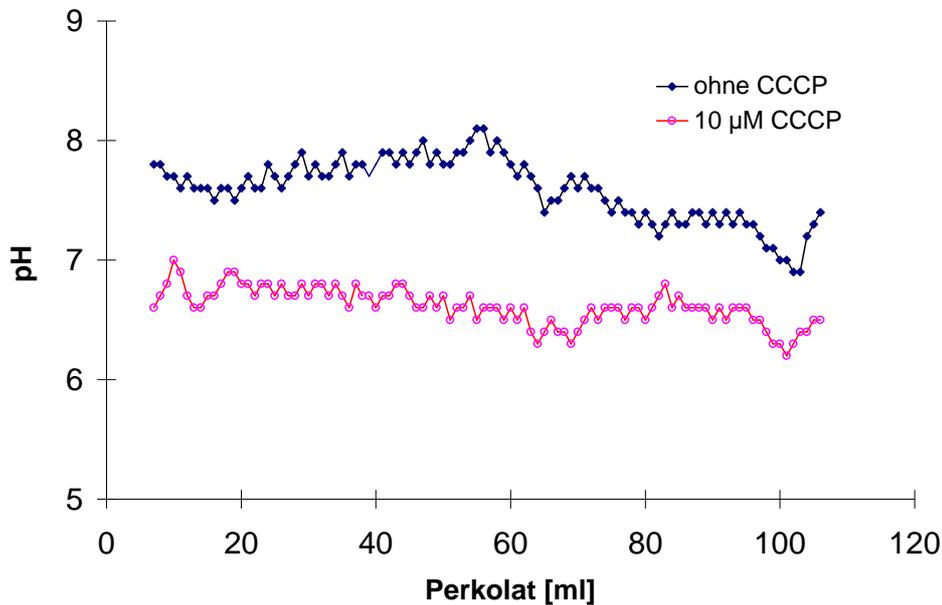


Abbildung 3.48: Verlauf des pH bei Perkolat mit und ohne 10 µM CCCP bei pH 3 am 18.07.97.

pH 6,2. Auch ein Experiment vom 22.09.97 (Abb. 3.47) zeigt eine deutliche Abnahme des pH unter dem Einfluß von CCCP. Nach 500 ml Perkolat fiel der pH von etwa pH 7,7 auf pH 2,0 mit CCCP und auf pH 4,0 ohne CCCP.

Die Ionenbilanz zeigte bei einem Experiment am 03.03.99 (Abb. 3.46) bei pH 3 nach 18 ml Perkolat für Kalium und Calcium im Ansatz mit 100 µM CCCP höhere Werte als im Ansatz ohne CCCP. Die pH- Werte beider Ansätze waren dabei mit $\text{pH } 6,0 \pm 0,2$ nahezu gleich. In diesem Versuch war ein Einfluß von CCCP auf den pH nach 18 ml Perkolat nicht zu erkennen. Die Vermutung liegt nahe, daß CCCP oft nur bei längerer Perkolat zu einer Verminderung der Fähigkeit der pH- Regulation führt.

3.5.5 NEM

N-Ethyl-Maleinimid (NEM) ist ein Thiolhemmstoff, der an -SH Gruppen von Proteinen bindet. NEM kann im Gegensatz zu PCMB schnell das Plasmamembran permeieren (Bisson 1986). Konzentrationen von 0,1 bis 1 mM NEM bei einem pH von 6 bis 7 bewirken die Modifikation der plasmamembrangebundenen ATPase (Locoro et al. 1998).

Im Versuch vom 01.10.97 wurde eine Perkolat bei pH 2 mit 10 µM

3.5 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

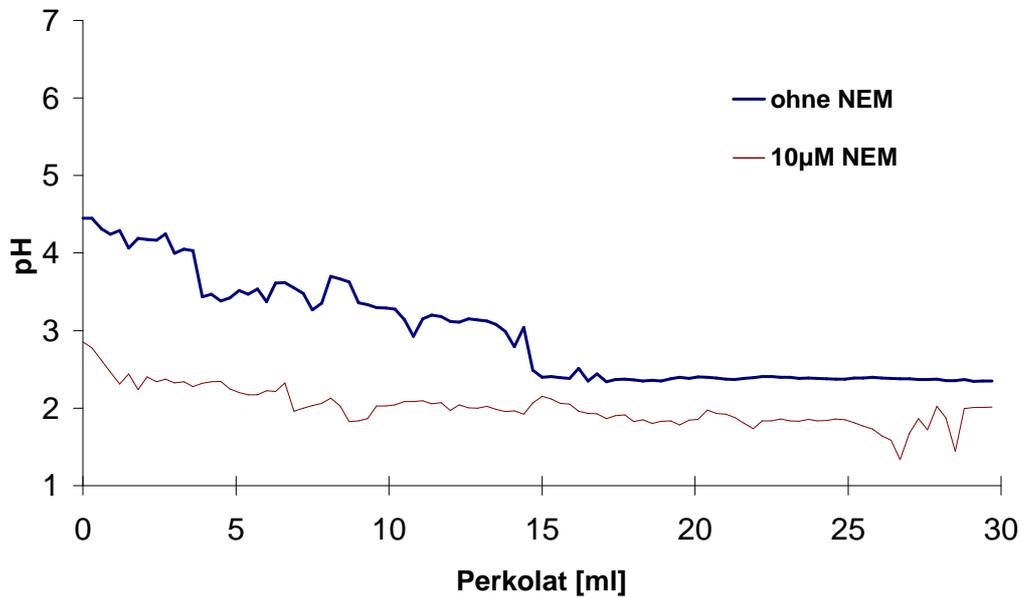
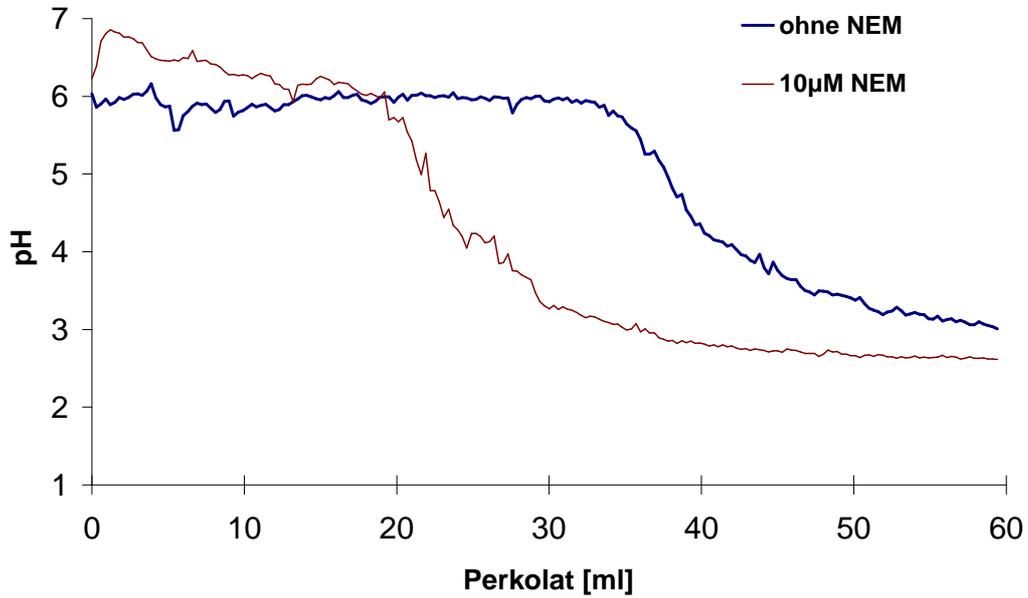


Abbildung 3.49: Verlauf des pH bei Perkolation mit und ohne 10 µM NEM bei Vorlage von pH 2 zu Versuchsbeginn am 01.10.97 (oben) und nach Wiederaufnahme der Perkolation am 02.10.97 (unten).

3.5 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

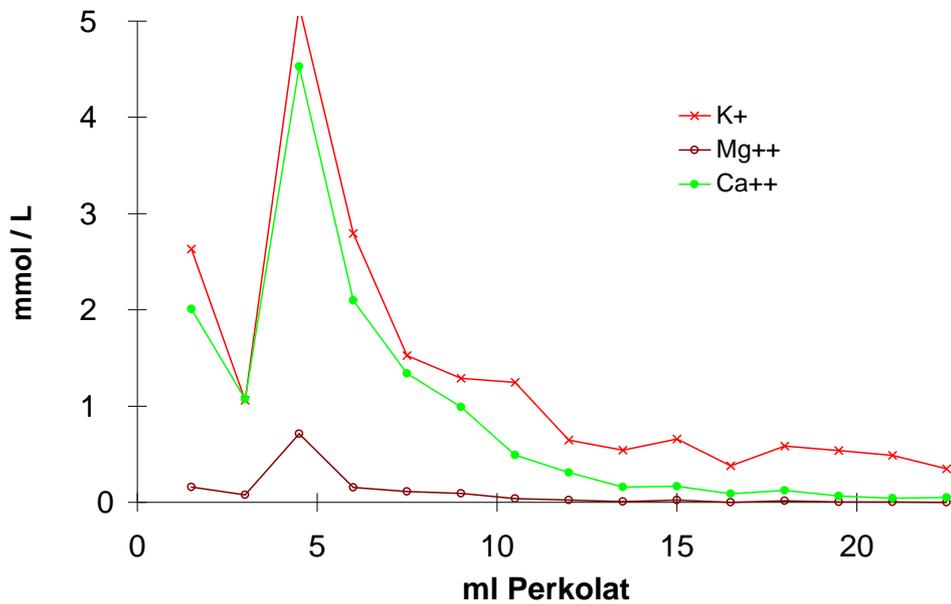
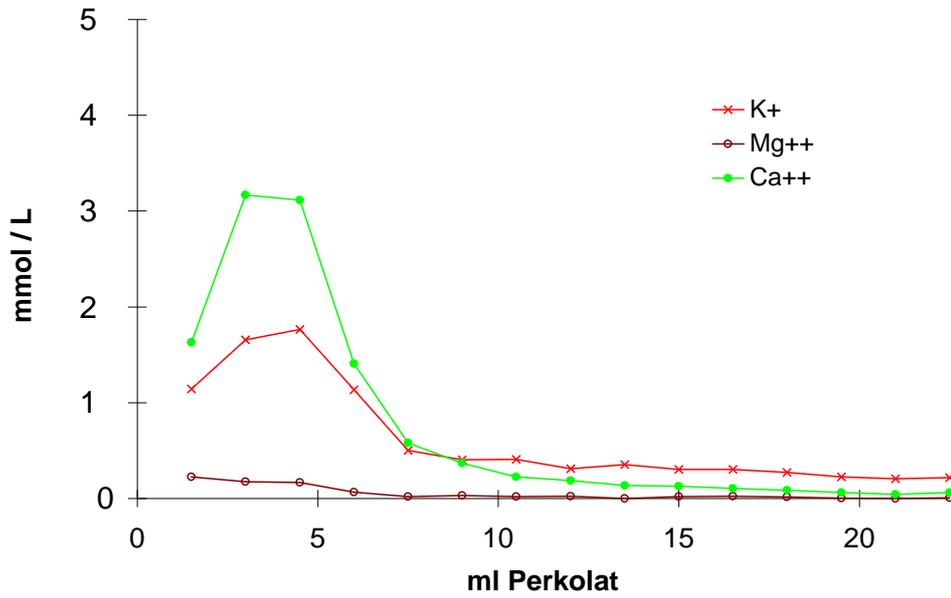


Abbildung 3.50: Verlauf der Kationenengehalte bei Perkolatation ohne (oben) und mit (unten) 100 μ M NEM bei Vorlage von pH 7 am 12.04.99.

3.5 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

NEM und bei einer Parallelen ohne NEM über 60 min durchgeführt (Abb. 3.49). Dabei fiel der pH bei der Kontrolle ohne NEM von pH 6,0 bei Versuchsbeginn auf pH 3,0 nach 60 ml Perkolation: Mit NEM fiel er jedoch deutlich rascher, ein pH von 3,0 wurde schon nach 30 ml erreicht.

Am nächsten Tag wurde nach 14 Stunden Unterbrechung die Perkolation für weitere 30 min fortgesetzt (Abb. 3.49). Nach dieser Unterbrechung lag der pH im Ansatz mit NEM nur bei pH 2,9, ohne NEM war er wieder auf einen pH von 4,4 angestiegen. Nach 30 ml Perkolation lag nun der Ansatz mit NEM bei pH 2,0 und ohne NEM bei pH 2,3.

Bei der Analyse der Ionengehalte von Perkolationsexperimenten im Jahre 1999 bei pH 7 ergaben sich für die ersten 18 ml Perkolat am 12.04 und am 21.04 höhere Werte für Kalium und Calcium im Vergleich zur Kontrolle, am 02.03 waren sie nahezu gleich. Exemplarisch ist der Versuch vom 12.04.99 in Abb. 3.50 dargestellt, der die anhaltend höheren Kationengehalte mit NEM im Perkolat erkennen läßt.

Der pH wies bei den Ansätzen mit NEM zu Versuchsbeginn sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Startwerten keine Unterschiede zu den Ansätzen ohne NEM auf. So wurden am 02.03.99 bei Versuchsbeginn, nach 22,5 ml und nach 250 ml ohne NEM jeweils Werte von pH 5,5, pH 6,2 und pH 4,5 gemessen und entsprechend mit NEM Werte von jeweils pH 6,2, pH 6,4 und pH 4,8. Am 21.04.99 wurden bei Versuchsbeginn, nach 22,5 ml und nach 250 ml ohne NEM Werte von jeweils pH 6,3, pH 6,6 und pH 7,3 gemessen und entsprechend mit NEM Werte von jeweils pH 7,0, pH 6,3 und pH 7,3. Nur bei Vorlage sehr hoher Protonenkonzentrationen zeigt sich somit eine Hemmung der pH- Regulation durch NEM.

3.5.6 KCN

Im Vergleich zu den bisher aufgeführten, eher spezifisch wirkenden Stoffwechsellinhibitoren wurde in einigen Versuchen auch KCN eingesetzt, das auf vielfältige Weise lebende Zellen schädigen kann. KCN schädigt das Cytochromsystem der aeroben Dissimilation. Zusätzlich schädigt KCN Zellmembranen. Falls die Membranen der paratrachealen Begleitzellen direkt geschädigt werden, wäre im Perkolat mit erhöhten Kaliumwerten zu rechnen.

Bei drei Experimenten im Jahr 1999 zeigte die Ionenbilanz nach 18 ml Perkolation für Kalium im Ansatz mit KCN bei zwei Versuchen tatsächlich höhere Werte als ohne KCN. Einmal ergaben sich geringfügig niedrigere Werte (Abb. 3.46). Dieses Ergebnis wurde auch für Calcium erhalten, der geringere Gehalt lag jedoch an einem anderen Tag als bei Kalium.

Bezüglich der pH- Regulation bei Vorlage von pH 3 zeigten sich mit

3.5 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

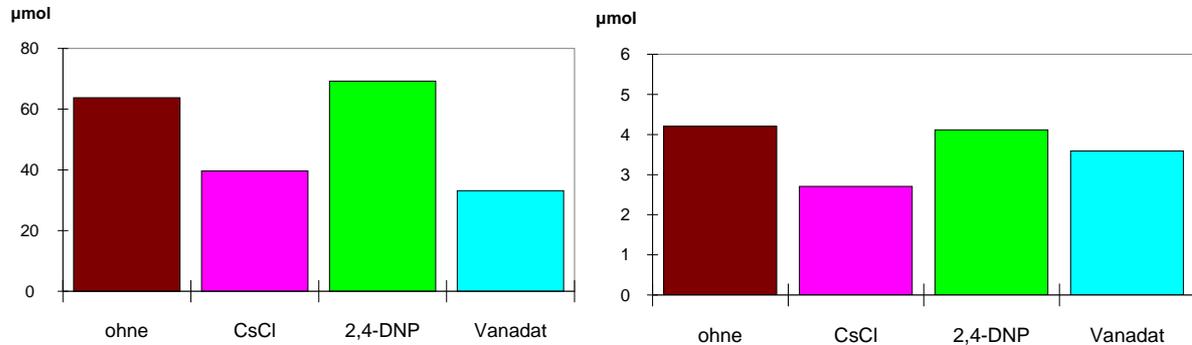


Abbildung 3.51: Kaliummengen nach 18 ml Perkolation bei pH 3 und 100 µM Kanalblockern (CsCl, Vanadat) bzw. Hemmstoffen (2,4-DNP) am 07.04.99 (links) und 14.07.99 (rechts).

und ohne KCN keine erkennbaren Unterschiede: So lag der pH bei einem Experiment am 03.03.99 nach 22,5 ml Perkolation mit KCN bei pH 6,1 und ohne KCN bei pH 6,3. Nach 250 ml Perkolation wurden entsprechend pH 6,2 und pH 6,1 erhalten. Bei einem Experiment am 21.04.99 lag der Ast zu Beginn des Versuchs bei beiden Ansätzen auf gleichem Niveau im neutralen Bereich, nach 250 ml Perkolation in beiden Ansätzen bei pH 7,3.

KCN hemmt somit auch bei langandauernder Perkolation die pH- Regulation nicht. Die mit KCN meist geringfügig höheren K- Gehalte im Perkolat deuten auf eine Freisetzung von Kalium aus lebenden Zellen hin.

3.5.7 Hemmstoffe und Kanalblocker im Vergleich

Im Vergleich zu den Blockern der Ionenkanäle, die direkt am Übergang zwischen dem apoplastischen und dem symplastischen Raum angreifen, müssen die oben genannten Stoffwechsellinhibitoren bis zu den Membranen der Zellorganellen gelangen, um dort Proteine wie z.B. die ATPase zu blockieren. Aktive Transportvorgänge können möglicherweise ungehindert stattfinden, bis der Vorrat an ATP aufgebraucht ist. Eine zeitverzögerte Wirkung der Stoffwechsellinhibitoren wäre ein Hinweis auf den beschriebenen Kausalzusammenhang.

Die Experimente vom 07.04.99 und 14.07.99 (Abb. 3.51) zeigen im Ansatz mit und ohne 2,4-DNP bei pH 3 etwa gleich hohe K- Gehalte wie im Ansatz ohne Hemmstoffe, während die Werte für CsCl und Vanadat deutlich geringer liegen als ohne Hemmstoffe und Kanalblocker. Auch die pH- Werte nach 250 ml Perkolation liegen oft höher als die pH- Werte mit Ka-

3.5 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

nablockern und der Kontrolle.

3.5.8 Zeitverzögerter Einsatz der Hemmstoffe

Durch den relativ hohen Kationengehalt im Gefäßwasser zu Beginn der Perkolatation sind Effekte von Stoffwechsellinhibitoren auf die Ionenregulation oft schwer zu erkennen. Deshalb wurde bei den folgenden Experimenten zunächst mit demineralisiertem Wasser perkoliert und später das Medium mit dem Hemmstoff vorgelegt.

In einem Experiment am 21.04.99 (Abb. 3.52) bei pH 7 wurde zunächst 22,5 ml demineralisiertes Wasser perkoliert, um das in den Gefäßen vorhandene, mit Kationen beladene Wasser auszuspülen. Anschließend wurden weitere 22,5 ml Lösung perkoliert, wobei jeweils 100 μM Lösungen von KCN, NEM und 2,4-DNP und zur Kontrolle weiter demineralisiertes Wasser appliziert wurden. Eine mögliche Änderung der Ionenabgabe sollte Auskunft über die Wirkung der eingesetzten Hemmstoffe geben. Die Ergebnisse weisen jedoch unveränderte Kationengehalte im Perkolat auf, wie der kontinuierliche Verlauf der Gehalte nach Applikation der Hemmstoffe zeigt.

3.5 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

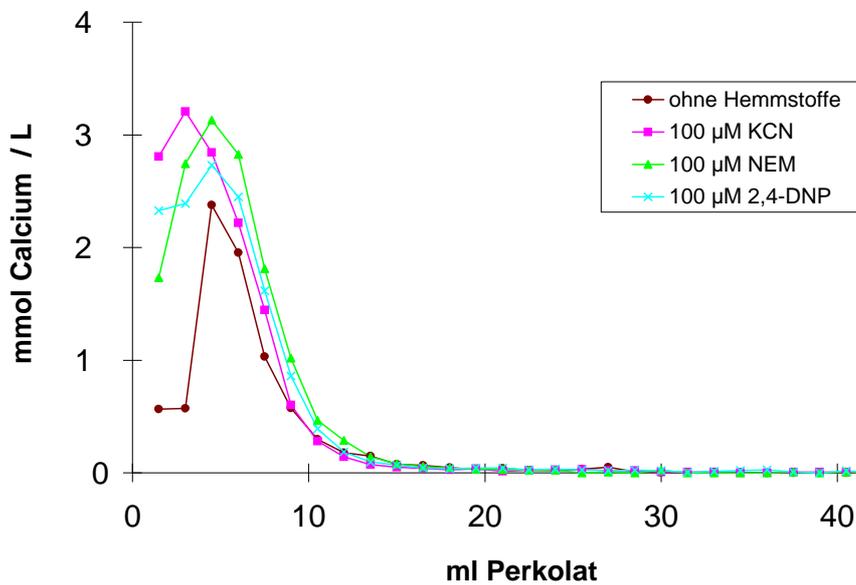
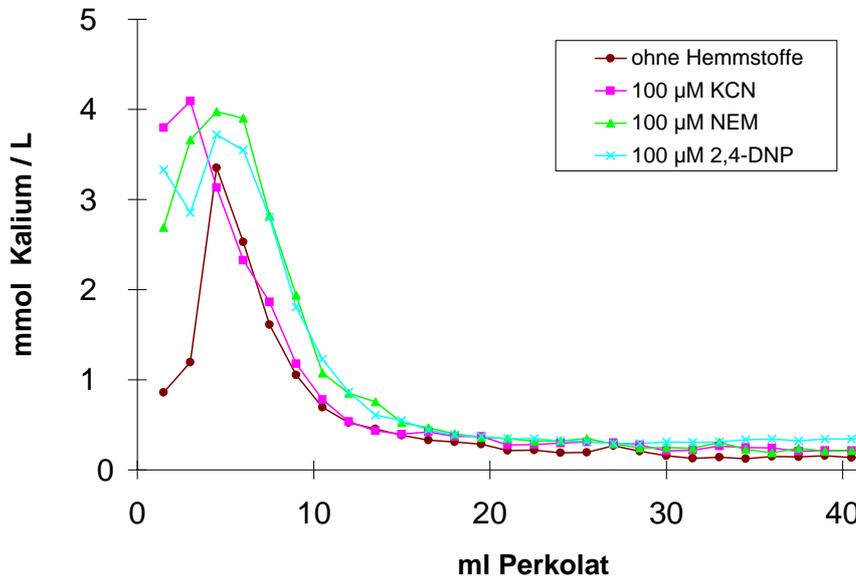


Abbildung 3.52: Kaliumgehalte (oben) und Calciumgehalte (unten) nach Perkolatation bei pH 7 am 21.04.1999. Die ersten 22,5 ml Perkolatation ohne Hemmstoffe, die folgenden 22,5 ml Perkolatation mit je 100 µM KCN, NEM, 2,4-DNP bzw. ohne Hemmstoffe.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Das Pappelholz als Untersuchungssystem

Die Wasserleitbahnen im sekundären Xylem von *Populus balsamifera* L. sind als Modellsystem für den Apoplasten der Gefäße in Laubbäumen und der Schnittstelle zwischen Symplast und Apoplast aus mehreren Gründen geeignet: Zum einen stellen die untersuchten Sprossachsenabschnitte eine bedeutsame Transportstrecke auf dem Weg von der Wurzel zu den Blättern dar.

Zum anderen stellt das Pappelholz mit ca. 150 bis 180 Gefäßen/mm² (Just 1992, Hacke 1996) eine hohe Gefäßdichte und damit einen relativ großen Apoplastenbereich für experimentelle Untersuchungen zur Verfügung, auftretende Effekte können somit deutlicher hervortreten und experimentell bestimmt werden.

Zudem sind Apoplast und Symplast histologisch relativ klar abgrenzbar und hinsichtlich ihrer Ausdehnung meßbar, was für die Bestimmung von Fluxraten und der apoplastischen Speicherkapazität eine klare Bezugsgröße liefert. Die Sprossachsen bestehen aus einem weitgehend homogenen Holzfasergewebe mit zahlreichen, darin eingebetteten mikroporen Gefäßen und einschichtigen Holzstrahlen, die in enger Verbindung mit den Gefäßen stehen (Sauter 1966a).

Ein praktischer Vorteil ist nicht zuletzt, daß anders als etwa bei krautigen Pflanzen eine Kontamination des Xylemsaftes mit Phloemexsudat oder Apoplasteninhalten des Markbereiches weitgehend eliminierbar ist, sofern nicht zu junge Sprossachsen verwendet werden.

Die Verwendung von Material, das aus einem genetisch einheitlichen Klonbestand von gleichaltrigen Bäumen eines Standortes gewonnen wurde, hält die Streubreite der physiologischen Reaktionen der Untersuchungsob-

4.2 Kritische Betrachtung der angewandten Methodik

jekte in Grenzen. Freilandversuche bieten jedoch den Vorteil einer natürlichen Umwelt, um die vielfältigen Einflüsse durch Jahreszeit und Transpirationsbedingungen untersuchen zu können.

4.2 Kritische Betrachtung der angewandten Methodik

Ziel des experimentellen Designs war es, soweit wie möglich den Xylemstrom unter natürlichen Bedingungen nachzubilden:

Zum einen sollten die Druckbedingungen im Spross und damit die Fließgeschwindigkeit im Xylem den Bedingungen in der intakten Pflanze im Freiland entsprechen. Bei eigenen Untersuchungen wurden bei dem erzeugten Druckgradienten von 0,01 MPa pro 30 cm Sprossachse Perkolationsraten von 10 bis 100 ml/h ermittelt und daraus Perkolationsgeschwindigkeiten von 0,5 m/h bis 5 m/h errechnet. Sie entspricht den Fließgeschwindigkeiten in den mikroporen Gefäßen sommergrüner zerstreutporiger Laubhölzer mit 1 bis 6 m/h (Larcher 1984). Auch aus experimentell bestimmten hydraulischen Leitfähigkeiten lassen sich Fließgeschwindigkeiten abschätzen. So bestimmte Just (1992) für *Populus balsamifera* L. eine hydraulische Leitfähigkeit von 0,03 m/h/KPa/m, woraus sich eine Fließgeschwindigkeit von 1 m/h ergibt.

Zum zweiten soll das perkolierende Medium ausreichend Kontakt mit den Zellwänden haben, um einen Stoffaustausch mit den Zellwänden zu gewährleisten. Dies ist der Fall, wenn mehr als 99% der Gefäße kürzer als 30 cm sind (Just 1992, Hacke 1996) und die gewählte Perkolationsgeschwindigkeit einen umfangreichen, den natürlichen Bedingungen entsprechenden Austausch erlaubt. Zudem wurden, wenn möglich, Zweige mit langen Jahrestrieben und seitenzweigfreien Abschnitten gewählt.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente zu gewährleisten, wurden die Proben von den unteren Zweigen und von Bäumen in der Mitte der Pflanzung genommen. Dort unterliegt die Wirkung von Sonneneinstrahlung, Wind und Frost weniger starken tageszeitlichen Schwankungen und Unterschieden zwischen einzelnen Probetagen. Bei exponierten Sprosstielen könnten abweichende Ergebnisse auftreten, so kann z.B. die Photosyntheseleistung bei Schattenblättern der Pappel deutlich geringer sein (Stettler et al. 1996).

Bei den Perkolationsexperimenten wurde darauf geachtet, möglichst keine embolierten Achsenabschnitte zu verwenden und vor allem während der Behandlung keine Embolien in den angeschnittenen Gefäßen zu erzeugen. Es wurde darauf geachtet, daß stets die Schnittstelle der geernteten Sprossachsen mit Wasser bedeckt war (siehe 2.2).

4.3 Perkolationsgeschwindigkeit

Die Durchmesser der untersuchten Gefäße können Unterschiede aufweisen, vor allem zwischen Früh- und Spätholz. So ermittelte Just (1992) für das Frühholz von *Populus balsamifera* L. einen Durchmesser von bis zu $80\mu\text{m}$ gegenüber maximal $50\mu\text{m}$ für das Spätholz. Bei gleicher perkolierter Menge könnte der Ionengehalt bei Durchfluß durch kleinere Gefäße erhöht sein, da das Verhältnis zwischen Gefäßwandfläche zu Gefäßvolumen größer ist. Dieser Faktor ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen, wenn z.B. nach Frost während der Wintermonate durch auftretende Embolien vor allem große Gefäße für die Wasserleitung ausfallen oder wenn im Frühjahr kurzfristig viele neue Gefäße im Frühholz leitfähig werden.

Die Perkolationsversuche konnten in der Regel mehrere Tage aufrecht erhalten werden, ohne bakterizide oder fungizide Zusätze verwenden zu müssen.

4.3 Perkolationsgeschwindigkeit

Bei den durchgeführten Perkolationsexperimenten wurde stets die potentielle Transportleistung der Gefäße ermittelt, nicht die tatsächliche der Freilandpflanze, die über die Spaltöffnungen den Wassertransport regulieren kann. Eine hohe Perkolationsgeschwindigkeit bedeutet also noch nicht, daß die Pappel im Freiland zu dieser Zeit tatsächlich eine hohe Perkolationsrate aufweist.

Die Versuche zeigten, daß die Perkolationsgeschwindigkeit im Winter ständig bis auf ein Minimum im Februar abnimmt. Dies ist vermutlich durch häufige Gefrier- und Auftauvorgänge und dadurch entstandene Embolien zu erklären. Noch vor der Verfügbarkeit neuer Leitelemente im Februar nahm die Perkolationsgeschwindigkeit stetig zu (Abb. 3.4). Hacke (1996) vermutet, daß sich in dieser Zeit Embolien in den Gefäßen wieder auflösen können und dadurch die Anzahl der leitenden Gefäße zunimmt. Im April und Mai können sich dann neue Leitelemente im Frühholz am Xylemtransport beteiligen, was zu einer Zunahme der Perkolationsgeschwindigkeit führt. Im Mai erreicht die Perkolationsgeschwindigkeit ein Maximum. Im Juni und Juli fällt sie wieder stark ab, hier könnten durch Trockenstress wiederum Embolien auftreten, die danach nicht immer wieder aufgelöst werden (Hacke 1996). Zudem können an heißen Tagen im Sommer die Stomata der Blätter schließen und den Wassertransport stark verlangsamen. Im August steigt die Perkolationsgeschwindigkeit wieder auf mehr als das Doppelte ihres Minimums im Juni und Juli an. Zur Zeit des Blattfalls und den ersten Nachtfrösten im Oktober fällt sie wieder stark ab. Hier spielen neben dem fehlenden Transpirationsstrom wahrscheinlich auftretende Embolien auch wieder eine Rolle.

4.4 Der pH im Gefäßwasser

Eine Vielzahl von Einflußgrößen kann den pH im Gefäßwasser bestimmen. Mit der Atmung lebender Zellen produziertes CO_2 kann in das Gefäßwasser abgegeben werden und erniedrigt so den pH. Gleichzeitig stabilisiert das im Gefäßwasser befindliche, gelöste Hydrogencarbonat jedoch als Puffer den pH (Eklund 1990). Auch organische Säuren, insbesondere Aminosäuren könnten den pH deutlich auf Werte bis pH 5 absenken. Bei *Helianthus* wurde auch Phosphat in größeren Konzentrationen gefunden (Gollan et al. 1992), das ebenso wie Carbonat als Puffer wirken kann. Zudem können Transportvorgänge in oder aus den parenchymatischen Begleitzellen den pH beeinflussen. So wurde bei *Populus balsamifera* L. ein Cotransport von H^+ und Glucose (Himpkamp 1988) in das Xylemparenchym nachgewiesen. Auch die selektive Aufnahme von Ionen durch Ionenkanäle und ein Nachfolgen der Protonen zum Ladungsausgleich wie ein Antiport von K^+ gegen H^+ oder ein Symport von Cl^- mit H^+ kann den pH-Wert im Gefäßwasser verändern. Schließlich bewirken Austauschvorgänge mit den Zellwänden eine Veränderung der Protonenkonzentration (s.u.), sowohl durch den Austausch von Kationen und Protonen an den Zellwänden als auch über den Aufbau eines Donnan-Gleichgewichtes zwischen negativ geladenen Zellwänden und dem positiv geladenen Gefäßwasser.

Der pH im Gefäßwasser liegt im Jahresverlauf bei eigenen Untersuchungen an *Populus balsamifera* L. mit pH 6,1 bis pH 7,1 für die 5 bis 7-jährigen Sprosse meist im neutralen Bereich, lediglich im April und Mai fällt der pH bis auf Werte von pH 5,7. Für die 2 bis 3-jährigen Sprosse liegt die Schwankungsbreite zwischen pH 5,1 und pH 7,7. Für *Populus canadensis* Moench *robusta* konnte Sauter (1988b) gleichfalls im Frühjahr mit pH 5,4 und Werten von pH 6,4 bis pH 7,5 im übrigen Jahr entsprechende Werte aufzeigen (siehe 3.1.1). Glavac et al. (1990 a, b) erhielten für das Gefäßwasser im Stammabschnitt von *Fagus sylvatica* L. mit pH 5,5 bis pH 6,5 deutlich niedrigere Werte sowie zwei Minima im Mai und Juli mit pH 4,5. Diese Minima des pH waren bei diesem Autor mit hohen Nitratwerten korreliert.

Interessanterweise konnten Sauter und van Cleve (1992) gleichfalls im Frühjahr im Gefäßwasser von *Populus canadensis* Moench *robusta* hohe Konzentrationen an Aminosäuren feststellen. Diese könnten zu der beobachteten Absenkung des pH-Wertes führen.

Die vorliegenden Ergebnisse an *Populus balsamifera* L. zeigen ferner ein kurzzeitiges Minimum des pH-Wertes im Oktober. In dieser Zeit finden umfangreiche Remobilisierungsvorgänge aus den Blättern statt. Verstärkte Atmungsvorgänge könnten dann den pH-Wert erniedrigen.

Tageszeitliche Schwankungen konnten bei unseren Untersuchungen nicht charakterisiert werden (Abb. 2.4). Anderson und Brodbeck (1989) ermittel-

4.5 Kationengehalt im Gefäßwasser

ten für *Vitis rotundifolia* Michx. cv. Noble mittags höhere pH- Werte als morgens oder abends.

4.5 Kationengehalt im Gefäßwasser

4.5.1 Die Zellwände als Kationenaustauscher

Die Zellwände der Gefäße bestehen zum größten Teil aus Zellulose, daneben zu einem bestimmten Anteil aus Lignin und Pektinen. Letztere bestehen aus Polysacchariden mit einem hohen Anteil an freien Carboxylgruppen, die aus den Monomeren wie der Galacturonsäure stammen. Diese freien Carboxylgruppen können je ein Proton an das wässrige Medium abgeben, sie sind dann negativ geladen. Sie können auch ein einwertiges Kation binden oder ein zweiwertiges Kation mit einer weiteren freien Carboxylgruppe als Brücke verbinden. Da der Austausch größtenteils reversibel ist, trägt die Zellwand die Funktion eines Kationenaustauschers, der je nach umgebendem flüssigem Medium Protonen gegen Kationen, umgekehrt Kationen gegen Protonen oder verschiedene Kationen gegeneinander austauschen kann.

Eine Kationenaustauschkapazität (CEC) des Xylemzylinders läßt sich z.B. mit Radioisotopen wie ^{45}Ca und ^{115}Cd experimentell bestimmen. Arbeiten von van de Geijn und Petit (1979) ergaben bei *Cyperus papyrus* sp. eine CEC von $0,6 - 1 \cdot 10^{-7} \text{ eq/cm}^2$ Gefäßwand. Die CEC ist von der Zusammensetzung der Zellwände abhängig, insbesondere vom Pektin Gehalt der Zellwände. Die CEC von Gefäßwänden kann im Herbst größer sein als im Frühjahr (Ferguson und Bollard 1976), vermutlich durch den höheren Lignin Gehalt im Herbst, der zu mehr Bindungsstellen führt. Eine Speicherung und Mobilisierung der Kationen geschieht vorwiegend durch den Austausch von Kationen mit H^+ an den Zellwänden (Grignon und Sentenac 1991).

Als Folge der negativen Ladung der Zellwand sind die Gefäße für Kationen schwerer zu passieren als für Anionen. Grignon und Sentenac (1991) zeigten mit Hilfe radioaktiver Tracer, daß bei Perkolation von Apfelsprossen mit $4 \text{ mM } ^{45}\text{CaCl}_2$ und $0,4 \text{ mM } \text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$ das Phosphat wesentlich schneller die Gefäße passiert als das Calcium. Sie schlossen daraus, daß eine Speicherung und Mobilisierung von zweiwertigen Kationen vorwiegend durch den Austausch dieser Kationen mit H^+ an den Zellwänden geschieht. Der Transport von zweiwertigem Calcium kann durch Komplexbilder, etwa organische Säuren, beschleunigt werden. So geschieht nach Bollard (1960) der Ca- Transport durch Chelatierung und Austausch an den Zellwänden und nicht durch Massenfluß. Ferguson und Bollard (1976) zeigten, daß Ca mit dem Komplexbildner EDTA schneller durch den Spross transportiert wird als ohne EDTA.

4.5 Kationengehalt im Gefäßwasser

4.5.2 Austauschvorgänge mit dem Gefäßwasser

Betrachtet man bei den Perkolationsexperimenten den Verlauf der Freisetzung der Kationen in das Gefäßwasser, so lassen sich verschiedene Vorgänge unterscheiden.

Zum einen können Kationen aus dem Gefäßwasser lediglich ausgespült werden. Von einer hohen Konzentration zu Beginn des Versuches kann diese dann etwa exponentiell abnehmen, wie der Versuch vom 27.04.99 (Abb. 3.8) für Kalium, Calcium und Magnesium zeigt.

Zum anderen kann eine kurzfristige Freisetzung von Kationen aus der Zellwand durch einen pH- oder Ionengradienten erfolgen. Ein Beispiel liefert der Versuch vom 25.02.99 für Calcium (Abb. 3.7).

Ein anderes Phänomen ist eine langanhaltende Freisetzung auf stabilem Niveau, wie sie z.B. für Kalium nachgewiesen werden konnte. Ein Transport aus lebenden Zellen durch Ionenkanäle ist hier anzunehmen. Das Experiment vom 27.04.99 (Abb. 3.8) zeigt auch nach 22,5 ml Perkolationsdauer noch einen konstant hohen K- Gehalt im Vergleich zu Ca.

Schließlich kann nach mehrstündiger Perkolationsdauer der pH im Gefäßwasser absinken und anschließend einen Konzentrationsanstieg, z.B. für Ca beobachtet werden. Hier ist ein Herauslösen von Calcium aus der Zellwand bei dem niedrigen pH wahrscheinlich. Der Versuch vom 04.07.96 (Abb. 3.14) zeigt für Calcium ein solches Ergebnis.

4.5.3 Jahrgang der Kationen im Gefäßwasser

Die Jahrgänge von Ca, Mg und K (Abb. 3.2) zeigten die gleiche Grundtendenz, jedoch im Detail Unterschiede auf: Calcium überwog vor allem deutlich in den Wintermonaten. Die Ca- Gehalte im Gefäßwasser waren bei den älteren Sprossachsen vor allem im Winter höher als bei den jüngeren. Es ist anzunehmen, daß Calcium in den Gefäßen über die Jahre hinweg akkumuliert. Kalium kann im Gegensatz zu Calcium auch über das Phloem transportiert werden: Bei dem Rücktransport aus den Blättern kann Kalium so radial aus dem Phloem in das Xylem gelangen, weshalb besonders hohe Kaliumkonzentrationen im Xylem des unteren Stammbereiches gemessen werden können (Glavac et al. 1990b). Calcium wird quantitativ vor allem als Gerüstsubstanz in den Zellwänden benötigt. Auch wenn es als Cofaktor für Enzyme unentbehrlich ist, ist es in lebenden Zellen nur in geringen Konzentrationen vorhanden. Für Kaliumgehalte lebender Zellen sind Konzentrationen von 100 bis 120 mM typisch (Straßburger 1998). Pitman (1977) bestimmte den Kaliumgehalt in Wurzelzellen zu 60 bis 100 mM.

Die hohen Konzentrationen sind notwendig, um trotz der schwachen Bindungskraft an Enzyme dennoch eine Regulation bewirken zu können. Calci-

4.5 Kationengehalt im Gefäßwasser

um und Kalium sind Antagonisten, was die osmotische Regulation betrifft. So wirkt Calcium stärker dehydratisierend als Kalium.

Schon nach dem ersten Frosteinbruch ist durch das folgende Auftauen der Gefäße und der Bildung von Gasblasen mit Embolien zu rechnen. "Große" Gefäße werden nicht mehr regeneriert und die Anzahl leitender Gefäße kann dann reduziert sein. Der Kationengehalt im Gefäßwasser ist dann eher gering, wobei besonders in älteren Sprossen Calcium überwiegt (Abb. 3.2). Während der Temperaturschwankungen im Winter können Kationen aus dem Xylem absorbiert und in lebende Zellen aufgenommen werden (Glavac et al. 1990a). Die Funktionalität von Kaliumkanälen scheint auch während der Vegetationsruhe nicht eingeschränkt zu sein (Abb. 3.34).

Zur Zeit des Blütenaustriebes Ende März und des Blattaustriebes Anfang April nimmt die Konzentration an Kationen drastisch zu (Abb. 3.2). Dies könnte zum einen daran liegen, daß durch eine umfangreiche Ionenabgabe aus den gefäßangrenzenden Xylemparenchymzellen in das Gefäßwasser während der frühjahreszeitlichen Mobilisationsphase erfolgt. Diese Auffassung wird durch die Ergebnisse von Ferguson et al. (1981, 1983) an isolierten Achsen von *Actinidia* gestützt. Die erhöhte Ionenaufnahme der Wurzel im Frühjahr könnte ein weiterer Faktor sein (Glavac et al. 1990a). Weiterhin kann die im Frühjahr beobachtete Absenkung des pH- Wertes eine Freisetzung der an den Zellwänden gebundenen Kationen bewirken. Der generell durch die negative Ladung der Zellwände erschwerte Transport von Calcium wird durch in dieser Zeit im Gefäßwasser auftretende organische Säuren besonders begünstigt. Danach setzt das Kambialwachstum ein und im April und Mai können neue Leitelemente den Wassertransport übernehmen. Aus den Resten der abgestorbenen Zellen werden vermutlich weitere Ionen verfügbar. An heißen Tagen im Sommer können die Stomata der Blätter schließen und den Wassertransport und damit den Transport von Kationen stark verlangsamen. Wie Ergebnisse aus Lagerungsexperimenten nahelegen, werden Kationen aus dem Xylem entnommen, die z.B. für das sekundäre Dickenwachstum oder für den Aufbau ruhender Knospen verwendet werden. Während sonst stets mehr positive Ladungen in das Perkolat abgegeben werden, können sich an einzelnen Tagen die Verhältnisse sogar umkehren.

Parallel zu dem oben beschriebenen Anstieg der Perkolationsgeschwindigkeit im August (Abb. 3.4) steigen die Kationengehalte, insbesondere die Calciumgehalte wieder deutlich an. Es ist denkbar, daß durch eine erhöhte Transpiration wieder mehr Kationen transportiert werden.

Der Ionengehalt wie auch die Perkolationsgeschwindigkeit, der pH im Gefäßwasser und das Regulationsvermögen von saurem Medium erreichen im Oktober ein zeitlich begrenztes Minimum. Zu dieser Zeit finden umfangreiche Remobilisierungsvorgänge von Kationen, Aminosäuren und Kohlehydraten aus den Blättern statt. Der Aufbau von Stärke im Holzparenchym

4.6 Regulation von pH und Ionen im Gefäßwasser

erreicht im September und Oktober seinen Höhepunkt (Sauter 1988a). Nach Abwurf der Blätter ist die Transpiration stark eingeschränkt, und durch die Erniedrigung des pH- Wertes zu dieser Zeit können Ionen aus der Zellwand mobilisiert und aufgenommen werden.

In verschiedenen Arbeiten sind die Jahresgänge von pH, Gehalt an Ionen, Aminosäuren und Zuckern für Laubbäume untersucht worden. So konnte Glavac et al. (1990a, b) für die Kationengehalte im Gefäßwasser frisch gefällter Buchen einen deutlichen Jahresgang aufzeigen. Für Kalium ergab sich ein lokales Maximum im April und ein deutlich höheres absolutes Maximum Anfang Oktober. Während bei den hier untersuchten Sprossachsen von *Populus balsamifera* L. die Kaliumwerte im April ein deutlich höheres Maximum aufwiesen, war Anfang Herbst für *Populus balsamifera* L. kein weiteres Maximum mehr auszumachen. Für Calcium verhält es sich umgekehrt: Während Glavac et al. (1990a) bei Buche nur ein Maximum im Frühjahr beschreibt und die Werte im Winter relativ niedrig blieben, konnten für die 5-7 jährigen Sprossachsen von *Populus balsamifera* L. von September bis Dezember deutlich erhöhte Werte für Calcium ermittelt werden. Bei den 2-3 jährigen Sprossachsen stiegen die Calciumgehalte nach einem Minimum im August wieder leicht an und fielen bis Dezember wieder. Der zweite Anstieg der Calciumgehalte fiel damit wesentlich geringer aus.

Aufschlußreich ist bei Glavac et al. (1990a) die Verteilung der Ca- Gehalte über die Länge des Stammes: Während zur Kronenspitze hin im Mai die Gehalte ihr Maximum im Jahr erreichen, liegt das Maximum im untersten Stammabschnitt im November. Bei der Interpretation der Jahresdynamik von Ionengehalten ist also stets die Lage der untersuchten Leitelemente, z.B. die Stammhöhe und das Alter der Zweige zu berücksichtigen, da sich hier eine unterschiedliche Dynamik zeigen kann. Wie unsere Ergebnisse zeigten (Abb. 2.6), bestehen zwischen direkt aufeinanderfolgenden Abschnitten eines Sprosssegmentes anscheinend keine erkennbaren Unterschiede.

Die hohe Mobilisierung von Kationen im Frühjahr geht bei *Populus* mit einer kurzzeitigen Freisetzung von Zuckern aus Stärke (Sauter 1988a) und Aminosäuren aus Speicherproteinen der protein bodies (Sauter und van Cleave 1992) einher. Im August wurde für Aminosäuren erneut eine erhöhte Freisetzung beobachtet, wenn auch auf deutlich niedrigerem Niveau.

4.6 Regulation von pH und Ionen im Gefäßwasser

Bei den Perkolationsexperimenten mit saurem Medium von pH 3 fällt die über mehrere Tage anhaltende pH- Regulation auf. Schätzt man das Regulationsvermögen der Achsenabschnitte für die Neutralisation von 1mM HCl (pH 3) aus den Angaben von van de Geijn und Petit (1979) über die CEC mit 10^{-7} eq/cm^2 Gefäßwand und der inneren Oberfläche der Gefäße der

4.6 Regulation von pH und Ionen im Gefäßwasser

Achsenabschnitte von 4700 cm^2 (siehe 2.4.4) ab, so lassen sich 4,7 l 1mM HCl neutralisieren. Bei einer Perkolationsrate von 10 bis 100 ml/h kann die Regulation etwa 2 bis 20 Tage aufrecht erhalten werden, die beobachtete mehrtägige Regulation steht mit dieser Abschätzung in Einklang.

Eine Regulation des pH konnte auch Clarkson et al. (1984) für die Zwiebelwurzel (*Allium cepa* L.) nachweisen: Bei Vorlage von Medium mit pH 3,8 bis pH 7,7 wurde der pH sofort einreguliert, nach zwei Stunden lag er zwischen pH 5,2 bis pH 6,0.

Bei unseren Experimenten (Abb. 3.17) war nach Unterbrechung der Perkolationsgar eine Überkompensation der pH-Regulation zu beobachten. Dies ist als Hinweis auf eine aktive Komponente bei der pH-Regulation zu werten.

Eine pH-Regulation von alkalischem Medium (pH 11) in den neutralen Bereich war ebenfalls möglich (Abb. 3.6). Die Pufferkapazität der Zellwände kann eine solche Regulation erklären. Da die Zellwände sowohl Protonen aufnehmen wie abgeben können, kann ein Protonenmangel durch Protonenabgabe aus den Zellwänden ebenso ausgeglichen werden wie ein Überschuß an Protonen durch Protonenaufnahme.

Bei einem Lagerungsexperiment vom (Abb. 3.18) ergibt sich eine deutliche pH-Absenkung auf pH 3. Die Abgabe von CO_2 aus Atmungsaktivitäten kann diese pH-Absenkung nur zu einem Teil erklären, da der durch gelöstes CO_2 entstehende Carbonatpuffer alleine einen deutlich höheren pH hätte. Die Abgabe organischer Säuren könnte das Phänomen erklären.

Die bei vielen Perkolationsexperimenten mit saurem Medium zu beobachtende plötzliche Abnahme des pH (Abb. 3.49) weist auf die vorhandene Pufferkapazität von Gefäßwasser und Zellwänden hin, die nach Erschöpfen der Kapazität eines Puffers zu beobachten ist. Die Pufferkapazität von Gefäßwasser ist experimentell bestimmbar. Für *Helianthus* liegt ihr Maximum bei pH 7,0 mit $0,45 \mu\text{M}$ (Gollan et al. 1992).

Vergleichende Perkolationsexperimente mit unterschiedlich sauren Medien (pH 2, pH 3, pH 5, pH 7) lassen umso höhere Kationengehalte erwarten, je niedriger der pH der perkolierten Lösung ist, wobei Calcium aus den Zellwänden freigesetzt wird und Kalium vor allem aus lebenden Zellen gegen Protonen eingetauscht wird. Bei Perkolationen mit Medium von pH 2 werden die höchsten Gehalte an Kalium und Calcium im Perkolat gefunden, was den Erwartungen entspricht (Tab. 3.2 und 3.4). Überraschend sind die höheren Gehalte bei Vorlage von pH 7 gegenüber der Vorlage von pH 3 und pH 5. Ein Cotransport von Kalium und Chlorid in die Zelle wäre eine Erklärung. Ebenso wäre denkbar, daß die Kaliumabgabe aus den lebenden Zellen über Ionenkanäle bei niedrigem pH eingeschränkt ist. Vergleicht man den Jahresgang des frisch gewonnene Gefäßwassers (Abb. 3.2) mit dem nach 22,5 ml Perkolations mit demineralisiertem Wasser gewonnenen Gefäßwassers

4.7 Ladungsbilanzen

(Abb. 3.13), so zeigt sich der Jahresgang der Kationengehalte mit einem Maximum im Frühjahr und einem Minimum im Winter noch deutlicher. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß der Ionengehalt im Gefäßwasser durch die Sprosse selbst bestimmt wird und nicht direkt durch die Ionenaufnahme der Wurzel, die Speicherung in der Wurzel oder den Stamm.

Vergleicht man den Verlauf der Kalium- und Calciumabgabe, so fällt sowohl bei pH 3 (Abb. 3.36 und 3.46) als auch bei pH 7 (Abb. 3.35 und 3.32) der Calciumgehalt meist exponentiell auf ein sehr niedriges Niveau ab, während der Kaliumgehalt zunächst ebenfalls fällt, dann jedoch auf einem konstanten Niveau verbleibt. Im Verlauf der weiteren Perkolations kann, wie am 15.07.97 nach etwa 60 ml Perkolations (Tab. 3.3), der Kaliumgehalt dann abnehmen. Möglicherweise ist dann die Kapazität der lebenden Zellen erschöpft. Im Mai und Juni sind nach 22,5 ml Perkolations die K- Gehalte sogar mehr als zehn mal so hoch wie die von Calcium. Damit kann im natürlichen System zu dieser Zeit eine starke Entnahme von Kalium aus dem Gefäßwasser gegen einen geringeren Konzentrationsgradienten als im übrigen Jahr in die parenchymatischen Begleitzellen stattfinden.

Die höheren Calciumgehalte in den älteren Sprossen sprechen für eine Zunahme des Calciumgehaltes der Gefäßwände im Laufe der Jahre. Diese Calciumreserven können durch ein deutlich saures Milieu im Gefäßwasser sowie durch Komplexbildner remobilisiert werden. Sowohl bei Medium mit pH 3 als auch bei pH 7 sind nach 22,5 ml Perkolations die Kaliumgehalte meist höher als die von Calcium (Tab. 3.1) im Gegensatz zum Versuchsbeginn, wo die Kaliumgehalte meist höher liegen. Nur den Wintermonaten überwiegt auch nach 22,5 ml Perkolations das Calcium. Dabei könnte das bis zum Winter gespeicherte Calcium wieder mobilisiert werden. Mit EDTA lassen sich mehr Calciumionen freisetzen, als stöchiometrisch aus der Menge an EDTA zu erwarten wäre (Abb. 3.19). Dabei könnte der Komplexbildner EDTA die Freisetzung von Calcium aus den Zellwänden katalysieren, d.h. ein Molekül EDTA könnte mehrere Calciumionen freisetzen.

4.7 Ladungsbilanzen

Wenn die Protonenaufnahme durch die Freisetzung von Kationen vollständig kompensiert wird, so ist eine ausgeglichene Bilanz zwischen Protonenaufnahme und Kationenabgabe in das Perkolat zu erwarten. In eigenen Experimenten wurde jedoch meist eine positive Ladungsbilanz nachgewiesen (Abb. 3.11). Betrachtet man die Zellwand nicht nur als Ionenaustauscher, sondern auch als Puffer für elektrische Ladungen, so können nicht nur Kationen gegen Protonen getauscht, sondern Kationen in das Gefäßwasser abgegeben werden, wobei die negative Ladung dann an der Zellwand verbleibt. Somit können in ein kationenarmes Milieu Kationen aus der Zellwand abgegeben

4.8 Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte

werden und umgekehrt bei hoher Beladung des Gefäßwassers mit Kationen diese von der negativ geladenen Zellwand abgefangen werden.

Gollan et al. (1992) konnte für Sprossachsen von *Helianthus* ein ausgeglichenes Verhältnis von Kationen und Anionen zeigen. Als Anionen wurden vor allem NO_3^{2-} , aber auch PO_4^{3-} , Cl^- und SO_4^{2-} nachgewiesen. In eigenen Messungen konnten Phosphat, Sulfat oder Nitrat nicht nachgewiesen werden.

4.8 Aufnahme und Freisetzung von Kationen und Regulation des pH bei Überangebot einer Ionensorte

Der folgende Teil befaßt sich mit der Aufnahme von Kationen. Unter natürlichen Bedingungen kann im Frühjahr durch Mobilisierung ein Anstieg der Ionenkonzentrationen in den Gefäßen stattfinden. Die folgenden Untersuchungen zeigen, wie der Spross darauf reagiert. Kationen können in die Zellwand eingelagert, gegen andere Kationen ausgetauscht oder auch durch Ionenkanäle in das paratracheale Parenchym aufgenommen werden. Die Untersuchungen geben auch Hinweise über die Selektivität der Aufnahme oder das Austauschverhalten bei Konkurrenz um Bindungsplätze an der Zellwand. So konnte das Aufnahmevermögen pro Zeit geprüft und quantifiziert werden. Der Einfluß der beschriebenen Aufnahmeprozesse auf den pH wurde ebenfalls erfaßt. Mit vorgelegten Kationenkonzentrationen von 5 bis 10 mM wurde der physiologische Bereich nicht verlassen.

Mit der Aufnahme von Kationen aus dem Gefäßwasser kann eine Erniedrigung des pH einhergehen, wenn Kaliumionen gegen Protonen an den Zellwänden eingetauscht werden. Bei einwertigen Ionen wie Kalium ist eine pH-Absenkung nicht (Abb. 3.21) oder nur in geringem Umfang (Abb. 3.42) zu beobachten. Bei zweiwertigen Kationen ist die Absenkung bei Medium von pH 7 deutlich, z.B. für Mg und Ca (Abb. 3.21, 3.28), aber auch für Mn (Abb. 3.28) und Ba (Abb. 3.30). Bei Vorlage von dreiwertigem La^{3+} (Abb. 3.28) war die Abnahme des pH am stärksten. Dieser Effekt kommt zum einen durch den Austausch von zwei (Mg, Ca, Ba) oder drei (La) Protonen statt einem Proton bei Kalium zustande, zum anderen kann Kalium über Ionenkanäle aufgenommen werden. Zudem können die zwei- und dreiwertigen Kationen auch festere Bindungen mit der Zellwand eingehen.

Während bei den Perkolationsexperimenten bei pH 7 sowohl am 30.06.98 mit 10 mM Na-, K- und Mg- Gluconat (Abb. 3.24 und 3.25) als auch am 18.02.99 mit 10 mM MgCl_2 , MnCl_2 und LaCl_3 (Abb. 3.26 und 3.27) und am 29.01. mit 10 mM BaCl_2 (Abb. 3.29 unten) kein Calcium aus den Zellwänden verdrängt und damit freigesetzt werden konnte, sprechen die Ergebnisse der

4.9 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

Perkolationen bei pH 3 vom 25.06.99 mit 5 mM KCl (Abb. 3.36) als auch vom mit 5 mM BaCl₂ (Abb. 3.29 oben) mit einer deutlich erhöhten Calciumabgabe während der Perkolation für eine solche Verdrängung im sauren Milieu aus den Zellwänden. Die Absenkung des pH im Frühjahr kann damit nicht nur eine Freisetzung von Ionen aus der Zellwand im Austausch gegen Protonen bewirken, sondern unterstützt mit den über die Wurzel aufgenommenen Kationen im Gefäßwasser eine Remobilisierung von Calcium aus den Zellwänden. Durch den Austausch von Mg und Ca gegen Protonen könnte anderenorts im Verlauf der Transportstecke der pH abgesenkt werden (s.o.) und eine weitere Freisetzung der Kationen aus den Zellwänden anstoßen.

Bei Versuchsansätzen mit Chloriden wurde implizit davon ausgegangen, daß Chloridionen ungehindert in den Symplasten und zurück in den Apoplasten wandern können und lediglich passiv am Ladungsausgleich beteiligt sind. Aus der Literatur (Gradmann und Buschmann 1997) sind sowohl Symporter für Protonen und Chlorid als auch Chloridkanäle bekannt. Auch kann Chlorid auf Kaliumkanäle modulierend einwirken (Tyerman et al. 1997). Bei vergleichenden Ansätzen zum einen mit Chlorid und zum anderen mit Gluconat wurde im Ansatz mit KCl stets geringfügig weniger Kalium gefunden als im Ansatz mit K- Gluconat (Abb. 3.23). Das deutet darauf hin, daß auch das Anion einen Einfluß auf die Aufnahme von Kalium hat. Durch ein mögliches passives Nachströmen von Chlorid durch Ionenkanäle könnte mehr Kalium von den Parenchymzellen aus dem Gefäßwasser aufgenommen werden. Gluconat hingegen kann die Membranen der lebenden Zellen nicht passieren. Inwiefern auch ein Kotransport von H⁺ und Cl⁻ in die Zelle wie von Sanders (1984) beschrieben eine Rolle spielt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Magnesium wird im Vergleich zu Calcium besser aufgenommen, bei Angebot als Gluconat (Abb. 3.25) tritt dieser Effekt noch deutlicher hervor als bei Angebot als Chlorid (Abb. 3.26). Mg kann aufgrund der größeren Elektronegativität fester an die Carboxylgruppen binden als Ca. Bei beiden Ansätzen wird der pH gleich stark abgesenkt (Abb. 3.21).

4.9 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

Vergleichende Experimente mit Kaliumkanalblockern (Abb. 3.31 bis 3.33) sprechen deutlich für den Eintrag von Kalium aus lebenden Zellen in die Gefäße. Die K- Kanäle dürften dabei einen entscheidenden Einfluß haben (De Boer 1999). Zum einen kann die Hemmung der Freisetzung von Kalium durch die Kanalblocker (Roberts und Tester 1997) nahezu über das gesamte Jahr gezeigt werden. Zum anderen bleibt der Kaliumgehalt bei Perkolation mit pH 3 ohne Hemmstoffe über die Dauer der Perkolation hinweg auf einem

4.9 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

Basislevel erhalten, was für eine anhaltende Freisetzung aus dem Symplasten spricht. Im Vergleich zu Kalium nimmt der Gehalt von Calcium bis auf sehr geringe Werte ab (Abb. 3.8). Nur im Winter würde der Austausch von Calcium gegen Protonen an den Zellwänden ausreichen, die beobachtete pH- Regulation von pH 3 in den neutralen Bereich zu bewirken, im übrigen Jahr wäre sie ohne K- Eintrag aus den lebenden Zellen nicht zu erklären. Im Sommer (Abb. 3.31) ist die Wirkung von Kanalblockern nicht immer sicher nachzuweisen. Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, zu klären, ob durch den hohen Gehalt an Kationen aus dem Gefäßwasser die möglicherweise vorhandene Kaliumabgabe über Ionenkanäle überdeckt wird, oder ob gegenläufige Vorgänge wie eine aktive Kaliumaufnahme etwa mittels eines Cotransportes von Kalium und Protonen die pH- regulierende Kaliumabgabe im Sommer in der Bilanz aufhebt.

Die rasche Regulation des pH - das aufgefangene Perkolat hat stets sofort bei Beginn der Perkolation schon einen neutralen pH - geht mit einem kurzzeitigen Maximum der Kaliumfreisetzung in den ersten 6 ml Perkolat einher (Abb. 3.33). Die schnelle physiologische Reaktion spricht für ein kurzfristiges Öffnen der K- Kanäle auf die pH- Erniedrigung im perkolierenden Medium hin. Sie kann in vivo das Milieu im Apoplasten der Gefäße stabil halten.

4.9.1 Blockierung der K- Abgabe aus dem Symplasten in die Gefäße

Mit Ausnahme der Sommermonate Juni bis August hat sich Cs als wirksamer Blocker der K- Abgabe in die Gefäße erwiesen (Abb. 3.31), der gut geeignet ist, die pH- Abhängigkeit der K- Kanäle und die Konzentrationsabhängigkeit der Blocker zu studieren.

Die Intensität der Hemmung durch Cs ist konzentrationsabhängig (Abb. 3.31): je höher die Konzentration an Cs, desto höher die Wahrscheinlichkeit, daß die Kanäle durch Cs blockiert sind. Es ist überraschend, daß schon eine sehr geringe Konzentration von Cs ($10 \mu\text{M}$) Hemmwirkung zeigt. Auf der anderen Seite kann die festgestellte, erhöhte Freisetzung von Kalium bei Vorlage von sehr hoher CsCl- Konzentration wie 1 mM CsCl (Abb. 3.31) durch einen anderen Effekt erfolgen: Der Austausch von Cs mit Kalium an den Zellwänden macht sich hier quantitativ bemerkbar, der hier interessierende Effekt der Hemmung der K- Abgabe vom Symplasten in das Gefäßwasser wird dadurch überdeckt. Bei Experimenten im Juli fiel auf, daß bei Zugabe von Kaliumkanalblockern die Kaliumgehalte im Perkolat höher lagen als in den Kontrollen (Abb. 3.31). Dies deutet auf eine Hemmung der Kaliumaufnahme in den Symplasten.

Ein erhöhter Ca- Eintrag aus den Gefäßwänden in das Gefäßwasser oder eine höhere Konzentration von Kationen im Gefäßwasser (wie am 22.07.99),

4.9 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

die für eine Neutralisation in der Bilanz ausgereicht hätten, waren nicht festzustellen (siehe 3.2.3). Ein aktiver H^+/K^+ - Cotransport (Maathuis und Sanders 1995, 1997) wäre eine Erklärung für das beobachtete Phänomen. Dabei könnten die Kanäle, die die Kaliumabgabe in das Gefäßwasser bewirken (KORC), dann nicht aktiv sein. Experimente sowohl bei pH 3 als auch bei pH 7 zeigten dieses Ergebnis.

Vanadat zeigt in der Hemmwirkung (Abb. 3.33) ein vergleichbares Verhalten wie Cäsium. Auch hier wurde der kurzzeitige Anstieg von Kalium zu Beginn der Perkolation unterbunden. Eine Hemmwirkung auf die K- Abgabe im August blieb ebenfalls aus (Tab. 3.8). Bei niedrigen Kaliumgehalten im Gefäßwasser (500-1000 μM , vgl. Abb. 3.33 unten) und bei niedrigem Ionengehalt in den Parenchymzellen des Pappelholzes wurde zwar ohne Kanalblocker ein kurzfristiges Maximum erreicht, im weiteren Verlauf der Perkolation jedoch ein weitgehend konstanter K- Eintrag mit und ohne Kanalblocker in die Gefäße beobachtet. Vanadat hat sich damit ebenso wie Cs als geeigneter Wirkstoff erwiesen, eine Blockierung der Kaliumkanäle aufzuzeigen. Die Intensität der Hemmung war jedoch stets geringer.

Mit 100 μM TEA konnte demgegenüber keine Hemmung der Kaliumabgabe beobachtet werden. Da TEA als Ionenblocker aus der Literatur nur in Versuchen mit höheren Konzentrationen im millimolaren Bereich bekannt ist (Bertl et al.1997), ist es nicht überraschend, daß in unseren Experimenten mit 100 μM kein Effekt beobachtet werden konnte.

4.9.2 Blockierung der Aufnahme von Kalium in den Symplasten

Bei einigen Experimenten mit Zugabe von Kalium in das Perfusionsmedium konnte die Kaliumaufnahme in die lebenden Zellen durch Cs gehemmt werden (Abb. 3.34). Ein einwärts gerichteter K- Transport durch Kaliumkanäle (KIRC) könnte dabei für die Aufnahme von Kalium verantwortlich sein (Schroeder 1988). Zu Beginn des Experimentes ist der Unterschied im K- Gehalt des Perkolates besonders deutlich zu erkennen. So wird im Ansatz ohne CsCl nach 15 ml Perkolation 2,5 mM K und im Ansatz mit CsCl nur 6,5 mM K im Perkolat nachgewiesen (Abb. 3.34), was eine starke Aufnahmehemmung belegt. Im weiteren Verlauf des Experimentes wird dann immer weniger Kalium aufgenommen. Die Hemmwirkung von CsCl zeigt sich bei Vorlage von 10 mM Kalium wesentlich deutlicher als bei 5 mM Kalium. Bei höherer Konzentration an Kalium im perkolierenden Medium werden vermutlich mehr Kationen an verschlossenen Kanälen abgewiesen als bei geringerer Konzentration.

Wie schon bei der Abgabe von Kalium in die Gefäße beobachtet (siehe 4.9.1), ist auch bei der Aufnahme von Kalium im Sommer die Wirkung von

4.9 Einfluß von Kaliumkanalblockern auf K- Kanäle und pH- Regulation

CsCl kaum nachweisbar, weder im neutralen noch im sauren Milieu (Abb. 3.35 und 3.36).

Auch Barium (Bertl et al. 1995, 1997) und in geringerem Umfang auch Natrium können die K- Aufnahme blockieren. Tyerman et al. (1997) konnten jedoch eine Aktivierung der Kaliumaufnahme durch Natrium in Wurzelzellen beobachten. Bei unseren Experimenten mit 10 mM NaCl vom 30.06.98 (Abb. 3.24) bei pH 7 wurde ein Einfluß auf die Kaliumabgabe nicht deutlich. Bei Angebot von 10 mM BaCl₂ bei einem Experiment vom 29.01.99 bei pH 3 (Abb. 3.30) zeigte sich jedoch ein Anstieg der Kaliumgehalte im Vergleich zur Kontrolle ohne Barium, bei der die Kaliumgehalte fielen. Diese Ergebnisse sprechen für eine Blockierung der Kaliumaufnahme durch Barium.

4.9.3 pH- Regulation

Durch Zugabe von CsCl zu den perkolierenden Medien konnte die pH- Regulation deutlich eingeschränkt werden (Abb. 3.37, 3.38, 3.40). Dies deutet auf eine wichtige Beteiligung der K- Kanäle an der pH- Regulation hin. Die Experimente zeigen jedoch durchgängig, daß bei verschiedenen Cs- Konzentrationen und Jahreszeiten die pH- Regulation sofort einsetzt und somit kein plötzlicher Einbruch des pH auftritt. Die Regulation kann jedoch meist über mehrere Stunden hinweg aufrecht erhalten werden, zeigt jedoch im Vergleich zur Kontrolle einen niedrigeren pH- Wert und eine verkürzte Regulationszeit. Die Fähigkeit zur pH- Regulation zeigt jahreszeitliche Unterschiede: Während sie im November sogar über 12 Stunden hinweg durch Cs praktisch nicht zu hemmen ist, zeigen dagegen die Ergebnisse im April eine sehr starke Hemmung. Der pH fällt schon bei einer niedrigen CsCl- Konzentration von 10 µM nach zwei Stunden auf Werte unter pH 4. Offensichtlich hängt das geringere Regulationsvermögen im April mit dem aktuellen physiologischen Zustand der Sprossachsen zusammen. Bei unseren Untersuchungen zeigte der pH im April und Mai die niedrigsten Werte im Gefäßwasser, er lag an einigen Tagen nur bei pH 4,5. Für den niedrigen pH könnten organische Säuren verantwortlich sein, die Kationen aus den Gefäßwänden des Pappelholzes mobilisieren. So konnte Sauter (1976) im Xylemsaft einjähriger Achsenabschnitte von *Salix caprea* L. im März 54,8 mM Aminosäuren und Amide nachweisen, davon 46,5 mM Glutamin. Schill et al. (1996) wiesen im Xylemsaft von *Acer platanoides* L. Malat in Konzentrationen von etwa 400-800 µM nach. Malat trug zu einem Abfall des pH bei. Die pH- Regulation von pH 3 auf ca. pH 6,5 war auch im Januar zu beobachten (Abb. 3.37), was dafür spricht, daß die Kaliumkanäle auch in der Vegetationsruhe funktionell bleiben. Dies deutet auch der deutliche Einfluß des CsCl auf die pH- Regulation an. Auch die Zugabe von Kalium beeinflusst den pH (Abb. 3.41 und 3.42). So fällt der pH im neutralen Milieu bei Zugabe von Kalium, wobei Cs ohne Einfluß bleibt (Abb. 3.42). Die treibende Kraft für den K- Austausch

4.10 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

im neutralen Milieu besteht wahrscheinlich nur im Konzentrationsgradienten von Kalium, nicht in der pH- Regulation. Dieser bewirkt offenbar keine pH- Absenkung. Eher macht sich hier der Eintausch von Kalium gegen Protonen oder von Calcium an der Zellwand bemerkbar. Im sauren Milieu ist hingegen nur der Einfluß von CsCl deutlich erkennbar, der von Kalium nur geringfügig (Abb. 3.42). Die Hemmung der Aufnahme von Kalium durch CsCl beeinträchtigt also die pH- Regulation. Der passive Austausch von Kalium gegen Protonen an der Zellwand tritt dabei in den Hintergrund. Vanadat behindert ebenso wie Cs die pH- Regulation. Die Experimente lassen jedoch offen, ob Vanadat oder Cs stärker zu einer pH- Absenkung führen (Abb. 3.40 und 3.41). Bei einer Unterbrechung der Perkolation reguliert der Sprossabschnitt in der Regulationspause mit vorheriger CsCl- Zugabe stärker als in der Kontrolle. Hier könnten andere, langsamer wirkende Mechanismen zum Tragen kommen, etwa ein aktiver H^+/K^+ Cotransport.

4.10 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

Der Transport von Protonen und Kationen gegen ein chemisches oder elektrisches Potential ist nur unter Aufwand von Energie zu leisten. Dieser energieabhängige Teil der Regulation wurde mit dem Einsatz von Stoffwechsellinhibitoren hier näher untersucht. Im Gegensatz zur Regulation durch Ionenkanäle erfolgt die Wirkung der Stoffwechsellinhibitoren oft erst einige Zeit nach der Applikation, da gespeicherte Energie in Form von ATP zunächst verbraucht wird, ehe die Hemmwirkung einsetzt.

Unterschiede zwischen den Hemmstoffen in der Hemmwirkung kommen durch die unterschiedliche Zeitdauer zustande, die der Stoff braucht, um zum Wirkort zu gelangen, etwa um die Zellmembran zu passieren. Dabei ist beim Einsatz von 2,4-DNP, CCCP und NEM eine schnellere Wirkung zu erwarten als beim Einsatz von PCMB.

4.10.1 2,4-D

Bei den meisten Perkolationsexperimenten mit dem Herbizid 2,4-D zeigt sich nach 22,5 ml Perkolation weder in der pH- Regulation noch in der Kationenkonzentration (Abb. 3.44) ein Unterschied zur Kontrolle. Nur im Mai nach lang andauernder Perkolation (100 ml) läßt sich bei einer Konzentration von 100 μ M 2,4-D eine geringere pH- Regulation beobachten als ohne 2,4-D (Abb. 3.43).

Da 2,4-D auf vielfältige Weise Stoffwechselaktivitäten der Zelle hemmt (Fellenberg 1981), läßt das Ergebnis den Schluß zu, daß die Protonenauf-

4.10 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

nahme zumindest zu einem Teil durch einen aktiven Vorgang geleistet wird. Die verzögerte Wirkung spricht dafür, daß zunächst verfügbares ATP in der Zelle aufgebraucht wird.

4.10.2 2,4-DNP

2,4-DNP ist ein protonophorer Entkoppler von Oxidation und Phosphorylierung (Aloni et al. 1986), es unterbindet die ATP-Synthese (Balke und Hodges 1979) und kann durch Erhöhung der Membranpermeabilität einen erhöhten K^+ - Flux bewirken (Jackson 1982). Damit wird zum einen ein aktiver Ionentransport gehemmt, zum anderen kann Kalium in Richtung des Konzentrationsgradienten aus den Parenchymzellen in das Gefäßwasser gelangen. Letztgenannter Effekt kann relativ schnell wirken und somit die erhöhten Kaliumkonzentrationen im Gefäßwasser bei den Versuchen mit 2,4-DNP erklären. So konnte bei mehreren Versuchen von März bis August bei Zugabe von $100 \mu\text{M}$ 2,4-DNP ein höherer Kaliumgehalt ermittelt werden als ohne 2,4-DNP (Abb. 3.44 und 3.51). Zudem zeigte sich im September bei Zusatz von $10 \mu\text{M}$ 2,4-DNP auch eine Einschränkung der pH- Regulation (Abb. 3.45).

4.10.3 PCMB

PCMB ist ein Thiolhemmstoff, der mit -SH Gruppen Merkaptidbindungen eingeht und dadurch Proteine wie die plasmalemmagebundene H^+ -ATPase blockiert (Qian 1993). Sauter (1980, 1982) konnte zeigen, daß bei *Salix* nach 48 h Inkubation mit PCMB die Permeation von Saccharose in die Gefäße durch PCMB behindert wurde.

Bei unseren Experimenten konnte keine Wirkung beim Einsatz von $100 \mu\text{M}$ PCMB nachgewiesen werden. So zeigt ein Experiment im März (Abb. 3.46) etwa die gleichen Kaliumgehalte mit und ohne PCMB, auch der pH-Wert wird gleich gut einreguliert. Aufgrund der schweren Löslichkeit des PCMB ist es möglich, daß dieser Hemmstoff die Wirkungsstelle im Zeitraum des Experimentes nicht erreicht hat.

4.10.4 CCCP

CCCP ist ein protonophorer Entkoppler, der wie 2,4-DNP die Permeabilität von Membranen erhöht. Durch diesen Effekt kann auch die Atmung von der Substratkettenphosphorylierung entkoppelt werden (Aloni et al. 1986). Formard et al. (1995) wiesen bei Perkolationsexperimenten mit *Robinia pseudoacacia* L. bei Zusatz von $100 \mu\text{M}$ CCCP eine Anhebung des pH von April bis Juni um ΔpH 0.4, von Juli bis August um ΔpH 0,25 und von November

4.10 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

bis Februar keine Anhebung nach. Diese Autoren konnten somit während der Vegetationsperiode eine Verminderung der pH- Regulation durch Zusatz von CCCP feststellen.

Auch bei unseren Versuchen konnte im September ein deutlich schnelleres Absinken des pH bei Zugabe von $10\mu\text{M}$ CCCP im Vergleich zur Kontrolle und somit eine Hemmung der pH- Regulation nach ca. 30 ml bzw. 100 ml (Abb. 3.47) nachgewiesen werden. Im März konnte zwar nach 22,5 ml Perkolat kein Unterschied im pH mit und ohne CCCP nachgewiesen werden, jedoch trat mit CCCP mehr Kalium im Gefäßwasser auf (Abb. 3.46).

Die erhöhten Kaliumwerte lassen auf eine Erhöhung der Permeabilität der Zellmembranen durch CCCP und somit auf einen Ausstrom von Kalium aus der Zelle schließen. Die später nachlassende pH- Regulation hingegen könnte auf eine Blockierung der mitochondrialen H^+ -ATPase zurückzuführen sein. Durch einen somit verminderten ATP- Level in der Zelle könnten aktive pH- Regulationsmechanismen wie die plasmamembrangebundene H^+ -ATPase herabgesetzt werden.

4.10.5 NEM

NEM ist ein Thiolhemmstoff, der an -SH Gruppen von Proteinen bindet. Im Gegensatz zu PCMBs kann NEM das Plasmalemma schnell permeieren (Bisson 1986). Konzentrationen von 0,1 mM bis 1 mM NEM können bei einem pH- Wert von pH 6 bis pH 7 die Modifikation der plasmamembrangebundenen ATPase bewirken (Locoro et al. 1998). Die erhöhte Kaliumkonzentration im Gefäßwasser unter dem Einfluß von NEM in den Versuchen vom April bei pH 7 (Abb. 3.50) ist ein Hinweis auf eine Hemmung der aktiven Aufnahme von Kalium in die Parenchymzellen. Im März konnte bei pH 3 dagegen noch keine Wirkung (Abb. 3.44) nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß erst im April zur Zeit des Knospentreibens ein Kaliumaufnahmesystem aktiv ist. Bei einem Experiment im Oktober bei pH 2 (Abb. 3.49) zeigte sich nach ca. 25 ml Perkolat im Ansatz mit 10 mM NEM eine schnellere Abnahme des pH- Wertes als ohne. Hierbei könnte wie bei Locoro et al. (1998) durch NEM die plasmamembrangebundene ATPase gehemmt worden sein.

4.10.6 KCN

Zum Vergleich zu eher spezifisch wirkenden Stoffwechsellinhibitoren wurde auch KCN eingesetzt. KCN schädigt das Cytochromsystem bei der aeroben Dissimilation (Mohr und Schopfer 1999). Zusätzlich schädigt KCN Zellmembranen (Willenbrink 1980). Da im Perkolat bei Einsatz von $100\mu\text{M}$ KCN keine erhöhten Kaliumwerte auftraten (Abb. 3.46), trat diese Schädigung

4.10 Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf pH und Kationenfreisetzung

bei der eingesetzten Konzentration vermutlich nicht ein.

4.10.7 Zeitverzögerter Einsatz der Hemmstoffe

Bei einigen Experimenten wurde zunächst mit demineralisiertem Wasser perkoliert und später das Medium mit dem Hemmstoff (je 100 μM 2,4-DNP, NEM und KCN) bei pH 7 vorgelegt. Die Ergebnisse (Abb. 3.52) wiesen jedoch unveränderte Kationengehalte im Perkolat auf, wie der kontinuierliche Verlauf der Gehalte nach Applikation der Hemmstoffe nach 22,5 ml Perkolation zeigt. Bei pH 7 fehlt natürlich für einen Protonentransport ein Gradient. Warum jedoch NEM nicht durch Erhöhung der Membranpermeabilität einen auswärtsgerichteten Kaliumtransport begünstigt, bedarf weiterer Klärung. Locoro et al. (1998) konnte eine Hemmung der H^+ -ATPase durch NEM bei pH 7,2 zeigen.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Durch Perkolationsexperimente an Sprossachsen von Pappeln konnten aufschlußreiche Einblicke in die pH-Regulation im Apoplasten, im vorliegenden Fall in den Wasserleitbahnen, sowie in die umfangreichen Speicherungs- und Austauschvorgänge entlang der Gefäßbahnen gewonnen werden. Der Einsatz von Kaliumkanalblockern und Hemmstoffen zeigte, daß neben umfangreichen Ionenaustauschvorgängen an den Zellwänden auch metabolisch kontrollierte Vorgänge durch lebende, die Gefäße begleitende Xylemparenchymzellen beteiligt sind.

- Die Regulation des pH erfolgt bei Vorlage von Medien mit unterschiedlichem pH von pH 2 bis pH 7 in den Bereich von pH 6 bis pH 7 außerordentlich rasch und effektiv. Die Regulation kann mehrere Stunden oder gar Tage aufrecht erhalten werden.
- Die Gehalte an Kationen (K, Ca, Mg) erreichen im Frühjahr ein Maximum. Zu dieser Zeit ist der pH im Gefäßwasser deutlich abgesenkt. An der Freisetzung sind sowohl passive Vorgänge wie das Herauslösen von gespeicherten Ionen aus den Zellwänden als auch eine aktive Abgabe von Ionen aus den Xylemparenchymzellen beteiligt.
- Die Calciumgehalte liegen besonders im Winter bei den 5-7 jährigen Sprossen höher als bei den 2-3 jährigen. Calcium kann somit in den Gefäßwänden gespeichert und ein mögliches Überangebot deponiert werden.
- Vergleicht man die Menge der neutralisierten Protonen mit der Menge der in das Gefäßwasser abgegebenen Kationen, so überwiegen mit Ausnahme einer Periode im Sommer die Kationen. Es bleibt offen, ob der Überschuß an positiven Ladungen durch Anionen organischer Säuren, den Carbonatpuffer im Gefäßwasser oder durch die Pufferkapazität der Zellwände reguliert wird.

5. Zusammenfassung

- Während bei der Perkolation mit Vorlage bei pH 3 der Calciumgehalt relativ schnell abfällt, bleibt die Abgabe von Kalium über Stunden aktiv. Dies spricht für eine Abgabe von Kalium aus den lebenden gefäßbegleitenden Zellen, während Calcium vor allem aus den Gefäßwänden freigesetzt wird.
- Die Kaliumabgabe in das Gefäßwasser bei Vorlage von neutralem Medium liegt in der Größenordnung von 13 bis 183 pmol/cm²/min.
- Der Jahresverlauf der Kationen im Gefäßwasser frisch geschnittener Sprosse korreliert mit dem Jahresverlauf der Kationen im Perkolat nach längerer Perkolation. Die Sprossachsen bestimmen somit die Zusammensetzung der Kationen des Gefäßwassers.
- Bei Angebot einer hohen Konzentration von Kationen in der Perkolutionslösung werden die angebotenen Ionen in unterschiedlichem Maße aufgenommen. Magnesium wird im Vergleich zu Kalium und Natrium stark aufgenommen, Calcium nur in geringem Umfang.
- Eine deutliche Hemmung der Kaliumabgabe in das Gefäßwasser durch Cäsium im Winter spricht dafür, daß die Kaliumkanäle auch während der Vegetationsruhe funktionell bleiben.
- In unseren Perkulationsversuchen konnten Cäsium und Vanadat als Kaliumkanalblocker sowohl den zelleinwärts gerichteten wie den aus den Parenchymzellen in den Apoplasten gerichteten Transport von Kalium unterbinden.
- Inhibitoren des Zellstoffwechsels, insbesondere der ATP- Synthese, zeigen meist nur unter drastischen pH- Bedingungen und nach einer Einwirkzeit im Stundenbereich eine Verminderung der pH- Regulation. Wahrscheinlich ist bei 2,4-DNP eine zusätzlich auftretende Erhöhung der Membranpermeabilität für Kalium für die festgestellte raschere Wirkung verantwortlich.

Kapitel 6

Literatur

Aloni B, Wyse RE, Griffith S (1986)

Sucrose transport and phloem unloading in stem of *Vicia faba*: possible involvement of a sucrose carrier and osmotic regulation. *Plant Physiology* 81:482-486

Andersen P, Brodbeck B (1989)

Diurnal and temporal changes in the chemical profile of xylem exudate from *vitis rotundifolia*. *Physiologia Plantarum* 75:63-70

Anderson JA, Huprikar SS, Kochian LV, Lucas WJ, Gaber RF (1992)

Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 89:3736-3740

Balke NE, Hodges TK (1979)

Inhibition of adenosine triphosphate activity of the plasma membrane of the plasma membrane fraction of oat roots by diethylstilbestrol. *Plant Physiology* 63:48-52

Bertl A, Anderson JA, Slayman CK, Gaber RF (1995)

Use of *Saccharomyces cerevisiae* for patch-clamp analysis of heterologous membrane proteins: characterization of KAT1, an inward-rectifying K⁺ channel from *Arabidopsis thaliana*, and comparison with endogenous yeast channels and carriers. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 92:2701-2705

Bertl A, Reid JD, Sentenac H, Slayman CL (1997)

Functional comparison of plant inward-rectifier channels expressed in yeast. *Journal of Experimental Botany* 48:405-413

6.Literatur

van Bel AJE (1974a)

The absorption of L- α -alanine and L- α -amino isobutyric acid during their movement through the xylem vessels of tomato stem segments. *Acta botanica Neerl.* 23:305-313

van Bel AJE (1974b)

Different rates translocation of ^{14}C -L-alanine and tritiated water in the xylem vessels of tomato plants. *Acta botanica Neerl.* 23:715-722

Bisson MA, (1986)

Inhibitors of proton pumping. Effect on passive proton transport. *Plant Physiology* 81:55-59

de Boer AH (1999)

Potassium translocation into the root xylem. *Plant Biology* 1:36-45

de Boer AH, Wegner LH (1997)

Regulatory mechanisms of ion channels in xylem parenchyma cells. *Journal of Experimental Botany* 48:441-449

Bollard EG (1960)

Transport in the xylem. *Annual Revue of Plant Physiology* 4:141-165

Braun Y, Hassidim M, Lerner HR, Reinhold L (1988)

Evidence for a Na^+/H^+ antiporter in membrane vesicles isolated from roots in the halophyte *Atriplex nummularia*. *Plant Physiology* 87: 104-108

Cheffings CM, Pantoja O, Ashcroft FM, Smith JAC (1997)

Malat transport in vacuolar ion channels in CAM plants. *Journal of Experimental Botany* 48:623-631

Clarkson DT, Williams L, Hanson JB (1984)

Perfusion of onion root vessels: a method and some evidence of control of the pH of the xylem sap. *Planta* 162: 361-369

Eklund L (1990)

Endogenous levels of oxygen, carbon dioxide and ethylen in stems of Norway spruce trees during one growing season. *Trees* 4:150-154

Elle D, Sauter JJ (2000)

Seasonal changes of activity of a starch granule bound endoamylase and of a starch phosphorylase in poplar wood (*Populus x canadensis* Moench 'robusta') and their possible regulation by temperature and phytohormones. *Journal of plant physiology* 156:731-740

Fellenberg G (1981)

Pflanzenwachstum. UTB, Fischer Verlag, Stuttgart.

Ferguson IB, Bollard EG (1976)

The movement of calcium in woody stems. *Annals of Botany* 40:1057-1065

6.Literatur

Ferguson AR, Eiseman JA, Dale JR (1981)

Xylem sap from *Actinidia chinensis*: Gradients in sap composition. *Annals of Botany* 48:75-80

Ferguson AR, Eiseman JA, Leonard JA (1983)

Xylem sap from *Actinidia chinensis*: Seasonal changes in sap composition. *Annals of Botany* 51:823-833

Findlay GP, Tyerman SD, Garril A, Skaerret M (1994)

Pump and K⁺ inward rectifiers in the plasmalemma of wheat root protoplasts. *Journal of membrane biology* 70:157-164

Fromard L, Babin V, Fleurat-Lessard P, Fromont JC, Serrano R, Bonnemain JL (1995)

Control of vascular sap pH by the vessel-associated cells in woody species. *Plant Physiology* 108:1-6

Geitmann A, Cresti M (1997)

Ca²⁺ channels control the rapid expansions in pulsating growth of *Petunia hybrida* pollen tubes. *Journal of Plant Physiology* 152:439-447

van de Geijn SC, Petit CM (1979)

Transport of Divalent Cations. Cation exchange capacity of intact xylem vessels. *Plant Physiology* 64:954-958

Giromini L, Camattari G, Cerana R, Colombo R (1997)

Effect of apoplastic and cytoplasmic pH on inward and outward rectifying plasma membrane K⁺ channels of *Arabidopsis thaliana* cultured cells. *Journal of Plant Physiology* 151:682-688

Glavac V, Koenies H, Ebben U (1990a)

Seasonal variation of calcium, magnesium, potassium, and manganese contents in xylem sap of beech (*Fagus sylvatica* L.) in a 35-year-old limestone beech forest stand. *Trees* 4: 75-80

Glavac V, Koenies H, Ebben U (1990b)

Seasonal variation of calcium, magnesium, potassium, and manganese contents in xylem sap of beech (*Fagus sylvatica* L.) in a 42-year-old beech forest stand. *New Phytology* 116:47-54

Gollan T, Schurr U, Schulze ED (1992)

Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus* L. The concentration of cations, anions, amino acids in, and pH of the xylem sap. *Plant, Cell and Environment* 15:551-559

Gradmann D, Buschmann P (1997)

Oscillatory interactions between voltage gated electroenzymes. *Journal of Experimental Botany* 48:399-404

6. Literatur

Grignon C, Sentenac H (1991)

pH and ionic conditions in the apoplast. Annual Revue of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42:103-128

Hacke U (1996)

Untersuchungen über das Auftreten von Xylemcavitationen in Holzgewächsen in Relation zu Wasserpotential, Xylemstruktur, stomatärer Leitfähigkeit und Standort. Dissertation, Botanisches Institut, Christian-Albrechts-Universität, Kiel

Hansen UP, Keunecke M, Blunck R (1996)

Gating and permeation models of plant channels. Journal of Experimental Botany 48:365-382

Hedrich R, Becker D (1994)

Green circuits - the potential of plant specific ion channels. Plant Molecular Biology 26:1637-1650

Hedrich R, Moran O, Conti F, Busch H, Becker D, Gambale F, Dreyer I, Küch A, Neuwinger K, Palme K (1995)

Inward rectifier potassium channels in plants differ from their animal counterparts in response to voltage and channel modulators. European Biophysical Journal 24:107-115

Hille B (1992)

Ionic channels of excitable membranes. Sutherland, MA:Sinauer Associates Inc.

Himpkamp J (1988)

Nachweis und Charakterisierung eines H⁺/Glucose- Cotransportsystems in den Holzstrahlzellen von *Populus balsamifera* L. und seine jahreszeitliche Veränderung. Dissertation, Botanisches Institut, Christian-Albrechts-Universität, Kiel

Hoth S, Dreyer I, Hedrich R (1997)

Mutational analysis of functional domains within plant K⁺ uptake channels. Journal of Experimental Botany 48:415-420

Jackson PC (1982)

Differences between effects of undissociated and anionic 2,4-Dinitrophenol on permeability of barley roots. Plant Physiology 70:1373-1379

Just J (1992)

Anatomische und hydrophysiologische Untersuchungen zur Funktion der Wasserleitsysteme bei heimischen Laubbäumen und ihr Verhalten bei verschiedenen Stressbelastungen. Dissertation, Botanisches Institut, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

6. Literatur

Kelly WB, Esser JE, Schroeder JI (1995)

Effects of cytosolic calcium and limited, possible dual, effects of G protein modulators on guard cell inward potassium channels. *The Plant Journal* 8:479-489

Kozłowski TT, Keller T (1966)

Food relations of woody plants. *Botanical Review* 32:293-382

Larcher W (1984)

Ökologie der Pflanzen, 4. Auflage. Ulmer, Stuttgart

Läuchli A, Spurr AR, Epstein E (1971)

Lateral transport of ions into the xylem of corn roots. *Plant Physiology* 48:118-124

Locoro B, Papini R, De Michelis MI (1998)

N-Ethylmaleimide modifies the conformation of the plasma membrane H⁺-ATPase, strengthening the inhibitory action of the C-terminal domain. *Plant Biology* 1:192-197

Maathuis FJM, Sanders D (1995)

Contrasting roles in ion transport of two K⁺ channel types in root cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 197:456-464

Maathuis FJM, Sanders D (1997)

Regulation of K⁺ absorption in plant root cells by external K⁺: interplay of different plasma membrane K⁺ transporters. *Journal of Experimental Botany* 48:451-458

Mc Culloch SR, Laver DR, Walker NA (1997)

Anion channel activity in the chara plasma membrane: co-operative subunit phenomena and a model. *Journal of Experimental Botany* 48:383-397

Mohr H, Schopfer P, Brennike A (1999)

Pflanzenphysiologie, 5. Auflage. Springer Berlin

Müller-Röber BJ, Ellenberg N, Provart L, Willmitzer H, Busch D, Becker D, Dietrich P, Hoth S, Hedrich R (1995)

Cloning and electrophysical analysis of KST1, an inward rectifying K⁺-channel expressed in potato guard cells. *EMBO Journal* 14:2049-2416

Nelson EA, Dickson RE (1981)

Accumulation of food reserves in cottonwood stems during dormancy induction. *Canadian Journal of Forest Research* 11:145-154

Pitman MG (1977)

Ion transport into the xylem. *Annual Review of Plant Physiology* 28:71-88

Plieth C, Sattelmacher B, Hansen UP (1997)

Cytoplasmic Ca²⁺-H⁺-exchange buffers in green algae. *Protoplasma* 198:107-124

6. Literatur

Qian YC (1993)

Regulation of rose cell plasmalemma ATPase activity by glutathione. *Plant Physiology and Biochemistry* 31:901-909

Renault S, Despeghel-Caussin C, Bonnemain JL, Delrot S (1989)

The proton electrochemical transmembrane gradients generated by the transfer cells of the haustorium of *Polytrichum formosum* and their use in the uptake of amino acids.

Roberts SK, Tester M (1997)

A patch clamp study of Na⁺ transport in maize roots. *Journal of Experimental Botany* 48:431-440

Römheld V, Müller C, Marschner M (1984)

Localization and capacity of proton pumps in roots of intact plants. *Plant Physiology* 76:603-606

Sagisaka S (1972)

Decrease of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities in the xylem of *Populus gelrica* on budding. *Plant Physiology* 50:750-755

Sagisaka S (1982)

Comperative studies on the metabolic function of differentiated xylem and living bark of wintering perennials. *Plant Cell Physiology* 23:1337-1346

Sanders D (1984).

Gradient-coupled chloride transport in plant cells. in: Gerenzer GA, ed. Chloride transport coupling in biological membranes and epithelia. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 63-120

Sanders D, Tester (1997)

Ion channels. *Journal of Experimental Botany* 48 (Special Issue).

Sauter JJ (1966a)

Untersuchungen zur Physiologie der Pappelholzstrahlen I. Jahresperiodischer Verlauf der Stärkespeicherung im Holzstrahlparenchym. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 55:246-258

Sauter JJ (1966b)

Untersuchungen zur Physiologie der Pappelholzstrahlen II. Jahresperiodische Änderungen der Phosphataseaktivität im Holzstrahlparenchym und ihre mögliche Bedeutung für den Kohlenhydratstoffwechsel und den aktiven Assimilattransport. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 55:349-362

Sauter JJ (1966c)

Der Einfluß der verschiedenen Temperaturen auf die Reservestärke in parenchymatischen Geweben von Baumsprossachsen. *Zeitschrift Pflanzenphysiologie* 56:340-352

6. Literatur

Sauter JJ (1973)

Studies on the release of sugar into the vessels of sugar maple (*Acer saccharum*). Canadian Journal of Botany 51:1-8

Sauter JJ (1976)

Analysis of the amino acids and amides in the xylem sap of *Salix caprea* L. in early spring. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 79:276-280

Sauter JJ (1980)

Seasonal variation of sucrose content in the xylem sap of *Salix*. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 98:377-391

Sauter JJ (1981a)

Sucrose uptake in the xylem of *Populus*. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 103:165-168

Sauter JJ (1981b)

Evidence for sucrose efflux and hexose uptake in the xylem sap of *Salix*. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 103:183-187

Sauter JJ (1982)

Efflux and reabsorption of sugars in the xylem I. Seasonal changes in the sucrose efflux in *Salix*. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 106:325-336

Sauter JJ (1988a)

Temperature-induced changes in starch and sugars in the stem of *Populus x canadensis 'robusta'*. Journal of Plant Physiology 132: 608-612

Sauter JJ (1988b)

Seasonal changes in efflux of sugars from parenchyma cells into the apoplast in poplar stems (*Populus x canadensis 'robusta'*). Trees 2: 242-249

Sauter JJ, Ambrosius T (1986)

Changes in the partitioning of carbohydrates in the wood during bud break in *Betula pendula* Roth. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 107:31-43

Sauter JJ, van Cleve B (1990)

Biochemical, immunochemical, and ultrastructural studies of protein storage in poplar (*Populus x canadensis 'robusta'*) wood. Planta 183:92-100

Sauter JJ, van Cleve B (1992)

Seasonal variation of amino acids in the xylem sap of *Populus x canadensis* and its relation to protein body mobilisation. Trees 7:26-32

Sauter JJ, van Cleve B (1994)

Storage, mobilization and interrelations of starch, sugars, protein and fat in the ray storage tissue of poplar trees. Trees 8:297-304

Sauter JJ, Kloth S (1986)

Plasmodesmatal frequency and radial translocation rates in ray cells of poplar (*Populus x canadensis* Moench 'robusta'). Planta 168:377-380

6. Literatur

Sauter JJ, Kloth S (1987)

Changes in carbohydrates and ultrastructure in xylem ray cells of *Populus* in response to chilling. *Protoplasma* 137:45-55

Sauter JJ, Wellenkamp S (1998)

Seasonal changes in the content of starch, protein and sugars in the twig wood of *Salix caprea* L. *Holzforschung* 52:255-262

Sauter JJ, Witt W (1997)

Structure and function of rays: storage, mobilisation, transport. In Ren-
nenberg H et al., eds, *TREES - Contributions to Modern Tree Physiology*,
Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp 177-195

Schill V, Hartung W, Orthen B, Weisenseel MH (1996)

The xylem sap of maple trees - sap obtained by a novel method shows
changes with season and height. *Journal of Experimental Botany* 47:123-
133

Schroeder JI (1988)

K⁺ transport properties of K⁺ channels in the plasma membrane of *Vicia*
fabae guard cells. *Journal of General Physiology* 92:667-683

Schröder WH, Bauch J, Endeward R (1988)

Microbeam analysis of Ca exchange and uptake in the fine roots of spruce:
influence of pH and aluminum. *Trees* 2:96-103

**Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacroute F, Salmon J-M,
Gaymard F, Grignon C (1992)**

Cloning and Expression in yeast of a plant potassium ion transport system.
Science 256:663-665

Sprugel DG (1990)

Components of woody-tissue respiration in young *Abies amabilis* Forbes
trees. *Trees* 4:88-98

Stettler RF, Bradshaw HD, Heilman PE, Hinckley TM (1996)
Biology of Populus. NRC Research Press Ottawa 1996

Stienen H, Barckhausen R, Syhaub H, Bauch J (1984)

Mikroskopische und röntgenenergie-dispersive Untersuchungen an Feinwurzeln
gesunder und erkrankter Fichten (*Picea abies* L.) verschiedener Stand-
orte. *Forstwissenschaftliches Zentralblatt* 103:262-274

Stienen H, Bauch J (1988)

Element content in tissues of spruce seedlings from hydroponic cultures si-
mulating acidification and deacidification. *Plant and Soil* 106:231-238

Straßburger (1998)

Lehrbuch der Botanik, 34. Auflage Gustav Fischer Verlag, Jena

6.Literatur

Tester M (1996)

Techniques for studying ion channels: an introduction. *Journal of Experimental Botany* 48:353-359

Tromp J, Ovaas JC (1967)

Seasonal variation in amino acid composition of xylem sap of apple. *New Zealand Journal of Plant Physiology* 57:11-21

Tromp J (1979)

Seasonal variation in the composition of xylem sap of apple with respect to K, Ca, Mg and N. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 94, 189-194

Tyerman SD, Skerrett M, Garrill A, Findlay GP, Leigh RA (1997)

Pathways for the permeation of Na⁺ and Cl⁻ into protoplasts derived from the cortex of wheat roots. *Journal of Experimental Botany* 48:459-480

Wegner LH, Raschke K (1994)

Properties of the K⁺- inward rectifier in the plasma membrane of xylem parenchyma cells of barley roots are regulated by G- Protein modulations through a membrane- delimited pathway. *Planta* 203:506-516

Willenbrink J (1980)

Aspects arising from the use of inhibitors in phloem transport studies. *Canadian Journal of Botany* 58:816-820

Witt W, Sauter JJ (1994a)

Enzymes of starch metabolism in poplar wood during fall and winter. *Journal of Plant Physiology* 143:625-631

Witt W, Sauter JJ (1994b)

Starch metabolism in poplar wood ray cells during spring mobilisation and summer deposition. *Physiologia Plantarum* 92:9-16

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem akademischen Lehrer Herrn Prof. Dr. J.J. Sauter für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes, seine persönliche Betreuung während der gesamten Zeit und seine geduldige Unterstützung bei dieser Anfertigung der Arbeit. Für die freundliche Übernahme des Koreferates danke ich Herrn Prof. Dr. R. Schulz-Friedrich. Herrn Prof. Dr. K. Dierßen möchte ich für die Benutzung der HPLC- Anlage seiner Arbeitsgruppe danken. Frau Sabine Karg danke ich für ihre zuverlässige praktische Hilfe bei allen Arbeiten im Labor. Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. Silke Schrader für ihre sorgfältige Durchsicht meines Manuskriptes.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß diese Arbeit
selbständig von mir verfaßt wurde und keine anderen als die
angegebenen Quellen und Hilfsmittel eingesetzt worden sind.