

Technische Universität München
Lehrbereich Angewandte Holzbiologie
Department für Biogene Rohstoffe und Technologie der Landnutzung

**Die Funktion des Kaliums bei der Holzbildung -
Eine anatomisch-physiologische Analyse anhand der Modell-
baumart *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.**

Christa Wind

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Oßwald
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Jörg Fromm
2. Univ.-Prof. Dr. Rainer Matyssek

Die Dissertation wurde am 10. Juli 2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 13. Oktober 2003 angenommen.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrbereich Angewandte Holzbiologie des Departments für Biogene Rohstoffe und Technologie der Landnutzung der Technischen Universität München angefertigt.

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Uni.-Prof. Dr. Jörg Fromm, der mich in jeder Hinsicht großzügig unterstützte. Weiterhin danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Rainer Matussek für die Übernahme des Zweitkorrektors und Herrn Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Oßwald für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Herrn Dr. Matthias Arend danke ich für hilfreiche fachliche Diskussionen und motivierende Worte. Für ihre wertvolle Unterstützung bei den Arbeiten in der Abteilung Holzchemie bedanke ich mich bei Frau Dr. Lisa Windeisen, Anna Klassen und Claudia Strobel. Nicht unerwähnt bleiben sollen alle weiteren Mitarbeiter der Holzforschung München, die mir durch ihre stete und freundliche Hilfsbereitschaft die Anfertigung der vorliegenden Arbeit erleichterten.

Wesentliche Teile dieser Arbeit bauen auf Vorarbeiten von Katharina Langer, Julius-von-Sachs-Institut der Universität Würzburg auf, der ich für die gute Kooperation danken möchte. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Dirk Becker und Dietmar Geiger, beide Julius-von-Sachs-Institut der Universität Würzburg, für die Unterstützung bei der Oocytenpräparation. Herrn Dr. von Wühlisch, Institut für Forstgenetik und Forstpflanzentüchtung der Bundesanstalt für Forst- und Holzwirtschaft in Hamburg danke ich für die großzügige Bereitstellung der Versuchspflanzen.

Mein Dank gilt auch der Konrad-Adenauer-Stiftung für die finanzielle und ideelle Förderung. Insbesondere möchte ich mich bei meinem Vertrauensdozenten Univ.-Prof. Dr. Rainer Agerer und der Leiterin der Graduiertenförderung Frau Dr. Daniela Tandecki für das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Ein Dank geht auch an meine Familie und meine Freunde, die mich stets unterstützten.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Vorwort | I |
| Inhaltsverzeichnis | II |
| Abkürzungsverzeichnis | IV |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Das vasculäre Cambium und die cambiale Zelldifferenzierung | 3 |
| 1.2 Die Bedeutung von Kalium für die Pflanze und die Holzbildung ... | 7 |
| 1.3 Der Kaliumtransport in der Pflanze | 8 |
| 1.4 Kationenkanäle der pflanzlichen Plasmamembran | 11 |
| 1.5 Zielstellung | 15 |
| 2 Material und Methoden | 17 |
| 2.1 Pflanzenmaterial | 17 |
| 2.2 Anzucht der Pflanzen bei unterschiedlicher Mineralstoffversorgung | 18 |
| 2.3 Anatomische Untersuchungen..... | 21 |
| 2.3.1 Mazeration | 21 |
| 2.3.2 Anfertigung von Gewebeschnitten für die Lichtmikroskopie | 22 |
| 2.3.3 Histometrische Auswertung | 22 |
| 2.3.4 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) | 22 |
| 2.4 Chemische Analyse der Holzzusammensetzung | 23 |
| 2.4.1 Darstellung des Verholungsgrades im Lichtmikroskop | 23 |
| 2.4.2 Bestimmung des Extraktgehaltes | 23 |
| 2.4.3 Bestimmung des Ligningehaltes | 24 |
| 2.4.4 Bestimmung des Cellulosegehaltes | 24 |
| 2.5 Elementanalysen | 25 |
| 2.5.1 Energiedispersive Röntgenanalyse (EDXA) am Rasterelektronenmikroskop (REM) | 25 |
| 2.5.2 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) | 26 |
| 2.6 Bestimmung des relativen osmotischen Potentials | 26 |
| 2.7 Bestimmung organischer Osmotika (Saccharose, Glucose, Fructose und Malat) | 27 |
| 2.8 Immunologische Nachweisverfahren | 28 |
| 2.8.1 SDS-PAGE und Western Blot Analyse | 28 |
| 2.8.2 Immunofluoreszenzmikroskopie | 30 |
| 2.8.3 Immunogold-Transmissionselektronenmikroskopie | 31 |
| 3 Ergebnisse | 32 |
| 3.1 Einfluss der Kaliumernährung auf den Phänotyp der Versuchspflanzen | 32 |
| 3.2 Einfluss der Kaliumernährung auf den Kaliumhaushalt der Holzbildungszone | 34 |
| 3.3 Einfluss der Kaliumernährung auf die Holzanatomie | 39 |
| 3.4 Einfluss der Kaliumernährung auf die cambiale Ultrastruktur | 46 |
| 3.5 Einfluss der Kaliumernährung auf die chemische Holzzusammensetzung | 47 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.6 | Einfluss der Kaliumernährung auf das osmotische Potential der Holzbildungszone und die Akkumulation organischer Osmotika | 49 |
| 3.7 | Saisonale Änderungen von Kalium- und Natriumgehalt, relativem osmotischen Potential und Cambiumaktivität der Holzbildungszone | 51 |
| 3.8 | Effekt von Natrium auf die Kaliumaufnahme bei reduzierter Kaliumernährung | 55 |
| 3.9 | Einfluss von Abscisinsäure (ABA) auf den Kaliumgehalt und die Anatomie der Holzbildungszone | 56 |
| 3.10 | Lokalisierung der Kaliumkanäle PTK2 und PTORK | 57 |
| 3.10.1 | Immunolokalisierung von PTK2 | 60 |
| 3.10.2 | Immunolokalisierung von PTORK | 66 |
| 3.10.3 | Immunogoldmarkierung im Transmissionselektronenmikroskop ... | 73 |
| 3.11 | Einfluss der Kaliumernährung auf die PM H ⁺ -ATPase | 76 |
| 4 | Diskussion | 79 |
| 4.1 | Einfluss der Kaliumernährung auf die Elementgehalte und den Kaliumhaushalt der Holzbildungszone | 79 |
| 4.2 | Einfluss der Kaliumernährung auf die Holzanatomie und Holzchemie | 82 |
| 4.3 | Zusammenhang zwischen Kaliumgehalt, osmotischem Potential und cambialer Aktivität in der Holzbildungszone | 86 |
| 4.4 | Die Kaliumkanäle PTK2 und PTORK und ihre physiologische Bedeutung für die Holzbildung | 88 |
| 4.5 | Effekt von Abscisinsäure (ABA) auf die Holzbildung und den Kaliumhaushalt der Holzbildungszone | 94 |
| 4.6 | Einfluss der Kaliumernährung auf die H ⁺ -ATPase der Plasmamembran | 96 |
| 5 | Zusammenfassung | 98 |
| 6 | Literatur | 101 |
| 7 | Anhang | 117 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------------|---|
| AAS | Atom-Absorptions-Spektroskopie |
| ABA | Abscisinsäure |
| AKT1 | <i>Arabidopsis</i> <u>K</u> ⁺ <u>T</u> ransporter <u>1</u> |
| AKT2/3 | <i>Arabidopsis</i> <u>K</u> ⁺ <u>T</u> ransporter <u>2/3</u> |
| AKT6 | <i>Arabidopsis</i> <u>K</u> ⁺ <u>T</u> ransporter <u>6</u> |
| AtKC1 | <i>Arabidopsis thaliana</i> <u>K</u> ⁺ <u>c</u> hannel <u>1</u> |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| EDXA | Energiedispersive Röntgenanalyse |
| EGTA | Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N, N', N', N'-Tetraessigsäure |
| EST | Expressed Sequence Tags |
| FAO | Food and Agriculture Organisation |
| Fe-EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure-Eisensalz |
| GORK | <u>G</u> uard <u>C</u> ell <u>o</u> utward <u>r</u> ectifying <u>c</u> hannel |
| HAK | <u>H</u> igh- <u>a</u> ffinity <u>K</u> ⁺ - <u>T</u> ransporter |
| HKT | <u>H</u> igh affinity <u>K</u> ⁺ - <u>T</u> ransportsystem |
| IgG | Immunoglobulin |
| KAT1 | <u>K</u> ⁺ transporter <i>Arabidopsis thaliana</i> <u>1</u> |
| KAT2 | <u>K</u> ⁺ transporter <i>Arabidopsis thaliana</i> <u>2</u> |
| KCO | <u>K</u> ⁺ <u>c</u> hannel <u>o</u> utward-rectifier |
| kD | kilo Dalton |
| Kir | <u>K</u> ⁺ <u>i</u> nward <u>r</u> ectifier |
| KPT1 | <u>K</u> ⁺ <u>c</u> hannel <i>Populus tremula</i> <u>1</u> |
| KT | <u>K</u> ⁺ <u>-T</u> ransporter |
| KUP | <u>K</u> ⁺ <u>u</u> ptake- <u>T</u> ransporter |
| PBS | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| PBS-T | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Zusatz von 0,2% Tween 20 |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PM H ⁺ -ATPase | Plasmamembran H ⁺ -ATPase |
| PTK2 | <i>Populus tremula</i> <u>K</u> ⁺ <u>c</u> hannel <u>2</u> |
| PTORK | <i>Populus tremula</i> <u>o</u> utward <u>r</u> ectifying <u>K</u> ⁺ <u>c</u> hannel |
| PTKUP1 | <i>Populus tremula</i> <u>K</u> ⁺ <u>u</u> ptake <u>t</u> ransporter <u>1</u> |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |

| | |
|----------|---|
| PVPP | Polyvinylpolypyrrolidone |
| REM | Rasterelektronenmikroskop |
| SDS | Dodecylsulfat-Natriumsalz |
| SDS-PAGE | SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| SKOR | <u>S</u> telar <u>K</u> ⁺ <u>o</u> utward <u>r</u> ectifying <u>c</u> hannel |
| SPIK | <u>S</u> haker <u>P</u> ollen <u>i</u> nward <u>K</u> ⁺ channel |
| TBS | TRIS-gepufferte Kochsalzlösung |
| TBS-T | TRIS-gepufferte Kochsalzlösung mit Zusatz von 0,5% Tween 20 |
| TEM | Transmissionselektronenmikroskop |
| TM | Trockenmasse |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Tween 20 | Polyethoxysorbitanmonolaurat |

1 Einleitung

Als nachwachsender Rohstoff von hoher wirtschaftlicher Bedeutung gewinnt die Verwendung von Holz vor dem Hintergrund der heutigen ökologischen Problematik zunehmend an Gewicht. So ist nach einer Studie der FAO weltweit mit einem 25 %igen Anstieg des Holzverbrauchs im Zeitraum 1996 bis 2010 zu rechnen (WHITEMAN und BROWN 1999). Neben den klassischen Einsatzgebieten von Holz als Roh- und Werkstoff, als Energiequelle sowie als Zellstofflieferant für die Papierindustrie entstehen zudem neue Verwendungsbereiche zum Beispiel als Ausgangsstoff biomorpher Keramiken (GREIL *et al.* 1998a,b) oder für die Produktion biogener Klebstoffe (ROFFAEL *et al.* 2000). Aufgrund der komplexen chemischen Zusammensetzung von Holz (Cellulose, Hemicellulose, Lignin und Pektine) kann es sowohl für die Herstellung von Plastik und alle Arten chemischer Produkte, als auch für die Nahrungsmittel- und Textilienproduktion verwendet werden und ist somit ein idealer Rohstoff für eine sich entwickelnde Ligno-chemische Industrie, die möglicherweise in Zukunft Produkte der Petro-chemischen Industrie wie beispielsweise Plastik und Chemiefasern ersetzen könnte (PLOMION *et al.* 2001).

Der Rohstoff Holz wird im lebenden Baum durch eine dünne Schicht meristematischer Zellen, dem vaskulären Cambium gebildet. Jede weitergehende Einsicht in die grundlegenden Holzbildungsprozesse, wie auch zukünftige Strategien zur Beeinflussung der Holzbildung und von Holzeigenschaften, beruhen daher auf einem korrekten Verständnis der Cambiumfunktionen (CHAFFEY 1999a). Während in früheren Jahren vor allem Verwendungseigenschaften prägende Merkmale wie Mechanik, Struktur und chemische Zusammensetzung von Holz Gegenstand der Holzforschung waren (BARNETT 1981), sind unsere Kenntnisse über wichtige biologische Grundlagen der Holzbildungsprozesse dagegen noch sehr gering (CATESSON 2000; PLOMION *et al.* 2001; CHAFFEY 2002).

Erste Einblicke in die Prozesse der Holzbildung lieferten Arbeiten, die sich vor allem anatomischen Aspekten der cambialen Aktivität widmeten (ROBERTS *et al.* 1988; LARSSON 1994; FARRAR und EVERT 1997 a, b; LACHAUD *et al.* 1999). Die biologischen Grundlagen von Holzbildung und -wachstum lassen sich jedoch nur durch das zusätzliche Verständnis der physiologischen und molekularen Regulation von Mechanismen, wie Teilung und Differenzierung cambialer Zellen klären (SAVIDGE 2000; PLOMION *et al.* 2001; CHAFFEY 2002). Bisherige Kenntnisse von Wachstumsprozessen in einjähri

gen, krautigen Pflanzen sind nur zum Teil auf die Prozesse der Holzbildung in Bäumen übertragbar, da krautige Pflanzen meist kein sekundäres Cambium und somit kein ausgeprägtes sekundäres Dickenwachstum haben (Ausnahmen sind zum Beispiel *Arabidopsis* und *Zinnia* (CHAFFEY 1999b)). Im Gegensatz zu Bäumen bilden krautige Pflanzen zudem keine Holzstrahlen, zeigen keine saisonale Cambiumaktivität, keine saisonalen Veränderungen des Holzaufbaus wie Frühholz und Spätholz und somit auch keine Jahrringbildung. Desweiteren sind die Prozesse der Verkernung und die Entwicklung von juvenilem zu reifem Holz bei krautigen Pflanzen nicht zu beobachten (PLOMION *et al.* 2001; CHAFFEY *et al.* 2002). Als mehrjährige Pflanzen entwickelten Bäume vielschichtige Mechanismen zur Speicherung von Zuckern, Mineralien und Chlorophyllbauprodukten, zur Kälteadaptation für den Ruhezustand im Winter und für die Aktivierung des Neuaustriebs im Frühjahr, die bei einjährigen krautigen Pflanzen nicht ausgebildet sind.

In den letzten Jahren wurde die in den gemäßigten Breiten der Nordhemisphäre beheimatete Pappel (*Populus spec.*) aufgrund verschiedener Vorteile zur Modellpflanze der molekularen Holzforschung (CHAFFEY 1999a; BRADSHAW *et al.* 2000; MELLEROWICZ *et al.* 2001; TAYLOR 2002). Als wirtschaftlich wichtige Baumart ist die Pappel im Vergleich mit anderen Bäumen relativ raschwüchsig und einfach zu vermehren. Mit 5×10^8 bp (Basenpaare) hat die Gattung *Populus* ein für Bäume sehr kleines Genom (BRADSHAW und STETTER 1993), zudem ist die Pappel stammesgeschichtlich nahe verwandt mit *Arabidopsis thaliana*, welche als Modellpflanze für die genetische Forschung in der Pflanzenbiologie dient. Darüber hinaus ist die Pappel empfänglich für die stabile Transformation durch Agrobakterien, so dass transgene Pappeln generiert werden können (HAN *et al.* 1996, 2000; Fladung *et al.* 1997; Hawkins *et al.* 1997; HU *et al.* 1999; Tuominen *et al.* 2000). So wurde für einige Arten der Gattung *Populus*, u. a. für *Populus tremula* L. *x tremuloides* Michx. bereits eine Datenbank mit ESTs (expressed sequence tags) entwickelt (STERKY *et al.* 1998; WULLSCHLEGER *et al.* 2002).

1.1 Das vaskuläre Cambium und die cambiale Zelldifferenzierung

Ausgangspunkt der Holzbildung ist das vaskuläre Cambium, eine laterale Zone meristematischen Gewebes der Sprossachse und Wurzel von Gymnospermen und dikotylen Angiospermen, das während des sekundären Dickenwachstums nach innen Holz (sekundäres Xylem) und nach außen Bast (sekundäres Phloem) bildet (CATESSON 1964 und 1984; CHAFFEY *et al.* 1997; NULTSCH 2000). Das vaskuläre Cambium (Abb. 1.1) ist ein sekundäres Meristem, das sich aus dem Procambium entwickelt, welches wiederum aus dem apikalen Meristem hervorgeht (LARSON 1994).

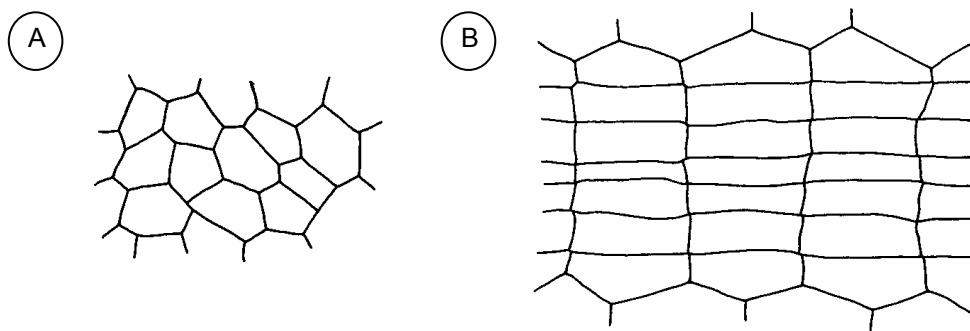


Abb.1.1: Schematische Querschnittsbilder des Procambiums (A) und des vaskulären Cambiums (B). (aus BRAUN 1982).

Im Gegensatz zu apikalen Meristemen ist das vaskuläre Cambium der Gehölze ein komplexes Gewebe mit zwei unterschiedlichen Zellarten: den fusiformen Intialen und den Strahlinitialen. Die fusiformen Initialen unterscheiden sich von anderen meristematischen Zellen vor allem durch ihre schmale, langgestreckte Form sowie durch den Besitz einer großen Zentralvacuole, die im aktiven Cambium nahezu das gesamte Zelllumen ausfüllt (BAILEY 1930; BUVAT 1956 a,b; RAVEN 1987; BARNETT 1992). Die axiale Ausdehnung der fusiformen Cambiumzellen entspricht zum großen Teil bereits der Länge der aus Ihnen hervorgehenden Zellerivate. So werden zum Beispiel für die axiale Längenausdehnung bei Laubgehölzen Werte im Bereich von ca. 200-900 μm angegeben (BAILEY 1920; CATESSON 1974; LARSON 1994). Fusiforme Initialen bilden durch vorwiegend pericline Zellteilung (in radialer Richtung) axiale Elemente wie Tracheiden, Gefäße, Fasern, Parenchymzellen, oder Siebröhren und Geleitzellen. Die Teilungsaktivität ist in Richtung Xylem höher als in Richtung Phloem, so dass verhältnismäßig mehr

Holz als Bast gebildet wird. Für die Umfangserweiterung des Baumstammes werden durch antikline Teilung der fusiformen Initialen zusätzlich radiale Zellreihen eingefügt. Im Gegensatz zu den fusiformen Initialen sind die Strahlinitialen annähernd isodiametrisch geformt. Sie bilden durch perikline Zellteilung in radialer Richtung das Holzstrahlparenchym, dessen Funktion vor allem im Nährstofftransport zwischen Xylem und Phloem liegt (LARSON 1994; LACHAUD *et al.* 1999; MELLEROWITCZ *et al.* 2001).

Die Holzbildungsrate, beruhend auf der Aktivität des Cambiums, wird im wesentlichen durch die Anzahl der meristematischen Zellen und durch die Zahl der Zellteilungen im Cambium bestimmt. Die Aktivität des Cambiums wird von endogenen Faktoren (Phytohormone, Proteine, Zucker) und exogenen Faktoren (Licht, Temperatur, Mineralstoffernährung, Wasserhaushalt) reguliert. So werden beispielsweise Jahrringe aufgrund einer saisonal bedingten Ruhephase des Cambiums gebildet. Aktives und ruhendes Cambium unterscheiden sich erheblich sowohl in der Anzahl als auch in der Ultrastruktur der cambialen Zellen (CATESSON 1994; LARSON 1994; IQBAL 1995; AREND 2001; AREND und FROMM 2003). Ein wesentliches Merkmal der cambialen Ruhe ist dabei der Zerfall der Zentralvacuole in zahlreiche kleine Vacuolen.

Die Differenzierung des sekundären Xylems aus dem Cambium unterteilt sich in drei wesentliche Schritte: Zellstreckung (longitudinal und radial), Sekundärwandbildung und dem programmierten Zelltod (Abb. 1.2).

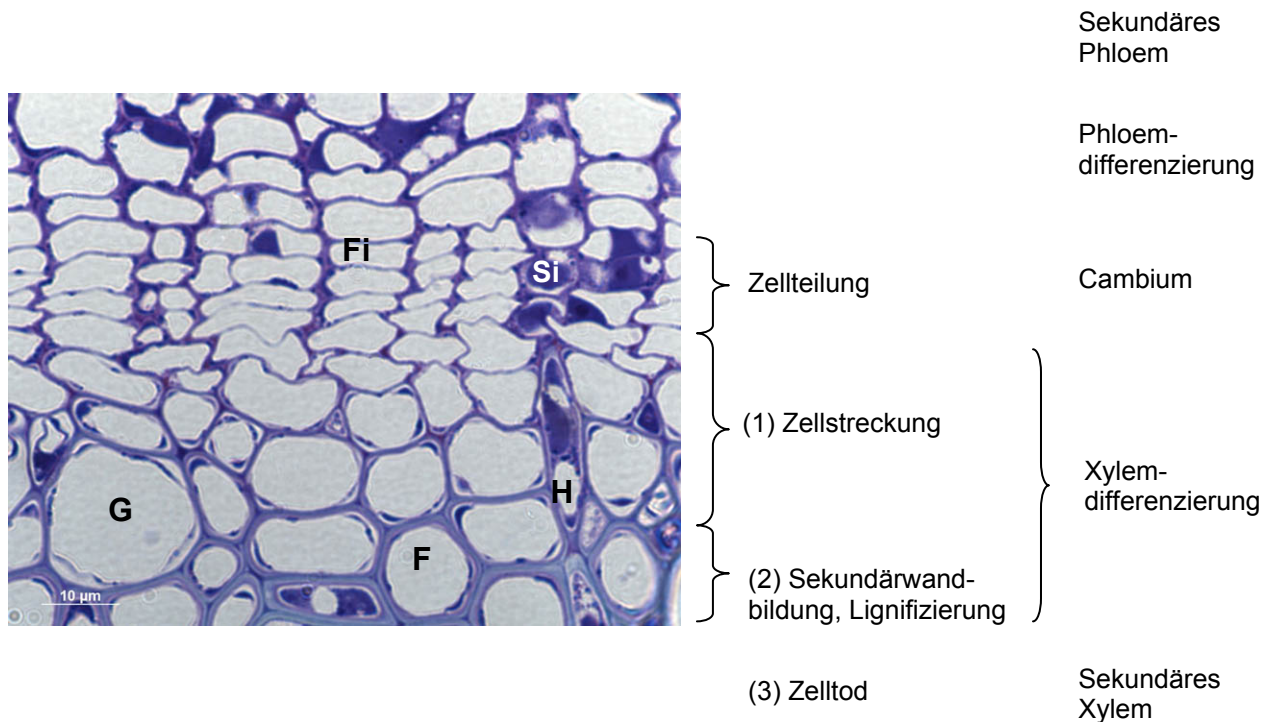


Abb. 1.2: Querschnitt der cambialen Zone und Xylemdifferenzierungszone von *Populus tremula x tremuloides*. Fi: Fusiforme Cambiumzellen, H: Holzstrahl, G: Gefäß, F: Xylemfaser, Si: Strahlinitiale.

In der Phase der Zellstreckung differenzieren sich die fusiformen Cambiumzellen der Laubhölzer zu Gefäßen, Fasern und axialen Parenchymzellen mit sehr unterschiedlichem morphologischem Aufbau. Gefäße expandieren vor allem in radialer und tangentialer Richtung, ihr Längenwachstum ist nur gering. Fasern dagegen strecken sich vor allem in longitudinaler Richtung (BAILEY 1920; WENHAM und CUSICK 1975; LARSON 1994; MELLEROWICZ *et al.* 2001). Die treibende Kraft für die Expansion der sich differenzierenden Zellen ist eine starke Volumenzunahme der Vacuole (BARNETT 1981; KLEINIG und SITTE 1992; LARSON 1994; SAVIDGE 1996). Die Aufnahme von Wasser in die sich hierdurch vergrößernde Vacuole unterliegt einer ausgeprägten osmotischen Regulation (LOCKHART 1965; MEYER und BOYER 1972), wobei Kalium als wichtigstes pflanzliches Osmotikum eine Schlüsselposition einnimmt (PITMAN *et al.* 1971; LÜTTGE und HIGINBOTHAM 1979; HSIAO und LÄUCHLI 1986; MARSCHNER 1995). Die Größen- und Formentwicklung der Xylemzellen hängt somit vor allem von ihrer Fähigkeit ab große Mengen an osmotisch aktiven Substanzen aufzunehmen. Neben dem Aufbau eines erhöhten osmotischen Potentials in der Zelle ist die Herabsetzung der Steifigkeit der Zellwand eine weitere Voraussetzung für die Zellexpansion. Allgemein wird angenom-

men, dass eine erhöhte Dehnbarkeit der Zellwand durch eine Ansäuerung des Apoplasten erreicht wird (KUTSCHERA 2001). Hierdurch können enzymatische Prozesse aktiviert werden, die zur Lockerung der Zellwandbindung führen und somit die Dehnbarkeit der sich streckenden Zellwand erhöhen.

Nach dem Abschluss der Zellexpansion führt eine Vernetzung von Pektinen in Mittellamelle und Primärwand durch Calcium zu einer Versteifung der bislang dehnbaren Zellwand. Darauf folgt die Auflagerung der sekundären Zellwand, die im ausdifferenzierten Zustand dreischichtig sein kann. Mit der Einlagerung von Lignin in die Interfibrillarräume der Zellwand (Lignifizierung) wird die Druckfestigkeit der neu gebildeten Xylemelemente erhöht und die Wasserdurchlässigkeit ihrer Zellwand herabgesetzt. Die dem Wasser- und Mineralstofftransport von den Wurzeln zum Spross dienenden Gefäße lignifizieren früher als Faserzellen (DOLEY und LEYTON 1968; RIDOUTT und SANDS 1994), so dass die grundlegenden, wasserabhängigen Prozesse des Baumes vorrangig erfüllt werden können. Die Differenzierung der Xylemfasern sowie der Gefäße endet mit der gesteuerten Autolyse des Protoplasten. Im Gegensatz hierzu bleiben Parenchymzellen nach der Zelldifferenzierung über mehrere Jahre lebensfähig.

Im Gegensatz zum Holz (sekundäres Xylem) setzt sich das sekundäre Phloem von Laubhölzern aus Parenchym, Siebröhren und Geleitzellen (dem SE/CC-Komplex) zusammen. Die Zellen des Phloems sind unverholzt und ihr Protoplast bleibt nach der Differenzierung erhalten. In den Siebröhren des Phloems werden in erster Linie Photoassimilate von den Blättern (*sources*) zu den heterotrophen Geweben (*sinks*) der Pflanze transportiert. So ist beispielsweise das Cambium ein starkes *Sink*gewebe für Assimilate, die für die Holzbildung benötigt werden (KRABEL 2000). Die Funktion des Phloems beeinflusst somit wesentlich die cambiale Zellteilungs- und Differenzierungsaktivität.

1.2 Die Bedeutung von Kalium für die Pflanze und die Holzbildung

Im Gegensatz zu anderen mineralischen Nährelementen liegt Kalium innerhalb der pflanzlichen Zelle ausschließlich in ungebundener, bzw. ionischer Form als K^+ vor (WYN JONES *et al.* 1979) und ist mit Konzentrationen von 100 - 200 mM das häufigste Kation im Cytoplasma (LEIGH und WYN-JONES 1984). Hierdurch bestimmt es wesentlich das osmotische Potential innerhalb der Zelle. Neben der osmotischen Regulation übernimmt Kalium im Cytosol jedoch auch biochemische Funktionen. So neutralisiert es Anionen und stabilisiert den pH-Wert im Cytosol im Bereich zwischen 7 - 8, dem Optimum für die meisten enzymatischen Reaktionen (MARSCHNER 1995). Zudem ist Kalium essentiell für die Aktivierung vieler Enzyme (SUELTER 1970) sowie für die Proteinbiosynthese (WYN JONES *et al.* 1979). Bei reduzierter Kaliumversorgung der Pflanze wird die cytoplasmatische Konzentration zur Aufrechterhaltung lebensnotwendiger Kaliumabhängiger Prozesse möglichst konstant gehalten (WALKER *et al.* 1996). Im Gegensatz hierzu unterliegt die Kaliumkonzentration der Vacuole auch unter optimalen Versorgungsbedingungen ausgeprägten Schwankungen, die Teil wichtiger physiologischer Prozesse sind. So werden Zellstreckung und andere Turgor-gesteuerte Prozesse, wie Stomatabewegung und Tropismen, durch die Kaliumkonzentration in der Vacuole bestimmt (PHILIPPAR *et al.* 1999). Bei geringer Kaliumversorgung kann dieses Element zur Aufrechterhaltung des Zellurgors durch andere Osmotika (insbesondere durch Na^+) teilweise ersetzt werden (LEIGH und Wyn JONES 1984; MARSCHNER 1995; MÄSER *et al.* 2002). Weitere wichtige pflanzliche Osmotika sind Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , Polyamine, Zucker und organische Säuren wie Malat.

Neben den genannten Funktionen ist Kalium zudem bedeutsam für die Photosynthese sowie über die Steuerung der Stomatabewegung in Blättern für die Regulation des Wasserhaushalts der Pflanzen (MARSCHNER 1995). Desweiteren ist Kalium auch bei der Phloembeladung beteiligt (FROMM und BAUER 1994). So spielen neben Saccharose / H^+ -Symportern auch Kaliumkanäle eine wesentliche Rolle bei der Assimilatbeladung der Siebröhren und Geleitzellen und bei der Wiedergewinnung der Assimilate aus dem Phloem (ACHE *et al.* 2001; DEEKEN *et al.* 2000 und 2002).

Im Gegensatz zu krautigen Pflanzen ist über die Bedeutung des Kaliums in Bäumen relativ wenig bekannt. Allerdings zeigten Arbeiten von DÜNISCH und BAUCH (1994 a), DÜNISCH *et al.* (1998) sowie AREND *et al.* (2002) saisonale Änderungen des Kaliumgehaltes im Cambium. Zudem zeigten diese Arbeiten, dass das aktive Cambium und die

Xylemdifferenzierungszone starke *sinks* für Kalium darstellen. So steigt insbesondere während der Zellstreckung der symplastische Kaliumgehalt an. Mikroanalytische Untersuchungen mittels EDXA (Energiedispersiver Röntgenanalyse) zeigten insbesondere hohe Kaliumgehalte in den für den radialen Transport verantwortlichen Holzstrahlen (KUHNS *et al.* 1997). Dies lässt eine wesentliche Funktion der Holzstrahlen für den Transport und die Speicherung von Kalium sowie ihre Einbindung in ein potientes Recycling-System für Kalium innerhalb des Baumes vermuten. Auch der an Buchenblättern nachgewiesene rapide Export von Kalium vor dem Blattfall (ESCHRICH *et al.* 1988) weist auf einen hoch effizienten Wiedergewinnungskreislauf für Kalium hin. All dies unterstreicht eine wesentliche Bedeutung des Kaliums für die Prozesse der Holzbildung.

1.3 Der Kaliumtransport in der Pflanze

Mineralische Nährelemente werden in der Pflanze sowohl apoplastisch als auch symplastisch transportiert. Der apoplastische Transport erfolgt durch Diffusion im freien Zellwandraum oder im Leitgewebe des Xylems. Der symplastische Transport innerhalb von Zellen erfolgt dagegen über Plasmodesmen oder das Leitgewebe des Phloems. Die Aufnahme von Ionen aus dem Apoplasten in den Symplasten, beziehungsweise ihre Abgabe aus dem Symplasten in den Apoplasten erfolgt an der Plasmamembran. Der Transport durch die Plasmamembran ist selektiv und wird durch die biophysikalischen Eigenschaften spezieller, integraler Membranproteine vermittelt. Neben dem kontrollierten Nährstofftransport dienen pflanzliche Ionen-transportproteine auch der Stabilisierung des Membranpotentials und der Signalweiterleitung (ZIMMERMANN *et al.* 1999). Die meisten der pflanzlichen Transportproteine (Kanäle und Transporter) werden indirekt durch die Plasmamembran (PM) H^+ -ATPase aktiviert (PALMGREN 2001). Unter Verbrauch von ATP transportiert die PM H^+ -ATPase Protonen durch die Plasmamembran in den Außenraum der Zelle, wodurch ein elektrochemischer Gradient an der Plasmamembran aufgebaut wird. Das so gebildete elektrochemische Potential ist die treibende Kraft für die Aufnahme von Nährstoffen und organischen Metaboliten durch Kanal- und Transportproteine in die Zelle (MICHELET und BOUTRY 1995; HOTH *et al.* 1997; MAATHIUS *et al.* 1997). Zum einen treibt der Auswärtstransport von Protonen die passive Diffusion von Kationen, insbesondere von Kalium, durch Ionenkanäle in die Zelle an (TAIZ und ZEIGER 2000) und zum anderen dient er der Aktivierung von sekun-

dären Transportern. Prinzipiell können die Transportproteine in drei Gruppen aufgeteilt werden: Kanäle, Transporter und Pumpen (Abb. 1.3). Kanäle und Transporter leiten Ionen und Wasser durch Membranen entlang des elektrochemischen Potentialgradienten. Der Ionenfluss durch Kanäle ist passiv, sie können jedoch spannungs- und ligandenabhängig geöffnet und geschlossen werden. Transporter sind zumeist sekundär über Ionenpumpen aktiviert (PALMGREN 2001), während Pumpen H^+ oder Ca^{++} aktiv entgegen dem elektrochemischen Gradienten durch die Membranen transportieren (TAIZ und ZEIGER 2000).

Der Transport von Kalium über die Plasmamembran beinhaltet folglich viele verschiedene Aufnahme- und Abgabesysteme, die sich in ihrer Energieabhängigkeit, Selektivität sowie ihrer gewebespezifischen Lokalisation unterscheiden (HEDRICH und SCHROEDER 1989; MAATHIUS und SANDERS 1993; SANDERS und BETHKE 2000; TAIZ und ZEIGER 2000).

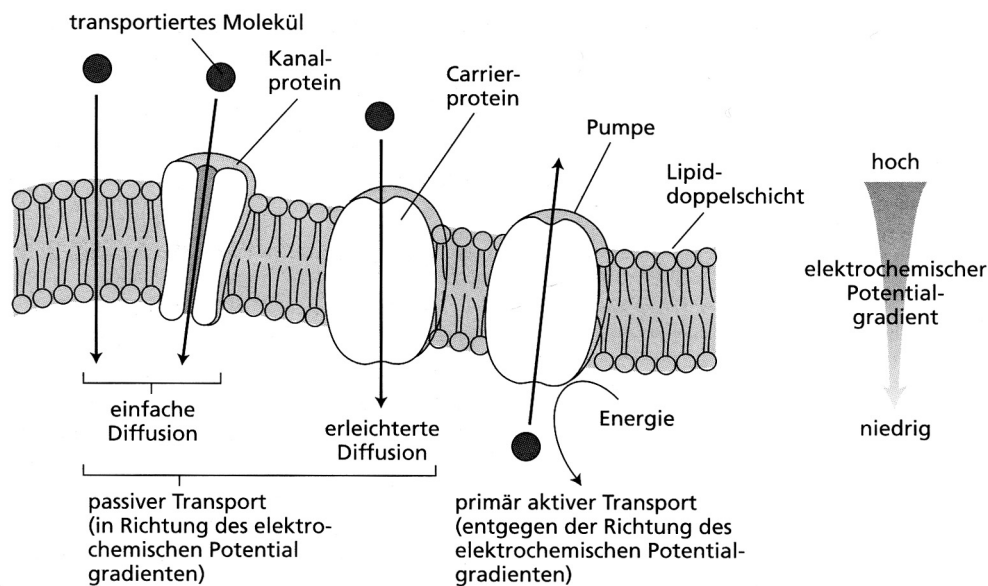


Abb. 1.3: Transportproteine der Plasmamembran: Kanäle, Transporter (Carrier) und Pumpen (aus: Taiz und Zeiger 2000).

Je nach Kaliumangebot des Bodens werden zwei Aufnahmewege in der Wurzel beschrieben (HEDRICH und ROELFSMA 1999). Bei ausreichender Nährstoffversorgung wird Kalium über einwärtsgerichtete Kaliumkanäle aufgenommen („low affinity“ K^+ -Transportsystem). Dabei sind insbesondere die Kaliumkanäle des Typs AKT1 (*Arabidopsis thaliana* K^+ -Transporter 1, SENTENAC *et al.* 1992, LEGARDE, *et al.* 1996, HIRSCH *et al.*

1998) und AtKC1 (*Arabidopsis thaliana* $\underline{\text{K}}^+$ -Channel 1, REINTANZ, *et al.* 2002) von Bedeutung. Um eine ausreichende Kaliumversorgung auch bei niedrigem Kaliumangebot ($\leq 10 \mu\text{mol}$) zu gewährleisten, können zusätzlich K^+ -Transporter, der HKT („high affinity“ $\underline{\text{K}}^+$ -Transportsystem) - und der KUP/HAK/KT-Familie ($\underline{\text{K}}^+$ uptake-/high-affinity $\underline{\text{K}}^+$ -/ $\underline{\text{K}}^+$ -Transporter) an der Kaliumaufnahme in den Wurzelsymplasten beteiligt sein (BRÜGGEMANN *et al.* 1999; KIM *et al.* 1998; RODRIGUEZ-NAVARRO 2000). Kalium kann auf diese Weise gegen ein sehr starkes Konzentrationsgefälle (bis zu 4 millionenfach) transportiert werden (SCHACHTMAN und SCHROEDER 1994). Bei sehr hohem Nährstoffangebot kann Kalium auch in den Zellwandraum der Wurzelzellen diffundieren und apoplastisch weitergeleitet werden. Spätestens an der Endodermis, deren radiale Zellwände durch wachsartige Suberinauflagerungen ionenundurchlässig sind (Caspary-Streifen) muss es jedoch mit Hilfe von Membranproteinen durch die Plasmamembran in das Cytoplasma der Zellen befördert werden. Für den Langstreckentransport muss Kalium anschließend aus den Zellen des Xylemparenchyms in das apoplastische Leitgewebe abgegeben werden und somit erneut die Plasmamembran passieren. GAYMARD *et al.* (1998) zeigten, dass an der Xylembeladung wesentlich der auswärtsgerichtete, im Xylemparenchym der Wurzel lokalisierte Kaliumkanal SKOR (Stelar $\underline{\text{K}}^+$ outward rectifying channel) beteiligt ist. So hatten transgene Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* mit gestörter SKOR-Funktion einen stark reduzierten Kaliumgehalt im Spross sowie im Xylemsaft. Die Expression von SKOR wird durch Kalium induziert und durch Abscisinsäure (ABA) sowie Kaliummangel reprimiert.

Der Langstreckentransport von mineralischen Nährstoffen wird vom Leitgewebe des Xylems und Phloems übernommen. Mit dem Xylemstrom gelangt Kalium von der Wurzel zu den *sink*-Gewebe wie jungen Blättern, Blüten, Früchten oder dem Cambium und wird von dort über das Leitgewebe des Phloems in andere *sink*-Gewebe transportiert (FROMM und BAUER 1994; FROMM 1997; DEEKEN *et al.* 2000; ACHE, *et al.* 2001). In Bäumen erfolgt der radiale Kaliumtransport vom Xylem zum Phloem symplastisch in den Holzstrahlzellen. An der Kaliumbe- und entladung des Phloems sind die *Shaker*-Kaliumkanäle (s. 1.5) des AKT2/3- Typs (*Arabidopsis* $\underline{\text{K}}^+$ Transporter) wesentlich beteiligt (ACHE *et al.* 2001). Die Richtung des Kaliumflusses im Phloem kann sich insbesondere bei der Reaktivierung mehrjähriger Pflanzen im Frühjahr auch umkehren. Dann wird Kalium aus den Speicherorganen in Stamm und Wurzel zu den reaktivierten *sink*-

Regionen wie Cambium und Blattknospen transportiert. Mikroanalytische Untersuchungen mittels EDXA zeigten zu Beginn der Holzbildung einen enormen Konzentrationsanstieg von Kalium im Cambium, der allein durch die Kalium-Neuaufnahme über die Wurzel nur schwer zu erklären ist (AREND und FROMM 2000).

1.4 Kationenkanäle der pflanzlichen Plasmamembran

Nach ihrer Struktur lassen sich pflanzliche Kationenkanäle in drei Familien einteilen (VERY und SENTENAC 2002; MÄSER *et al.* 2002):

- a) die K^+ Kanäle *Shaker* (9 Gene)
- b) Zwei-Porenkanäle (5 Gene)
- c) Kir (K^+ inward-rectifier) (1 Gen)

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kanäle PTK2 (*Populus tremula* K^+ channel) und PTORK (*Populus tremula* outward rectifying K^+ channel) gehören der Familie der *Shaker*-Kanäle an, die im Folgenden näher beschrieben werden (Abb. 1.5).

Die *Shaker* Familie umfasst eine Gruppe spannungsregulierter Ionenkanäle (K^+ , Na^+ und Ca^{++} Kanäle) mit ähnlichem strukturellen Aufbau (LODISH *et al.* 1996; ZIMMERMANN und SENTENAC 1999; SANDERS und BETHKE 2000; MÄSER *et al.* 2002). Namensgebend war das auffällige Zittern von *Drosophila* Fliegen auf Grund eines anormal verlängerten Aktionspotentials nach der Mutation eines der *Shaker* Familie zugehörigen Kaliumkanals. Das funktionelle Kanalprotein des *Shaker*-Typs besteht aus vier Polypeptiden, die aus je sechs membran-durchspannenden α -Helices (S1-S6) aufgebaut sind (Abb.1.4 a, b). Die vierte Helix (S4) besitzt positiv geladene Aminosäuren und wirkt so vermutlich als Spannungssensor für das spannungsabhängige Öffnen und Schließen der *Shaker*-Kanäle (ZEI und ALDRICH 1998). Zwischen der fünften und sechsten transmembranen Domäne befindet sich eine hochkonservierte Region (P-Domäne), die als Selektivitätsfilter dient und die Pore des Kanals formt (BECKER *et al.* 1996; DOYLE *et al.* 1998) (Abb. 1.4b). Bei pflanzlichen *Shaker*-Proteinen besitzen die im Cytosol liegenden N- und C-Termini regulatorische Domänen. Im C-terminalen Bereich verfügen alle bisher klonierten pflanzlichen Kaliumkanäle über Bindestellen für cyclische Nukleotide und Ankyrine (Cytoskelettproteine) und zusätzlich über konser-

vierte Bereiche basischer und saurer Aminosäuren. Letztere beeinflussen Interaktionen der Kanäle untereinander (ERHARDT *et al.* 1997).

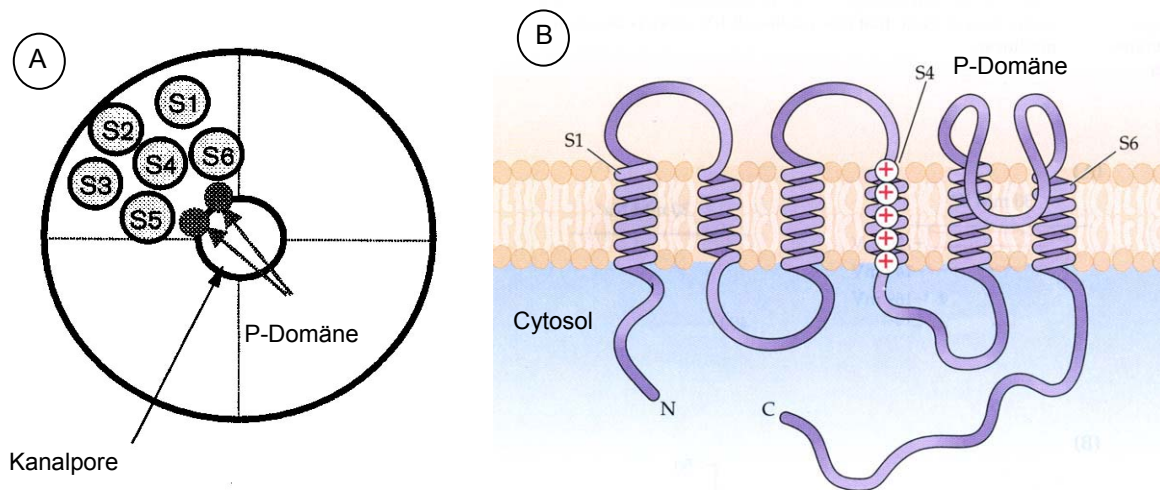


Abb. 1.4: Proteinstruktur der Kanäle der *Shaker* Familie. **A)** Der im Querschnitt gezeigte *Shaker*-Kanal besteht aus vier identischen Untereinheiten. Die P-Domänen jeder Untereinheit begrenzen jeweils die ionenselektive Kanalpore (aus ZIMMERMANN und SENTENAC 1999). **B)** Jedes der vier Polypeptide, die den *Shaker*-Kanal bilden, setzt sich aus sechs membrandurchspannenden α -Helices (S1-S6) zusammen. S4 enthält positiv geladene Aminosäuren und bildet den Spannungssensor. Die N- und C-Termini des Polypeptids befinden sich im Cytosol (aus SANDERS und Bethke 2000).

Elektrophysiologisch lassen sich die *Shaker*-Kanäle in strikte Einwärts¹- (z. B. KAT1) und Auswärtsgerichtet² (z. B. SKOR) und in Kanäle, die sowohl als Einwärts-, als auch als Auswärtsgerichtete Ströme vermitteln (z. B. AKT 2/3) unterteilen. Die spannungsabhängigen K^+ Kanäle stabilisieren durch kontrollierte Kaliumaufnahme bzw. -abgabe das Membranpotential der Zelle. Einwärtsgerichtete K^+ Kanäle öffnen sich bei Membran-Hyperpolarisation (Membranpotential negativer als das Gleichgewichtspotential von K^+ (E_K)) und nehmen K^+ aus dem apoplasmatischen Raum auf. Die so herbeigeführte K^+ Akkumulation dient zum Beispiel dem Aufbau des Zellturgors. Charakteristisch für pflanzliche einwärtsgerichtete *Shaker*-Kanäle ist ihre hohe Selektivität.

¹ Einwärtsgerichtete Kaliumkanäle werden durch eine Membranhyperpolarisation aktiviert (bei Membranpotentialen die negativer sind als das Kaliumgleichgewichtspotential) und vermitteln eine K^+ Aufnahme.

² Auswärtsgerichtete Kaliumkanäle werden durch eine Membrandepolarisation aktiviert (bei Membranpotentialen, die positiver sind als das Kaliumgleichgewichtspotential) und vermitteln eine Kaliumabgabe.

tät für K^+ im Vergleich zu Na^+ sowie ihre Sensitivität gegenüber Cs^+ , Ba^{++} und Tetraethylammoniumchlorid (TEA) (VÉRY und SENTENAC 2002). Auswärtsgleichrichtende K^+ Kanäle öffnen sich nach Depolarisation der Plasmamembran, beziehungsweise wenn das Membranpotential positiver ist als E_K (SANDERS und BETHKE 2000). Auswärtsgleichrichtende K^+ Kanäle haben eine hohe Selektivität für K^+ gegenüber Na^+ und werden unter anderem durch extrazelluläres Ba^{++} sowie TEA blockiert. Das Schwellenpotential ihrer Aktivierung wird bei verminderter K^+ Versorgung der Pflanze herabgesetzt; sie werden somit durch Kaliummangel induziert (VÉRY und SENTENAC 2002).

Ein typisches Charakteristikum spannungsabhängiger Kanäle ist deren kurzzeitige Inaktivierung. Regulative Domänen verschließen einige Millisekunden nach dem Öffnen des Kanals die Kanalpore und öffnen diese erst wieder, wenn die Membran repolarisiert ist (LODISH *et al.* 1996). Die *Shaker*-Kanäle unterscheiden sich untereinander weiterhin in ihrer Spannungsabhängigkeit, Gewebelokalisation sowie Sensitivität gegenüber Kanal-Blockern. In Tab. 1.1 sind als Übersicht alle bislang aus *Arabidopsis* isolierten *Shaker*-Kanäle dargestellt (VÉRY und SENTENAC 2002).

| Kalium kanal | Selektivität | Aktivität | Lokalisierung (auf RNA-Ebene, bzw. elektrophysiologisch) | Referenz |
|--------------|--|--------------------------------------|---|--|
| KAT1 | K ⁺ (Rb ⁺ , nicht Na ⁺) | Einwärtsgleichrichtend ¹⁾ | Schließzelle | DREYER <i>et al.</i> (1999) |
| KAT2 | K ⁺ (Rb ⁺ , nicht Na ⁺) | Einwärtsgleichrichtend ¹⁾ | Schließzelle, Blatt-Phloem, Blüte | PILOT <i>et al.</i> (2001) LACOMBE <i>et al.</i> (2000a) |
| AKT1 | K ⁺ (nicht Na ⁺) | Einwärtsgleichrichtend ¹⁾ | Wurzel Cortex und Epidermis, Wurzelhaare, Mesophyll, Schließzelle | DENNISON <i>et al.</i> (2001) IVASHIKINA <i>et al.</i> (2001) SZYKORI <i>et al.</i> (2001) HIRSCH <i>et al.</i> (1998) GAYMARD <i>et al.</i> (1996) SENTENAC <i>et al.</i> (1992) |
| SPIK | K ⁺ (Rb ⁺ , nicht Na ⁺) | Einwärtsgleichrichtend ¹⁾ | Pollen | MOULINE <i>et al.</i> (2002) |
| AKT2/3 | K ⁺ (nicht Na ⁺) | Ein- / Auswärtsgleichrichtend | Phloem, Blatt: Epidermis, Schließzelle, Mesophyll, | LACOMBE <i>et al.</i> (2000a) |
| SKOR | K ⁺ , Rb ⁺ (Ca ⁺⁺ nicht Na ⁺) | Auswärtsgleichrichtend ²⁾ | Perizykel (Wurzel), Xylemparenchym (Wurzel), Pollen | MOULINE <i>et al.</i> (2002) LACOMBE <i>et al.</i> (2000b) GAYMARD <i>et al.</i> (1998) |
| GORK | K ⁺ | Auswärtsgleichrichtend ²⁾ | Schließzelle, Stiel, Blüte, Wurzelhaar | IVASHIKINA <i>et al.</i> (2001) ACHE <i>et al.</i> (2000) |
| AKT6 | K ⁺ (wahrsch.) | ? | Blüte | LACOMBE <i>et al.</i> (2000a) |
| AtKC1 | K ⁺ (wahrsch.) | ? | Wurzel, Blätter, Wurzelhaar | REINTANZ <i>et al.</i> (2002) IVASHIKINA <i>et al.</i> (2001) LACOMBE <i>et al.</i> (2000a) |

Tab. 1.1: Übersicht der bisher aus *Arabidopsis* isolierten neun *Shaker* Kanäle. (Nach VÉRY und SENTENAC 2002, verändert.)

Abkürzungen: ¹⁾: Die Aktivität des Kanals ist unabhängig von der externen Kaliumkonzentration.

²⁾: Die Aktivierung des Kanals ist abhängig vom externen Kaliumgehalt.

KAT1: K⁺ transporter *Arabidopsis thaliana* 1

KAT2: K⁺ transporter *Arabidopsis thaliana* 2

AKT1: *Arabidopsis* K⁺ Transporter 1

SPIK: Shaker Pollen inward K⁺ channel

AKT2/3: *Arabidopsis* K⁺ Transporter 2/3

SKOR: Stelar K⁺ outward rectifying channel

GORK: Guard Cell outward rectifying channel

AKT6: *Arabidopsis* K⁺ Transporter 6

AtKC1: *Arabidopsis thaliana* K⁺ channel 1

Aus *Populus* wurden bislang drei Kanäle der *Shaker*-Familie isoliert (PTORK, PTK2 und KPT1) Nach Aminosäuren-Sequenzvergleich konnten sie der SKOR, AKT 2/3 beziehungsweise KAT1- Unterfamilie zugeordnet werden (Abb. 1.5).

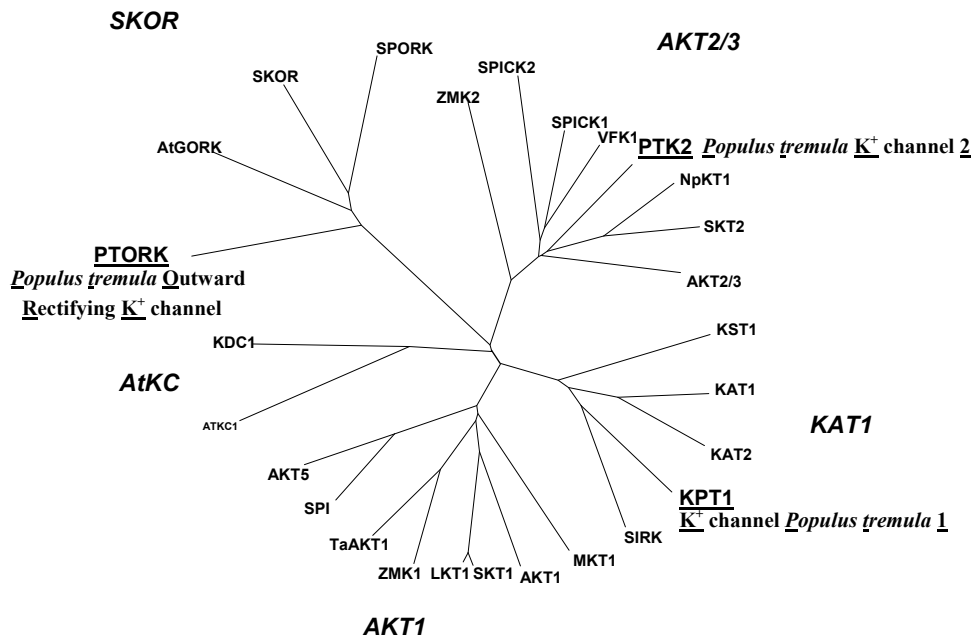


Abb. 1.5: Phylogenetischer Baum pflanzlicher *Shaker*-Kanäle mit hervorgehobenen Pappel-Kanälen PTK2, PTORK und KPT1 (aus LANGER *et al.* 2002).

1.5 Zielstellung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die anatomische und physiologische Analyse der Bedeutung von Kalium für die Prozesse der Holzbildung. Der zentrale Ansatzpunkt war die gezielte Variation der Kaliumversorgung von Versuchspflanzen während ihrer Wachstumszeit, um hieraus Aussagen über die Bedeutung und funktionelle Einbindung von Kalium in die Prozesse der Holzbildung abzuleiten. Insbesondere sollten mögliche Zusammenhänge zwischen der Kaliumernährung, dem Kaliumhaushalt der Holzbildungszone¹ und der Ausbildung holzanatomischer und holzchemischer Charakteristika gezeigt werden. Weiterhin sollten erste Einblicke in die physiologischen Grundlagen des zellulären Kaliumhaushaltes der Holzbildungszone gewonnen werden. Hierfür wurden Untersuchungen von Membranproteinen, die an der Regulation des zellulären Kali-

¹ Als Holzbildungszone wird im Folgenden der Gewebebereich des vaskulären Cambiums und der angrenzenden Xylemdifferenzierungszone bezeichnet.

umhaushalts beteiligt sind, in die Arbeit miteinbezogen. Immunohistochemische Untersuchungen von Kaliumkanalproteinen und der bei der Kaliumaufnahme involvierten PM H^+ -ATPase bildeten somit einen weiteren Schwerpunkt. Es ergaben sich folgende Einzelziele:

- Analyse des Einflusses der Kaliumernährung auf den Elementgehalt, das osmotische Potential sowie die cambiale Aktivität der Holzbildungszone.
- Untersuchung des Einflusses der Kaliumernährung auf den Gehalt osmotisch aktiver Stoffwechselmetabolite (Malat, Saccharose, Glucose und Fructose) im Bereich der Holzbildungszone.
- Ultrastrukturelle Analyse cambialer Zellen in Abhängigkeit von der Kaliumernährung.
- Überprüfung des Einflusses der Kaliumernährung auf die Ausbildung holzanatomischer und holzchemischer Charakteristika.
- Untersuchung des Einflusses von Abscisinsäure auf den Kaliumhaushalt der Holzbildungszone.
- Immunohistochemische Lokalisation der PM H^+ -ATPase und Überprüfung des Zusammenhangs zwischen dem Ernährungsstatus der Versuchspflanzen und dem Auftreten des Enzyms im Stammgewebe.
- Immunohistologische Lokalisation der Kaliumkanäle PTK2 sowie PTORK und Überprüfung der saisonalen Abhängigkeit des Auftretens dieser Kaliumkanäle im Stammgewebe.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Für alle Untersuchungen dieser Arbeit wurden Hybridpappeln (*Populus tremula x tremuloides*) verwendet (Abb. 2.1). Die Pflanzen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. von Wühlisch, Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Bundesanstalt für Forst- und Holzwirtschaft¹ zur Verfügung gestellt. Die Bäume waren aus dem Saatgut eines einzelnen Elternpaares angezogen (Vollgeschwister) und hatten einen einheitlichen morphologischen Habitus. Bei Versuchsbeginn waren die Pflanzen einjährig und im Winterzustand. Im Rahmen des Forschungsschwerpunktes „Molekulare Analyse des Holzwachstums“ bestand eine enge Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Hedrich², die ebenfalls an *P. tremula x tremuloides* arbeitete.



Abb. 2.1: Für die anatomischen Untersuchungen angezogene Hybridpappeln (*P. tremula x tremuloides*).

¹ Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Bundesanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Sieker Landstr. 2, 22927 Großhansdorf.

² Julius-von-Sachs-Institut, Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg, Julius-von-Sachs-Platz 2, 97082 Würzburg.

2.2 Anzucht der Pflanzen bei unterschiedlicher Mineralstoffversorgung

Die Versuchspflanzen wurden in einem nährstoffarmen Bodensubstrat angezogen. Dabei handelte es sich um ein Gemisch aus Quarzsand und einem handelsüblichen Holzfasersubstrat für den Gartenbau (Toresa¹). Mittels Energiedispersiver Röntgenanalyse (EDXA) konnte belegt werden, dass der Gehalt an mineralischen Nährstoffen in dem verwendeten Bodensubstrat sehr gering ist (Abb. 2.2). Kalium konnte in beiden Fraktionen des Bodensubstrates nicht nachgewiesen werden.

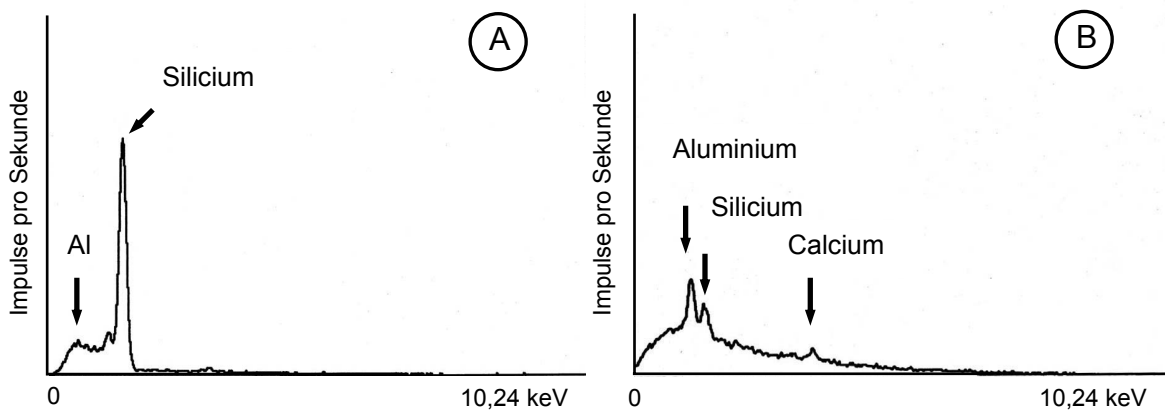


Abb. 2.2: EDXA-Spektren von Quarzsand (A) und Toresa (B). Aluminiumgehalte sind methodisch bedingt durch Streustrahlung aus dem verwendeten Rasterelektronenmikroskop.

Um den Einfluss von Kalium auf die Prozesse der Holzbildung zu untersuchen, wurden 150 Versuchspflanzen in drei Gruppen aufgeteilt und mit jeweils unterschiedlichen Mengen an Kalium in Nährlösung versorgt (Tab. 2.1). Dabei wurden Nährlösungen in Anlehnung an eine bei HOAGLAND und ARNON (1950) beschriebenen Rezeptur verwendet. Zur Reduzierung des Kaliumgehaltes der Nährlösung wurde KNO_3 in entsprechender Weise durch $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ersetzt. Zur Erhöhung des Kaliumgehaltes der Nährlösungen wurde dagegen zusätzlich KNO_3 hinzugefügt. Hierdurch ergab sich in den verwendeten Nährlösungen neben einem unterschiedlichen Gehalt an Kalium auch ein unterschiedlicher Gehalt an Magnesium. Durch elementanalytische Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass Magnesium nicht in der Holzbildungszone des Stammes akkumuliert wird, so dass davon auszugehen ist, dass Mg^{2+} keine besondere Rolle bei der Holzbildung spielt. Die resultierende Konzentration an Kalium in den modifizierten Nährlösungen betrug 10.05 mM K^+ , 5.05 mM K^+ und 0.05 mM K^+ . Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden diese Konzentrationen im Folgenden als gerundete Werte (10 mM

¹ Bezugsquelle: Intertoresa AG, Baslerstr. 42, 4665 Oftringen, Schweiz.

K^+ , 5 mM K^+ , 50 $\mu M K^+$) angegeben. Die Versorgung der Pflanze mit 5 mM Kalium entspricht einer normalen Kaliumversorgung (Kontrollvariante). 50 μM Kalium in Nährlösung entsprechen einer reduzierten und 10 mM Kalium in Nährlösung entsprechen einer verbesserten Kaliumversorgung. Der pH-Wert der Nährlösungen wurde auf den Wert 5,8 eingestellt.

| | 10 mM K^+ (K^+ plus) | 5 mM K^+ (K^+ normal) | 50 $\mu M K^+$ (K^+ minus) |
|--------------|--|---|--|
| KNO_3 | 10 mM | 5 mM | - |
| $Mg(NO_3)_2$ | - | 2,5 mM | 5 mM |
| $Ca(NO_3)_2$ | 5 mM | 5 mM | 5 mM |
| $MgSO_4$ | 2 mM | 2 mM | 2 mM |
| NaH_2PO_4 | 1 mM | 1 mM | 1 mM |
| KCl | 50 μM | 50 μM | 50 μM |
| Fe-EDTA | 40 μM | 40 μM | 40 μM |
| H_3BO_3 | 25 μM | 25 μM | 25 μM |
| $MnSO_4$ | 5 μM | 5 μM | 5 μM |
| $ZnSO_4$ | 2 μM | 2 μM | 2 μM |
| $CuSO_4$ | 0.5 μM | 0.5 μM | 0.5 μM |

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der für die Anzucht der Versuchspflanzen verwendeten Nährlösungen. Der pH-Wert der Nährlösungen betrug 5,8.

Die Versuchspflanzen wurden in dem beschriebenen Bodensubstrat in Töpfen mit einem Durchmesser von 30 cm oder 90 cm angezogen. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte während der Vegetationszeit im Freiland, beziehungsweise während der Wintermonate unter Raumbedingungen bei einer Lichtintensität von $500 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ und einer Beleuchtungszeit von 14 Stunden.

Mittels Atomabsorptionsspektrometrie wurde der Kaliumgehalt von Regenwasser bestimmt. Da die Kaliumkonzentration im Regenwasser deutlich geringer ist als 1 mg/l, kann die zusätzliche niederschlagsbedingte Kaliumversorgung der Pflanzen bei den durchgeführten Freilandversuchen vernachlässigt werden.

In einem zusätzlichen Wachstumsversuch wurden weitere Varianten angezogen, die bei Kaliummangelbedingungen mit normalen Mengen an Natrium (1 mM) versorgt wurden oder keine Natriumversorgung erhielten (Tab. 2.2). Die Pflanzen wurden unter oben genannten Bedingungen im Labor für einen Zeitraum von sechs Wochen angezogen.

| | 50 $\mu\text{M K}^+$ (mit Na^+) | 50 $\mu\text{M K}^+$ (ohne Na^+) |
|--|--|---|
| KNO_3 | - | - |
| $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ | 5 mM | 5 mM |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ | 5 mM | 5 mM |
| MgSO_4 | 2 mM | 2 mM |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{MgHPO}_4$ | 1 mM NaH_2PO_4 | 1 mM MgHPO_4 |
| KCl | 50 μM | 50 μM |
| Fe-EDTA | 40 μM | 40 μM |
| H_3BO_3 | 25 μM | 25 μM |
| MnSO_4 | 5 μM | 5 μM |
| ZnSO_4 | 2 μM | 2 μM |
| CuSO_4 | 0.5 μM | 0.5 μM |

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der Nährlösungen zur Anzucht von Pflanzen unter Kaliummangel und bei unterschiedlicher Natriumversorgung. Der pH-Wert der Nährlösungen betrug 5,8.

2.3 Anatomische Untersuchungen

2.3.1 Mazeration

Zur Längenbestimmung von Holzfasern (Libriformfasern) wurde zunächst durch Mazeration der Zellverband des Holzgewebes aufgelöst (vgl. GERLACH 1969). Zu diesem Zweck wurden Späne des zu untersuchenden Holzes für 10 min in 10 % HNO_3 gekocht und anschließend mit H_2O (bidest.) säurefrei gespült. Zur schonenden Auflockerung der Holzfasern wurden die Proben nach Zugabe von 10 % (w/v) SDS für 30 min bei 50 °C in ein Ultraschallbad (Merck USR 30H, $f=35$ kHz) eingestellt. Nach kurzem Spülen mit H_2O (bidest.) wurden die Fasern auf Objektträger übertragen, im Lichtmikroskop (Axiophot, Zeiss) betrachtet und mit einer digitalen Camera (Axiocam, Zeiss) aufgenommen (Abb. 2.3).

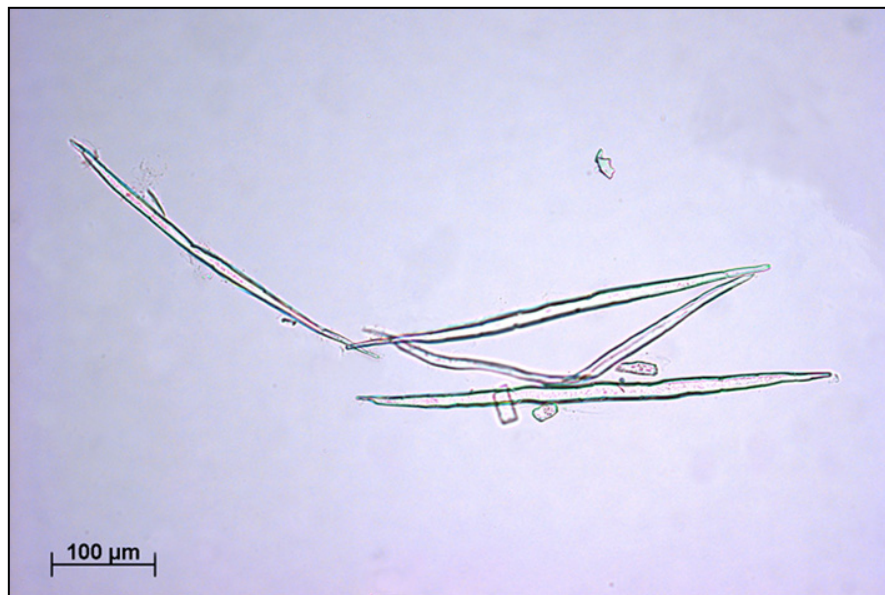


Abb. 2.3: Für die Faserlängenmessung mazerierte Holzfasern.

2.3.2 Anfertigung von Gewebeschnitten für die Lichtmikroskopie

Für Untersuchungen am Lichtmikroskop wurden 1 cm lange Proben für 2 h mit 4 % (w/v) Formaldehyd (frisch depolymerisiert aus Paraformaldehyd) in PBS pH 7,0 fixiert, anschließend in Puffer gespült, in ansteigenden Konzentrationen von Ethanol entwässert und in Gelatine kapseln mit LR-White Acrylharz eingebettet. Die Polymerisation der Proben erfolgte bei 60 °C für 24 Stunden.

Von den eingebetteten Gewebeproben wurden an einem Mikrotom (MT - X, RMC Inc.) Semidünnschnitte mit einer Schnittdicke von 1 µm angefertigt. Diese wurden auf Objektträger übertragen, mit Toluidin O angefärbt, im Lichtmikroskop (Axiophot, Zeiss) betrachtet und mit einer digitalen Camera (AxioCam, Zeiss) fotografisch festgehalten.

2.3.3 Histometrische Auswertung

Histometrische Messungen erfolgten an digitalen Aufnahmen von Gewebeschnitten (Kap. 2.3.2) sowie von mazerierten Fasern (Kap. 2.3.1) mit Hilfe von digitalen Messfunktionen der Kamerasoftware Axio Vision 3.1 von Zeiss. Für die histometrischen Messungen an Gefäßen und Fasern wurden je Versuchsvariante drei Bäume ausgewertet. Die Bestimmung des radialen Holzzuwachses wurde nach Abschluss der Wachstumsphase an je 10 Versuchspflanzen durchgeführt. Dabei wurde an Stammquerschnitten der Versuchspflanzen der radiale Holzzuwachs des letzten Jahrrings in vier Richtungen (90°, 180°, 270° und 360°) gemessen.

2.3.4 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zweigproben mit einer Länge von 1 cm wurden geviertelt und für 2 h mit 1 % (w/v) Formaldehyd, 5 % (v/v) Glutaraldehyd, 1mM EGTA in 50 mM Cacodylat-Puffer (pH 7.0) fixiert. Nach dem Waschen in Pufferlösung wurden die Proben mit 2 % (w/v) Osmiumtetroxid in Puffer über Nacht bei 4 °C nachfixiert, in H₂O (bidest.) gewaschen und in 1 % (w/v) Uranylacetat in 10 % Ethanol für 30 min nachkontrastiert. Die Proben wurden stufenweise in Ethanol entwässert und nach zweimaligem Tränken in einem 1:1 Ethanol –Epoxydharz (Spurr's) Gemisch erfolgte die Einbettung in reines Epoxydharz (SPURR, 1969). Die Polymerisation erfolgte bei 70 °C für 12 Stunden. Für die Beobachtung am Transmissionselektronenmikroskop wurden an einem Ultramicrotom

(Ultratome Nova, LKB) Ultradünnschnitte von 80 - 100 nm angefertigt, auf mit Formvar beschichtete Kupfergrids (100 mesh) überführt und mit alkalischer Bleicitratlösung (REYNOLDS 1963) für 10 min bei Raumtemperatur nachkontrastiert. Die Beobachtung der Ultradünnschnitte erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop (EM 10 C, Zeiss) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV und 2.500 - 100.000facher Vergrößerung. Fotografische Aufnahmen wurden auf AGFA SCIENTIA EM Planfilm angefertigt.

2.4 Chemische Analyse der Holzzusammensetzung

2.4.1 Darstellung des Verholungsgrades im Lichtmikroskop

Zweigstücke mit einer Länge von 3 cm wurden in 3 % (w/v) Formaldehyd (frisch depolarisiert aus Paraformaldehyd) und 3 mM EGTA, gelöst in PBS (pH 7,2), für 45 min fixiert. Nach kurzem Waschen mit H₂O (bidest.) wurden mit einem Schlittenmikrotom 40 µm dicke Schnitte angefertigt. Zur Darstellung des Verholungsgrades wurden die Schnitte zunächst für 5 min mit einer 1%igen (w/v) wässrigen Malachitgrünlösung und nach zweimaligem Waschen mit H₂O (bidest.) für 7 min mit einer 0,1 %igen wässrigen Acridinorangelösung (w/v) angefärbt (v. AUFSEB, 1973). Die Schnitte wurden nach zweimaligem Waschen in H₂O (bidest.) am Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss) mit einer Filterkombination von Erregerfilter (365 nm), Farbteiler (395 nm) und Sperrfilter (420 nm) beobachtet und mit einer digitalen Kamera (Axiocam, Zeiss) fotografiert.

2.4.2 Bestimmung des Extraktgehaltes

Luftgetrocknete Holzproben wurden in einer Kugelmühle (Retsch) gemahlen, konstantgewogen und in einem Soxhletextraktor zunächst für 6 Stunden mit Cyclohexan / Ethanol (2:1) und anschließend für 4 Stunden mit Ethanol extrahiert. Die resultierenden Lösungen wurden in konstant gewogene Kolben überführt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (Büchi) abdestilliert. Der Rückstand wurde im Vakuumexsikkator getrocknet und der Kolben mit dem Rückstand wiederum konstant gewogen. Aus der Gewichts Differenz der konstant gewogenen Kolben und der bekannten Einwaage des konstantgewogenen Holzmehls wurde der Extraktstoffgehalt bestimmt.

2.4.3 Bestimmung des Ligningehaltes

Der Ligningehalt wurde an extraktfreiem Holzmehl (Extraktion siehe 2.4.2) nach der Methode von RUNKEL und WILKE (1951) bestimmt. Eine konstant gewogene Menge Holzmehl wurde mit 72 %iger H_2SO_4 und 40 %iger HBr für 2 Stunden hydrolysiert. Anschließend wurde die Lösung mit H_2O (bidest.) fünffach verdünnt, für 5 min gekocht und der Hydrolyserückstand mit einem konstant gewogenem Papierfilter abgefiltert. Nach dem Waschen des Filters mit H_2O (bidest.) wurde dieser wiederum konstant gewogen. Der Hydrolyserückstand im Filter entspricht dem Ligningehalt der Probe. Zusätzlich wurde der Gehalt an säurelöslichem Lignin des Filtrats über UV-Spektroskopie (PU 8700 UV / VIS Scanning spectrofotometer, Philips) bestimmt.

2.4.4 Bestimmung des Cellulosegehaltes

Der Cellulosegehalt der Proben wurde in Anlehnung an eine Methode von FENGEL und WEGENER (1979) bestimmt. Eine konstantgewogene Menge extraktfreies Holzmehl wurde hierfür in einem dreistufigen Verfahren mit Trifluoressigsäure bei 110 °C hydrolysiert. Zur Bestimmung der Glucosegehalte wurden die trockenen, säurefreien Hydrolysate in einem automatischen Zuckeranalysator (Biotronik, LC 2000) analysiert. Der ermittelte Glucosegehalt gab den Gesamtglucoseanteil aller Polysaccharide der Probe wieder. Aus den Glucosegehalten wurde nach Literaturangaben der Polyosenzusammensetzung (FENGEL und WEGENER 1989; ÖNNERUD und GELLERSTEDT 2003) unter Berücksichtigung des Wassergehaltes der Cellulosegehalt der Proben errechnet.

2.5 Elementanalysen

2.5.1 Energiedispersive Röntgenanalyse (EDXA) am Rasterelektronenmikroskop (REM)

Von ein- bis zweijährigen Zweigen wurden mit einer Rasierklinge Proben auf eine Länge von 0,5 cm zugeschnitten, in gefrierendem Isopentan schockgefroren und anschließend gefriergetrocknet (Gefrier Trocknungsanlage GT2 - E, LYOVAC). Zur Analyse wurden die Proben in einem Sputtergerät (K 575, EMITECH) 2 min bei 90 mA mit Chrom beschichtet. Die semiquantitative Bestimmung der Elemente des Stammgewebes erfolgte am Rasterelektronenmikroskop (REM AMR 1200 B, LEITZ) in Kombination mit einer energiedispersiven Röntgenanalyse (EDXA, KEVEX 4000). Mit dem verwendeten EDXA-Gerät ließen sich alle Elemente ab der Ordnungszahl 9 (Fluor) registrieren.

Für die Elementanalyse wurde bei einer Beschleunigungsspannung von 15 kV und 1000facher Vergrößerung der zu messende Gewebebereich ausgewählt. Das nach einer Analysendauer von 200 sec resultierende energiedispersive Röntgenspektrum wurde mit Hilfe eines Analogschreibers aufgezeichnet. Durch Bestimmung des Verhältnisses von Peakhöhe der elementspezifischen Röntgenstrahlung (elementspezifische K_{α} Strahlung) zum entsprechenden unspezifischen Hintergrund, wurde eine relative Maßzahl für die Massenkonzentration des jeweiligen Elementes ermittelt (Abb. 2.4).

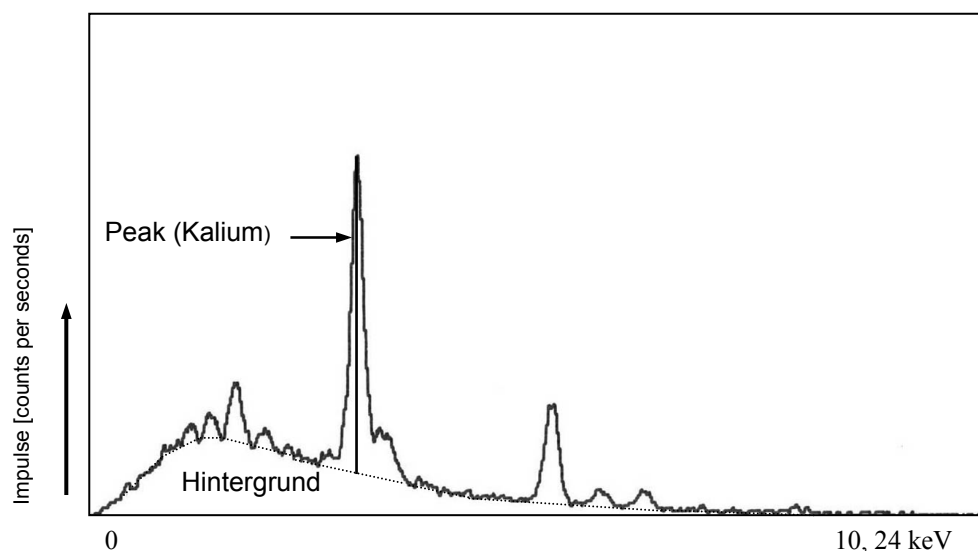


Abb. 2.4: Auswertung der energiedispersiven Röntgenspektren durch Bestimmung der Peak : Background (Hintergrund) Verhältnisse.

Neben der Analyse einzelner Gewebebereiche wurden Konzentrationsprofile des Elements Kalium über den Verlauf mehrerer Gewebebereiche angefertigt. Hierzu wurde der sequentielle Analysenmodus des EDXA/REM-Systems genutzt. Die sequentielle Analyse liefert ein Konzentrationsprofil eines zuvor definierten Elementes entlang einer festgelegten Linie über den eingestellten Analysenbereich. Der Energiebereich der für Kalium spezifischen K_{α} Röntgenstrahlung (3,31 keV) wurde als Analysenfenster festgelegt. Bei einer Beschleunigungsspannung von 15 keV und einer 100fachen Vergrößerung wurde der gewünschte Bildausschnitt eingestellt. Mit Hilfe eines elektronischen Synchronisators wurden die Scangeschwindigkeit und die Analysenzeit aufeinander abgeglichen, so dass mehrere Scandurchläufe zu einem Konzentrationsprofil aufsummiert werden konnten. Nach 100 Scan-Durchläufen wurde der resultierende Linienscan auf einem Analogschreiber aufgezeichnet.

2.5.2 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Stammgewebe von Versuchsbäumen wurde nach Entfernen der Rinde in flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage GT2 - E, LYOVAC). Der Übergangsbereich Cambium / Xylemdifferenzierung wurde mit einer Rasierklinge entnommen und zu einer Mischprobe vereinigt. Konstante Mengen (je 15 mg) wurden mit 1 ml 5 %iger HNO_3 bei Raumtemperatur 30 min extrahiert. Für die Analyse wurden die Proben 5 min bei 20 000 x g zentrifugiert und der gelöste Überstand mit 5 %iger HNO_3 1:400 verdünnt. Die Elementbestimmung wurde mittels Absorptionsmessung (Kalium), bzw. Emissionsmessung (Natrium) im Atomabsorptionsspektrometer (Perkin Elmer 2100 Atomabsorptionsspektrometer) durchgeführt.

2.6 Bestimmung des realtiven osmotischen Potentials

20 mg gefriergetrocknetes Gewebe aus dem Übergangsbereich Cambium / Xylem (siehe Kapitel 2.5.2) wurde mit 500 μ l H_2O für 60 min bei 60 °C extrahiert. Nach Zentrifugieren der Proben für 5 min bei 20 000 x g wurde durch Messung der Gefrierpunktniedrigung die osmotische Konzentration des gelösten Überstandes bestimmt (Knauer Kryoskopie - Gerät Nr. 24.00). Hieraus wurde nach WILLERT *et al.* (1995) mit Hilfe des van't Hoff'schen Gesetzes das osmotische Potential der Lösung bei 20 °C berechnet.

van't Hoff'sches Gesetz: $\Psi_{II} = -R \cdot T \cdot N / V$

Ψ_{II} : Osmotisches Potential in MPa

R: Allgemeine Gaskonstante (8,3143 J mol⁻¹ K⁻¹)

T: Temperatur in Kelvin

N / V: Konzentration des gelösten Stoffes in der Lösung

Der hierdurch bestimmte Wert gibt eine relative Maßzahl für das osmotische Potential des gesamten Gewebes (Zellwand und Zelllumen) im Übergangsbereich Cambium / Xylem wieder. Da der symplastische Anteil am eingesetzten Gewebevolumen bei weitem überwiegt, lassen die ermittelten Daten eine Aussage über das relative osmotische Potential des Zellsaftes cambialer Zellen und sich differenzierender Xylemzellen zu und ermöglichen somit einen Vergleich zwischen unterschiedlichen Versuchsvarianten. Aufgrund des sehr geringen Anteils an cambialem Gewebe und sich differenzierendem Xylemgewebe im Stammbereich war eine Gewinnung des Zellsaftes der Holzbildungszone nicht möglich. Weiterhin war es aufgrund einer sofort einsetzenden Austrocknung während der Probenahme nicht möglich die Frischmasse für das gewonnene Gewebe zu ermitteln. Aus diesen Gründen konnte keine Bezugsgröße für die Bestimmung des absoluten osmotischen Potentials der Holzbildungszone ermittelt werden.

2.7 Bestimmung organischer Osmotika (Saccharose, Glucose, Fructose und Malat)

Das Probenmaterial für die Bestimmung organischer Osmotika wurde wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben gewonnen und für 60 min mit 1 % (w/v) PVPP in H₂O (bidest) extrahiert. Nach Zentrifugieren der Proben für 5 min bei 20000 x g wurden die Konzentrationen von Saccharose, Glucose, Fructose und Malat im gelösten Überstand mit Hilfe eines enzymatischen Kits (Boehringer Mannheim) fotometrisch (PU 8700 UV / VIS Scanning spectrofotometer, Philips) bestimmt.

2.8 Immunologische Nachweisverfahren

Für die immunologischen Nachweise der Kaliumkanäle PTK2 (*Populus tremula* K^+ channel) und PTORK (*Populus tremula* outward rectifying K^+ channel) wurden affinitätsgereinigte Peptidantikörper gegen Aminosäuresequenzen vom N-Terminus der entsprechenden Kaliumkanalproteine verwendet. Die N-Termini beider Kanäle besitzen eine relativ spezifische Sequenzstruktur, die eine Abgrenzung zu anderen Kanalproteinen ermöglicht. Während der für den Nachweis des Kaliumkanals PTK2 verwendete Antikörper gegen das Peptid KNYQEHDSENPHQEEDDSP (19 Aminosäuren) gerichtet ist, erkennt der für den Nachweis des Kaliumkanals PTORK verwendete Antikörper das Peptid MMMIQGRERTRGGVGNNGDG (20 Aminosäuren). Die Aminosäuresequenzen beider Kanalproteine wurden durch die Arbeitsgruppe Hedrich (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt (siehe Dissertation LANGER 2003; LANGER *et al.* 2002). Alle Schritte der Antikörperproduktion, einschließlich der Peptidsynthese wurden von der Firma Biogenes, Berlin durchgeführt. Die Spezifität der Antikörper gegenüber dem jeweiligen Kanalprotein wurde mittels Westernblot nachgewiesen.

Für den immunologischen Nachweis der Plasmamembran H^+ -ATPase (PM H^+ -ATPase) wurde der monoklonale Antikörper 46 E5 B11, subclone F6 verwendet. Dieser gegen die PM H^+ -ATPase von *Zea mays* produzierte Antikörper (LÜTZELSCHWAB 1990) zeigt eine spezifische Kreuzreaktivität gegenüber der PM H^+ -ATPase anderer pflanzlicher Spezies, wie zum Beispiel *Cucurbita pepo*, *Elodea canadensis* (BAUR *et al.* 1996) oder *Populus trichocarpa* (AREND *et al.* 2002). Die erforderliche Spezifität des Antikörpers gegenüber *P. tremula x tremuloides* wurde mittels Immunoblot (Westernblot) überprüft.

2.8.1 SDS-PAGE und Western Blot-Analyse

Für den Nachweis der Spezifität der Peptidantikörper gegenüber dem jeweiligen Kaliumkanal wurden die c-RNAs von PTK2 und PTORK in Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert (BECKER *et al.* 1996). Als Kontrolle wurden nicht veränderte Oozyten verwendet. Von mikrosomalen Fraktionen der Oozyten wurden jeweils 30 μ g Gesamtprotein auf ein 8 %iges SDS-Polyacrylamid Minigel aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde mit Laemmli's Puffer (LAEMMELI 1970) bei 20 mA durchgeführt und die separierten Proteine bei konstanter Stromstärke (70 mA) auf eine PVDF-Membran übertragen (TOWBIN *et al.* 1979). Die Präparation der Oozyten wurde von Herrn Dietmar Geiger,

die SDS-Gelelektrophorese sowie der elektrophoretische Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran von Herrn Dr. Dirk Becker, beide von der Arbeitsgruppe Hedrich¹, Universität Würzburg durchgeführt.

Der immunochemische Nachweis der Kanalproteine erfolgte auf der PVDF-Membran. Zur Verringerung unspezifischer Bindungen wurde diese für 2 h mit 5 % (w/v) BSA in TBS blockiert und anschließend für 1 h mit Peptidantikörper aus Kaninchen in einer Verdünnung von 1:400 in TBS mit 1 % (w/v) BSA inkubiert. Nach dem Waschen in TBS-T erfolgte für 1 h die Inkubation mit 1 nm Gold markiertem, gegen Kaninchen gerichteten sekundären Antikörper aus Ziege (British Biocell, UK) in einer Verdünnung von 1:400 in TBS mit 1% (w/v) BSA. Nach gründlichem Waschen in TBS-T und H₂O (bidest.) wurden die Markierungen auf der Membran mit einem Silberverstärkungskit (British Biocell, UK) sichtbar gemacht.

Für den immunochemischen Nachweis der PM H⁺-ATPase wurde 0,4 g Stammgewebe in einem eisgekühlten Mörser mit 3 ml Pufferlösung bestehend aus 75 mM Tris, 1 mM EGTA und 1% (v/v) Proteaseinhibitorcocktail homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat durch einen Gazefilter aufgenommen und für 30 min bei 4 °C und 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in einer Pufferlösung aus 75 mM Tris, 2 % (w/v) SDS, 3 % (v/v) Mercaptoethanol und 1 % (v/v) Proteaseinhibitorcocktail extrahiert. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurden die ungelösten Bestandteile bei 15 000 x g abzentrifugiert und der gelöste Überstand mit 10 % (v/v) Glycerol und 5 % (v/v) gesättigter Bromphenolblaulösung versetzt.

Um pro Elektrophoresebahn gleiche Mengen an Protein einsetzen zu können wurde die Proteinmenge der Proben im SDS-haltigen Probenpuffer nach einer Methode von ZAMAN und VERWILGHAN (1979) bestimmt.

20 µg Protein wurden auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen und in einem Mini-Elektrophoresesystem (Protean III, Biorad) bei 60 mA mit Laemmli's Puffer aufgetrennt. Separierte Proteine wurden nach der Elektrophorese in einer Tank-Transfereinheit (Mini Trans Blot, Bio Rad) auf eine PVDF-Membran übertragen (TOWBIN et al. 1979). Der immunologische Nachweis der PM H⁺-ATPase auf der Blotmembran erfolgte nach dem oben beschriebenen Verfahren. Als primärer Antikörper wurde der mo-

¹ Julius-von-Sachs-Institut, Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg,

noklonale Maus Antikörper 46 E5 B11 eingesetzt, als sekundärer Antikörper ein 1 nm Gold markierter anti Maus Antikörper aus Ziege (British Biocell, UK).

2.8.2 Immunofluoreszenzmikroskopie

Für die histochemische Lokalisierung der Kaliumkanäle PTK2 und PTORK sowie der PM H⁺-ATPase wurden Proben von ein- bis zweijährigem Stammgewebe für 1 h mit 3% (w/v) Formaldehyd (frisch depolymerisiert aus Paraformaldehyd) und 3 mM EGTA in PBS fixiert. Nach kurzem Spülen in PBS wurden mit einem Schlittenmikrotom Gewebeschnitte von 40 µm angefertigt. Nach mehrmaligem Spülen in PBS mit 0,2 % (v/v) Tween (PBS-T) wurden zur Verringerung unspezifischer Antikörperbindungen die Schnitte für 30 min in 100 mM Glycin in PBS-T und für 60 min in 5 % (w/v) BSA in PBS-T blockiert und anschließend dreimal mit PBS-T gewaschen.

Nach kurzem Waschen in PBS wurden die Schnitte entweder bei 4 °C über Nacht oder bei 35 °C für 1 h mit spezifischem primären Antikörper in PBS mit 1 % (w/v) BSA inkubiert. Dabei wurden die spezifischen Antikörper folgendermaßen verdünnt:

PTK2 1:500; PTORK 1:250; PM H⁺-ATPase 1:1000. Nach gründlichem Spülen in PBS-T und PBS erfolgte eine Inkubation für 1 h mit einem fluoreszenzmarkiertem (Cy3) Ziege anti Kaninchen Fab-Fragment (Dianova, Hamburg). Als Kontrollen wurden Gewebeschnitte mit Peptidgesättigtem Antikörper inkubiert. Hierfür wurden jeweils 5 µl spezifischer Antikörper mit 2,5 mg des entsprechenden Peptids in PBS durch Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt.

Für die Immunolokalisation der PM H⁺-ATPase wurde bei Kontrollproben der spezifische Antikörper durch unspezifisches Maus-Immunglobulin (Sigma) in einer Verdünnung von 1:200 in PBS mit 1 % (w/v) BSA ersetzt. Nach gründlichem Spülen in PBS-T und PBS erfolgte eine Inkubation für 1 h mit einem fluoreszenzmarkiertem (Cy3) Schaf anti Maus Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 in PBS mit 1 % (w/v) BSA bei 35 °C.

Im Anschluss wurden die Schnitte gründlich mit PBS-T und PBS gewaschen, auf Objektträger übertragen und im Fluoreszenzmikroskop mit einer Filterkombination von Erregerfilter (546 nm), Farbteiler (575 nm) und Sperrfilter (590 nm) betrachtet. Mit einer

digitalen Camera (Axiocam, Zeiss) wurden die Immunofluoreszenzmarkierungen fotografisch festgehalten.

2.8.3 Immunogold-Transmissionselektronenmikroskopie

Für die Feinlokalisierung der Kaliumkanalproteine auf zellulärer Ebene wurden 1 cm lange Stammstücke geviertelt und für 60 min in einer Lösung aus 3 % (w/v) Formaldehyd (frisch depolymerisiert aus Paraformaldehyd) und 3 mM EGTA in PBS, pH 7,2 fixiert. Nach mehrmaligem Spülen in PBS wurden die Proben in ansteigenden Ethanol-Konzentrationen schrittweise entwässert, in Gelatinekapseln in LR-White Acrylharz eingebettet und über 24 Stunden bei 60 °C ausgehärtet.

Von den eingebetteten Gewebeproben wurden an einem Ultramicrotom (Ultratome Nova, LKB) Ultradünnschnitte von 80 - 100 nm angefertigt und auf Formvar beschichtete Nickelgrids (100 mesh) überführt. Da bei der Verwendung Formvar beschichteter Grids eine sehr starke unspezifische Hintergrundmarkierung zu beobachten war, wurden bei späteren Versuchen kohlebedampfte Nickelgrids (Gefrierätzanlage, Balzers BAF 400) verwendet. Hiermit konnte das Auftreten unspezifischer Hintergrundbindungen deutlich reduziert werden.

Zur Verringerung unspezifischer Antikörperbindungen wurden desweiteren die Schnitte für 30 min in 100 mM Glycin in PBS-T und für 60 min in 5 % (w/v) BSA in PBS-T blockiert. Nach kurzem Waschen in PBS wurden die Schnitte für 2 h bei 35 °C mit spezifischem primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:400 in PBS mit 1% (w/v) BSA inkubiert. Für die Kontrolle wurden mit Peptid abgesättigte Antikörper in einer Verdünnung von 1:400 in PBS mit 1 % (w/v) BSA verwendet. Nach mehrmaligem Spülen in PBS-T und PBS erfolgte für 1 h bei 35 °C die Inkubation mit 1 nm-Gold markierten, gegen Kaninchen gerichteten sekundären Antikörper aus Ziege (British Biocell, UK) in einer Verdünnung von 1:400 in PBS mit 1 % (w/v) BSA. Zur Verstärkung der Goldmarkierung wurden die Schnitte nach gründlichem Waschen in PBS-T, PBS und H₂O (bidest.) für 5 min mit einem Silberverstärkungskit (British Biocell, UK) entwickelt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der Kaliumernährung auf den Phänotyp der Versuchspflanzen

Um den Einfluss von Kalium auf die Prozesse der Holzbildung zu untersuchen wurden im Freiland angezogene Hybridpappeln (*P. tremula x tremuloides*) während der Wachstumsperiode von März bis Oktober mit unterschiedlichen Mengen an Kalium versorgt. Hierzu wurden die Pflanzen in drei Gruppen aufgeteilt und regelmäßig mit 50 $\mu\text{M K}^+$ (reduzierter Kaliumversorgung), 5 mM K^+ (normaler Kaliumversorgung), bzw. 10 mM K^+ (verstärkter Kaliumversorgung) in Hoaglandscher Nährlösung bewässert (siehe Kap. 2.2). Die Pflanzen hatten zu Versuchsbeginn ein homogenes äußeres Erscheinungsbild (siehe Kap. 2.1). Nach einer Wachstumsphase von fünf Monaten waren Pflanzen mit reduzierter Kaliumernährung im Vergleich zu den beiden anderen Varianten deutlich kleiner, zudem zeigten sie kein aufrechtes Wuchsbild, sondern bildeten häufig schräg überhängende Triebe (Abb. 3.1). Bereits nach einer Wachstumsphase von sieben Wochen zeigten die Blätter der Pflanzen mit reduzierter Kaliumernährung dunkle Verfärbungen, die sich im weiteren Versuchsverlauf zu Blattnekrosen entwickelten (Abb. 3.2). Die Varianten mit normaler, bzw. verstärkter Kaliumernährung unterschieden sich in ihrem Phänotyp dagegen nicht. Vergleichbare Beobachtungen wurden an Pflanzen gemacht, die während der Winterperiode unter Raumbedingungen mit unterschiedlicher Kaliumversorgung angezogen wurden.



Abb. 3.1: Im Freiland angezogene Pflanzen nach einer Wachstumsphase von fünf Monaten. **A)** Pflanzen mit normaler Kaliumversorgung (5mM K^+) zeigten ein aufrechtes Wuchsbild. **B)** Pflanzen mit reduzierter Kaliumernährung ($50\ \mu\text{M K}^+$) bildeten schräg überhängende Triebe (Pfeile) und waren im Vergleich zu Pflanzen mit normaler Kaliumversorgung (A) deutlich in der Größe zurückgeblieben.

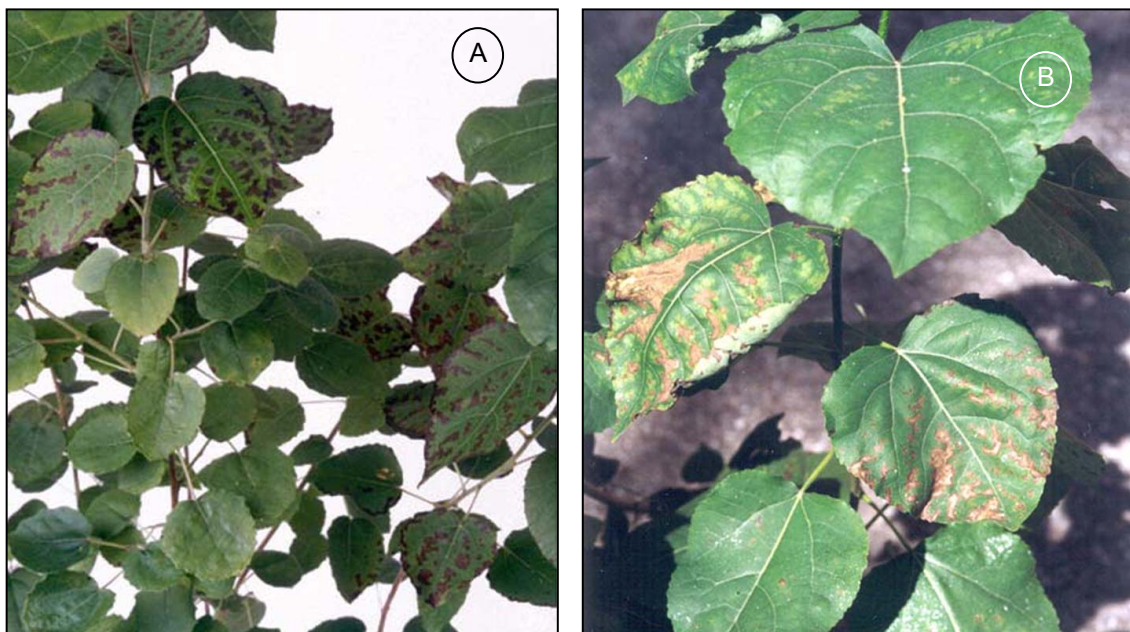


Abb. 3.2: Blattnekrosen bei reduzierter Kaliumernährung. **A)** Blätter von Pflanzen mit reduzierter Kaliumernährung nach einer Wachstumsphase von sieben Wochen. **B)** Blätter von Pflanzen mit reduzierter Kaliumernährung nach einer Wachstumszeit von 5 Monaten.

3.2 Einfluss der Kaliumernährung auf den Kaliumhaushalt der Holzbildungszone

Der Einfluss der Kaliumernährung auf die Kaliumgehalte der Holzbildungszone wurde durch mikroanalytische Röntgenanalyse (EDXA) bestimmt. Die auf mikroskopischem Niveau in Kombination mit der Rasterelektronenmikroskopie (REM) durchgeführten Analysen ermöglichten eine ortsgenaue Zuordnung von einzelnen Messwerten zu entsprechenden Gewebebereichen und Zellen der Versuchspflanzen. Zudem konnte mit dieser Methode ein Überblick über die Elementzusammensetzung des Gewebes gewonnen werden. Ausgenommen waren Elemente unterhalb der Ordnungszahl 9 (Fluor), welche durch das verwendete EDXA-System nicht registriert werden konnten. Die Kaliumgehalte der Holzbildungszone wurden sowohl an im Freiland angezogenen Versuchspflanzen bestimmt, als auch im Winter an unter Raumbedingungen angezogenen Versuchspflanzen. Die Röntgenanalyse von cambialen Zellen zeigte Kalium als auffälligstes Element (Abb. 3.3). Weiterhin waren Calcium und Phosphor regelmäßig nachweisbar. Stickstoff, als biologisch sehr bedeutsames Element, wurde messtechnisch bedingt nicht durch die EDXA erfasst. Die ermittelten Kaliumgehalte spiegelten die unterschiedlich gestaltete Ernährung der Versuchspflanzen (10 mM K⁺, 5 mM K⁺ und 50 μM K⁺) in entsprechender Weise wieder. Die nach Auswertung von Peak : Background Verhältnissen (P:B) erhaltenen relativen Kaliumwerte der cambialen Gewebezone betrugen bei reduzierter Kaliumernährung $2,4 \pm 0,3$ (P:B), bei normaler Kaliumernährung $5,4 \pm 0,88$ (P:B) und bei verstärkter Kaliumernährung $6,5 \pm 1,1$ (P:B). Somit konnte eine deutliche Abhängigkeit der Kaliumgehalte cambialer Zellen von der Kaliumernährung gezeigt werden (Abb. 3.4). Im Gegensatz zu Kalium war Magnesium, das methodisch bedingt ebenfalls in unterschiedlichen Konzentrationen angeboten wurde (vgl. Kap. 2.2 Tab. 2.1), bei allen drei Versuchsvarianten mittels EDXA nicht im Cambium nachweisbar (Abb. 3.3). Eine direkte Beeinflussung von Prozessen der Holzbildung im Bereich des cambialen Gewebes durch unterschiedliche Ernährung mit Mg⁺⁺ konnte somit ausgeschlossen werden. Es ließ sich nur für Kalium ein entsprechender Zusammenhang zwischen der Elementversorgung und dem entsprechenden Elementgehalt im Cambium zeigen.

Neben veränderten Kaliumgehalten zeigte die EDX-Analyse weitere Unterschiede in der Elementzusammensetzung des cambialen Gewebes. So war in der Versuchsvariante mit reduzierter Kaliumversorgung eine deutliche Anreicherung an Natrium und eine

überraschend hohe Akkumulation an Kupfer nachweisbar (Abb. 3.3 A). Die mit normalem, beziehungsweise verbessertem Kaliumangebot versorgten Pflanzen zeigten im Gegensatz zu den bei reduzierter Kaliumernährung gewachsenen Pflanzen weder einen nachweisbaren Gehalt an Kupfer, noch an Natrium im cambialen Gewebe. In diesen beiden Versuchsgruppen fanden sich im cambialen Gewebe nur die Elemente Kalium, Phosphor und Calcium in auswertbaren Größenordnungen (Abb. 3.3 B, C).

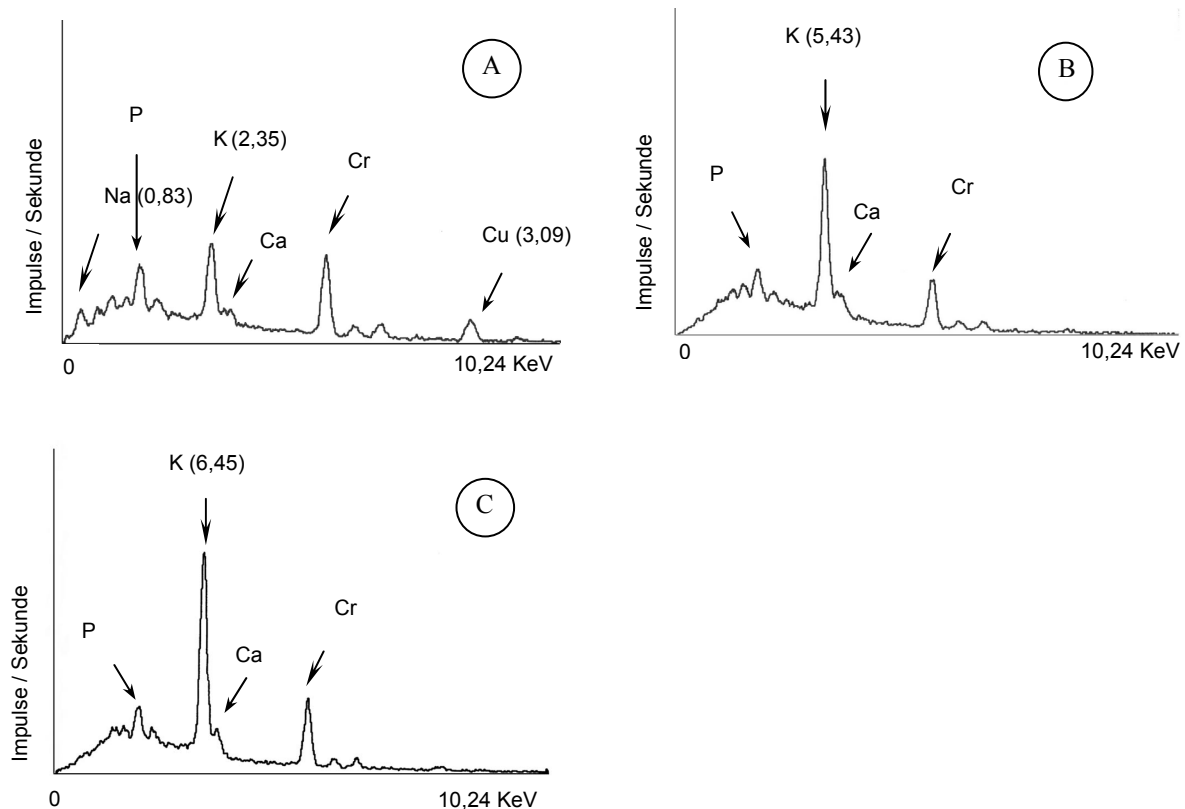


Abb. 3.3: Typische EDXA-Spektren der relativen Elementzusammensetzung des Cambiums der drei gebildeten Versuchsvarianten. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von Peak / Backgroundverhältnissen aus jeweils 10 Messungen. Die Chrom-Peaks sind methodisch bedingt (Besputterung der Proben mit Chrom).

A) Pflanze bei reduzierter Kaliumernährung ($50 \mu\text{M K}^+$ in Nährlösung). Natrium und Kupfer sind deutlich nachweisbar. **B)** Pflanze mit normaler Kaliumernährung (5 mM K^+ in Nährlösung). Nur Kalium, Phosphor und Calcium zeigten Peaks in auswertbaren Größenordnungen. **C)** Pflanze mit verbesserter Kaliumernährung (10 mM K^+ in Nährlösung). Es zeigten ebenfalls nur Kalium, Phosphor und Calcium Peaks in auswertbaren Größenordnungen.

Ergänzend zu den auf mikroskopischem Niveau im REM durchgeführten semiquantitativen Elementbestimmungen mittels EDXA wurden quantitative Bestimmungen der Kaliumgehalte der Holzbildungszone mittels Atom-Absorptions-Spektrometrie (AAS) durchgeführt. Methodisch bedingt setzte sich das im AAS analysierte Probenmaterial sowohl aus Teilen des cambialen Gewebes als auch aus Teilen des äußersten Xylemgewebes zusammen (siehe Kap. 2.5.2). Die Untersuchungen wurden an Pflanzen durchgeführt, die im Winter unter Raumbedingungen angezogen wurden. Der Kaliumgehalt betrug bei reduzierter Kaliumernährung 9 mg /g TM, bei normaler Kaliumernährung 32 mg /g TM und bei verstärkter Kaliumernährung 47 mg /g TM. Eine deutliche Abhängigkeit der Kaliumgehalte der Holzbildungszone von der Kaliumernährung konnte somit auch mittels quantitativer Messungen durch AAS gezeigt werden (Abb. 3.4).

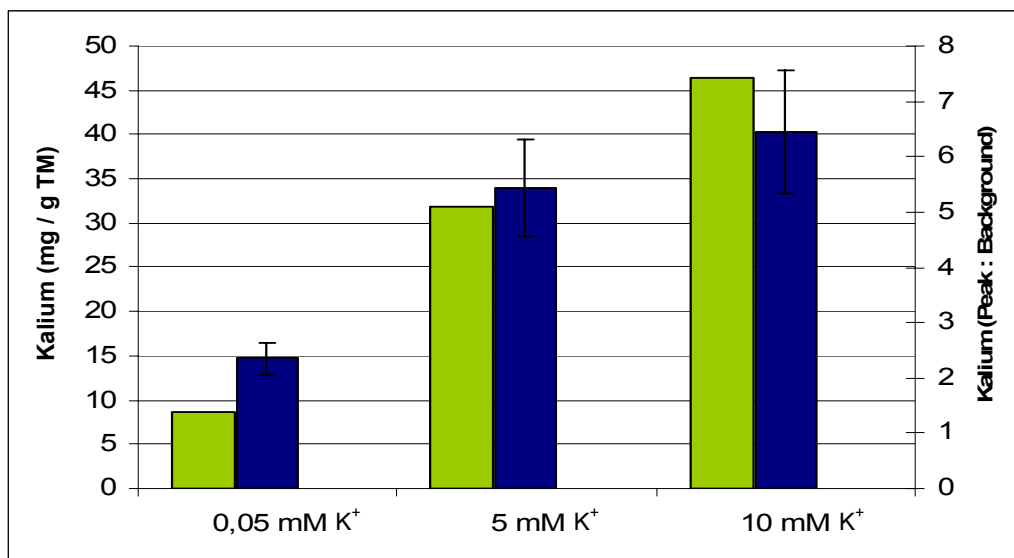


Abb. 3.4: (■) Relative Kaliumgehalte in cambialen Zellen dargestellt als Peak : Background Verhältnisse von EDX-Analysen (Mittelwerte aus je 10 Einzelmessungen). (■) Absolute Kaliumgehalte (mg / g Trockenmasse) im Gewebebereich Cambium und Xylemdifferenzierung. Die dargestellten Messwerte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen von Mischproben von 3 vollständig beernteten Bäumen.

EDX-Analysen in den einzelnen Zelltypen der Holzbildungszone zeigten außerdem deutliche Unterschiede der Kaliumwerte zwischen den Zellarten sowie eine Beeinflussung der Kaliumverteilung in Cambiumzellen, Gefäßen und Fasern der Holzbildungszone durch die Kaliumernährung. Insbesondere in cambialen Zellen und sich differenzierenden Gefäßen wurden bei normaler und verbesserter Kaliumversorgung ver-

gleichsweise hohe Kaliumwerte gemessen, während die sich differenzierenden kleinlumigen Fasern geringere Kaliumwerte aufwiesen (Abb. 3.5). Auffällig war weiterhin, dass die Verteilung des Kaliums zwischen den Zellarten der Holzbildungszone durch eine Veränderung der Kaliumernährung beeinflusst wurde. So akkumulierte sich mit zunehmender Kaliumversorgung der Pflanzen Kalium bevorzugt in den sich differenzierenden Gefäßen. Bei reduzierter Kaliumernährung ($50 \mu\text{M K}^+$) angezogene Pflanzen hatten nicht nur geringe, sondern auch in allen Zelltypen etwa gleiche Kaliumwerte: Fasern $1,98 \pm 0,39$ (P:B), Cambiumzellen $3,06 \pm 0,61$ (P:B) und Gefäße $2,72 \pm 0,82$ (P:B). Eine Erhöhung der Kaliumversorgung auf 5 mM K^+ führte zu einer Verdopplung der gemessenen Kaliumwerte: Fasern $4,07 \pm 0,59$ (P:B), Cambiumzellen $6,18 \pm 0,94$ (P:B) und Gefäße $6,36 \pm 0,90$ (P:B). Nach Steigerung der Kaliumversorgung auf 10 mM K^+ (= 200fach K^+) erhöhten sich die Kaliumwerte in Fasern auf $6,84 \pm 2,03$ (P:B) und in Cambiumzellen um das Dreifache auf $7,63 \pm 2,76$ (P:B). In sich differenzierenden Gefäßen erreichten sie maximale Werte von $11,28 \pm 1,09$ (P:B), die somit viermal so hoch waren wie bei reduzierter Kaliumernährung (Abb. 3.5).

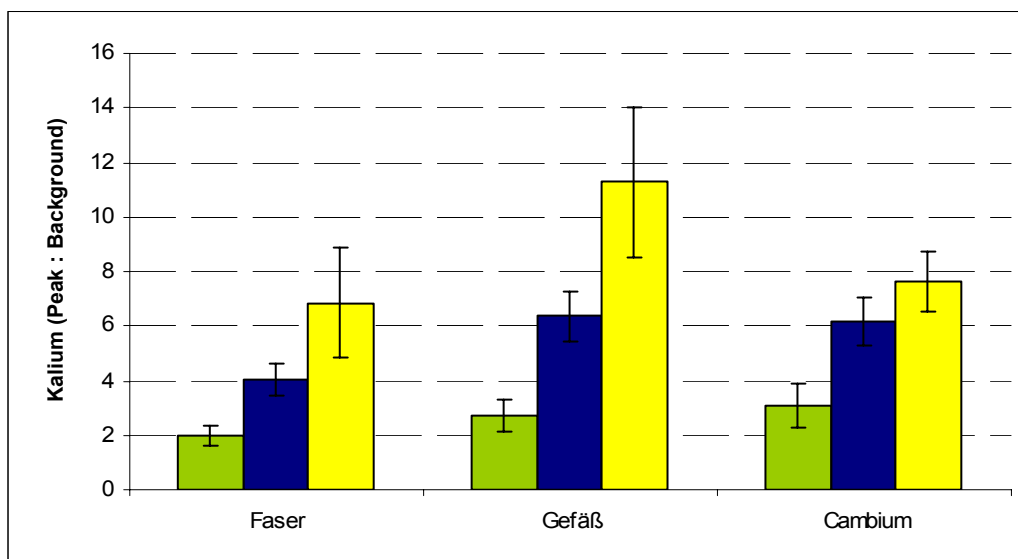


Abb. 3.5: Relative Kaliumwerte in cambialen Zellen, sich differenzierenden Xylemzellen und Gefäßzellen bei unterschiedlicher Kaliumernährung. Dargestellt als Peak : Background Verhältnisse von EDXA Messungen. (Mittelwerte aus je 10 Einzelmessungen).

- (■) Pflanzen mit $50 \mu\text{M K}^+$ Kaliumversorgung
- (■) Pflanzen mit 5 mM K^+ Kaliumversorgung
- (■) Pflanzen mit 10 mM K^+ Kaliumversorgung

Neben Messungen in einzelnen Zelltypen der Holzbildungszone konnte in einem zusätzlichen Versuch gezeigt werden, dass das cambiale Gewebe und das angrenzende Xylem die höchsten Kaliumwerte im Stammbereich aufweisen und somit starke *sinks* für Kalium darstellen. Dies konnte anhand von Konzentrationsprofilen für das Element Kalium, die über den verschiedenen Gewebetypen des Stammquerschnitts mittels des Scanmodus des verwendeten EDXA / REM Systems aufgenommen wurden, deutlich gezeigt werden (Abb. 3.6 A). Bei reduzierter Kaliumernährung war die Akkumulation von Kalium im Bereich Cambium / Xylemdifferenzierung nur noch schwach ausgeprägt, so dass sich ein relativ gleichmäßiges Konzentrationsprofil für Kalium im Stammgewebe ergab (Abb. 3.6 B).

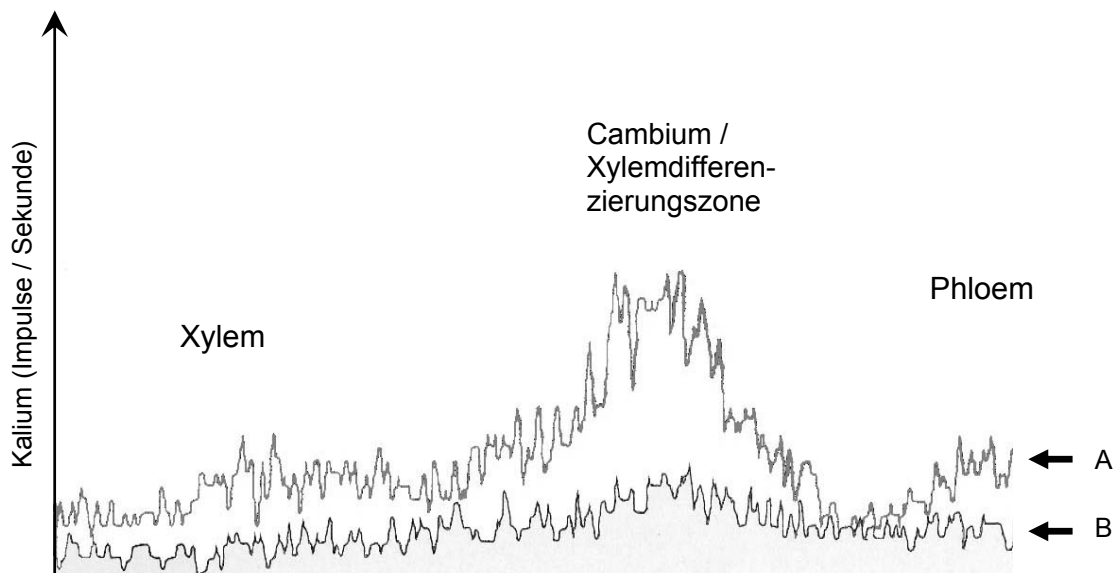


Abb. 3.6: EDXA-Linienscan der relativen Kaliumverteilung im aktiven Stammgewebe. Die dargestellten Linienscans sind das Ergebnis aus jeweils 100 übereinandergelagerten Scans.
A) Pflanze versorgt mit 10 mM Kalium in der Nährlösung.
B) Pflanze versorgt mit 50 µM Kalium in der Nährlösung.

Desweiteren wurde neben der Untersuchung der Kaliumverteilung in den verschiedenen Stammgeweben (Xylem, Cambium, Phloem) zusätzlich der saisonale Einfluss auf die cambialen Kaliumwerte überprüft. Die Kaliumwerte im Cambium variierten signifikant im Lauf des Jahres. So wurden im Sommer hohe Kaliumwerte gemessen, die sich auf ein Drittel im Winter reduzierten (Abb. 3.7, siehe auch Abb. 3.17).

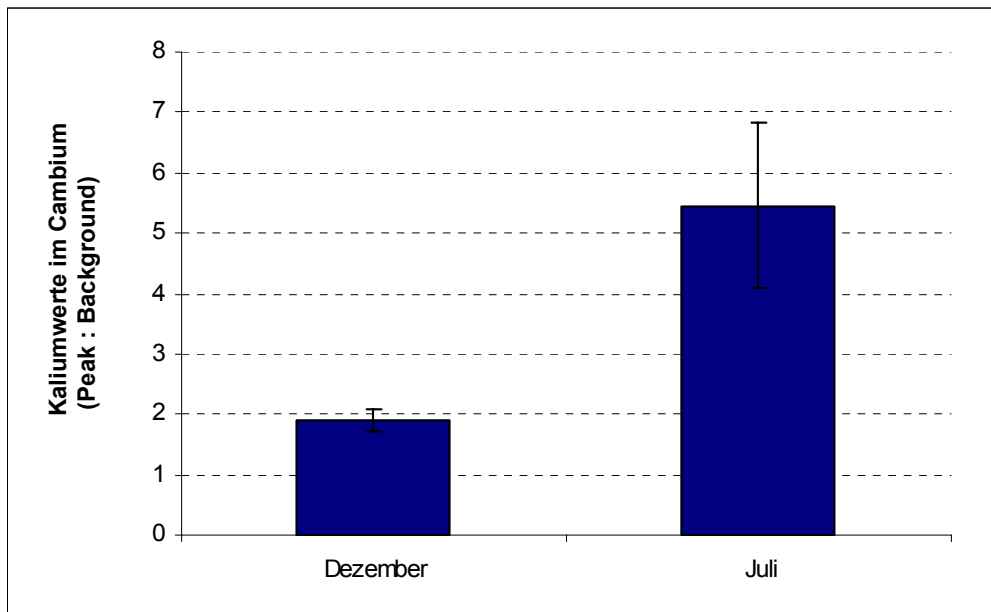


Abb. 3.7: Saisonale Veränderungen der Kaliumwerte im Cambium. Dargestellt als Peak : Background Verhältnisse von EDXA Messungen. (Mittelwerte aus je 10 Einzelmessungen).

3.3 Einfluss der Kaliumernährung auf die Holzanatomie

Um einen möglichen Einfluss der Kaliumernährung auf die Holzanatomie zu überprüfen, wurden nach einer Wachstumsphase von zwei Monaten an den Versuchspflanzen lichtmikroskopische Untersuchungen des Cambiums und des neu gebildeten Holzgewebes durchgeführt. Da in diesem Zeitraum ein großer Teil des radialen Holzzuwachses erfolgte, stand eine ausreichend große Menge neuen Holzgewebes für eine repräsentative Auswertung zur Verfügung. Es zeigte sich, dass bei abnehmender Versorgung mit Kalium die radiale Ausdehnung des Cambiums und der Xylemdifferenzierungszone deutlich reduziert wurde (Abb. 3.8). So setzte sich das Cambium bei reduzierter Kaliumernährung nur aus 4-6 radial aufeinander folgenden Zellen zusammen, bei normaler Kaliumernährung aus 5-7 Zellen und bei verstärkter Kaliumernährung aus 6-10 Zellen. Die Zone der Zellexpansion umfasste bei reduzierter Kaliumernährung nur 2 – 3 Zellen, bei normaler Kaliumernährung 4 – 5 Zellen und bei verstärkter Kaliumernährung 5 – 7 Zellen. Aufgrund der reduzierten Ausdehnung der Zellstreckungszone erfolgte das Einsetzen der Sekundärwandbildung bei reduzierter Kaliumernährung deutlich früher (Abb. 3.8 A).

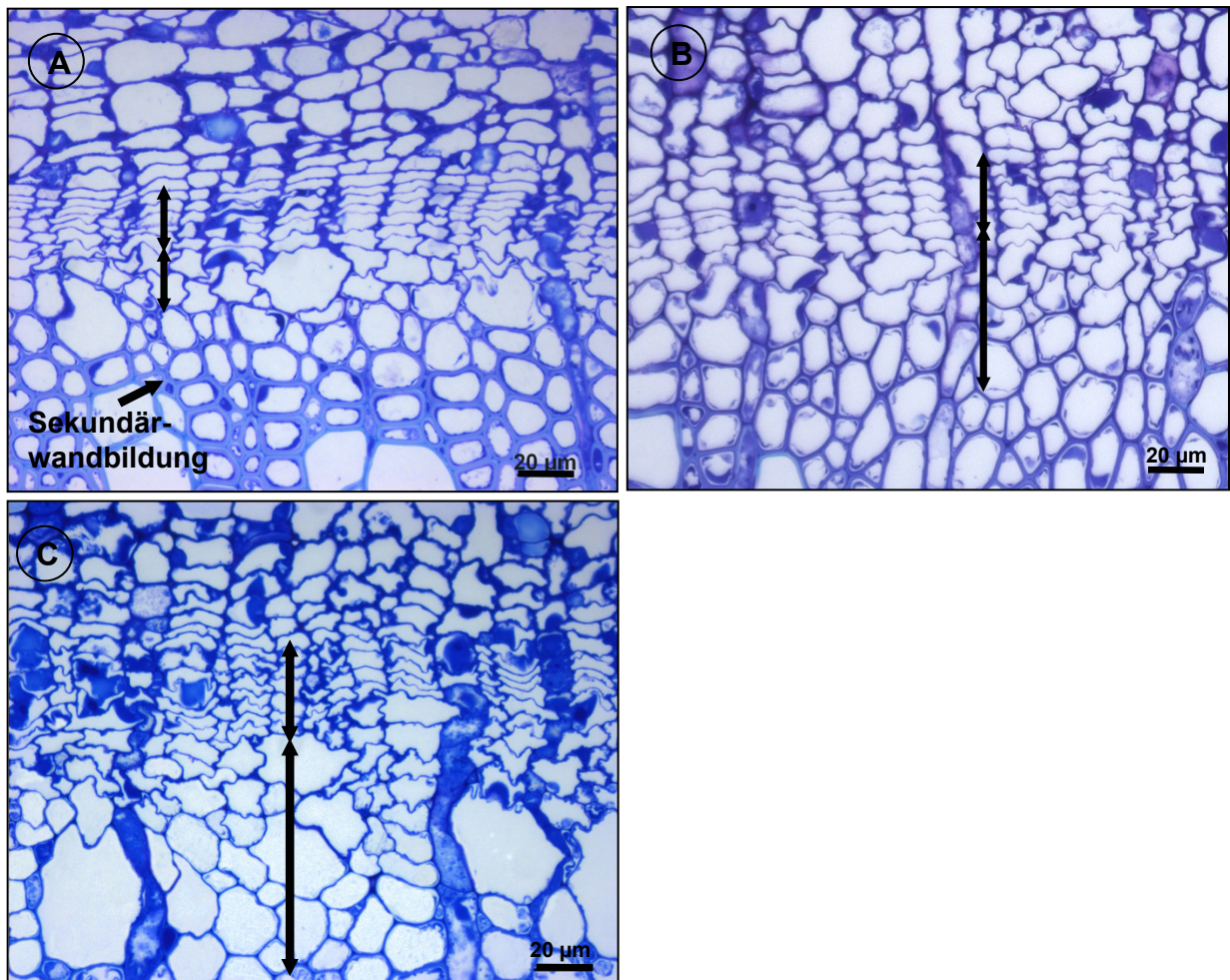


Abb. 3.8: Einfluss der Kaliumernährung auf die radiale Ausdehnung der cambialen Zone sowie der Zellexpansionszone (schwarze Pfeile). **A)** Pappel mit 50 μM Kaliumversorgung. Cambium: 4-6 Zellen (oberer Pfeil); Zellexpansionszone: 2-3 Zellen (unterer Pfeil); Frühzeitiges Einsetzen der Sekundärwandbildung. **B)** Pappel mit 5 mM Kaliumversorgung. Cambium: 5-7 Zellen; Zellexpansionszone: 4-5 Zellen. **C)** Pappel mit 10 mM Kaliumversorgung. Cambium: 6-10 Zellen; Zellexpansionszone: 5-7 Zellen.

Die Untersuchung des neu gebildeten Holzgewebes zeigte weitere anatomische Unterschiede zwischen den Versuchsvarianten in Bezug auf die Größenentwicklung von Gefäßen und Fasern, die Häufigkeit von Gefäßen als auch im radialen Holzzuwachs. So zeigten Gefäße mit abnehmender Kaliumernährung eine zunehmende Querschnittsfläche. Aufgrund einer natürlich bedingten, starken Streuung der gemessenen Gefäßgrößen erfolgte die Darstellung der Messwerte in Form von Häufigkeitsverteilungen (Abb. 3.9). Die Querschnittsflächenklasse mit der größten Häufigkeit lag bei der Variante mit reduzierter Kaliumernährung bei $400 \mu\text{m}^2$, bei den beiden anderen Versuchsvarianten lag die Querschnittsflächenklasse mit der größten Häufigkeit dagegen bei $300 \mu\text{m}^2$. Im Vergleich zueinander zeigten die Häufigkeitsverteilungen der Gefäßquerschnittsflächen bei

der Variante mit reduzierter Kaliumernährung insgesamt eine Verschiebung zugunsten höherer Werte (Abb. 3.9).

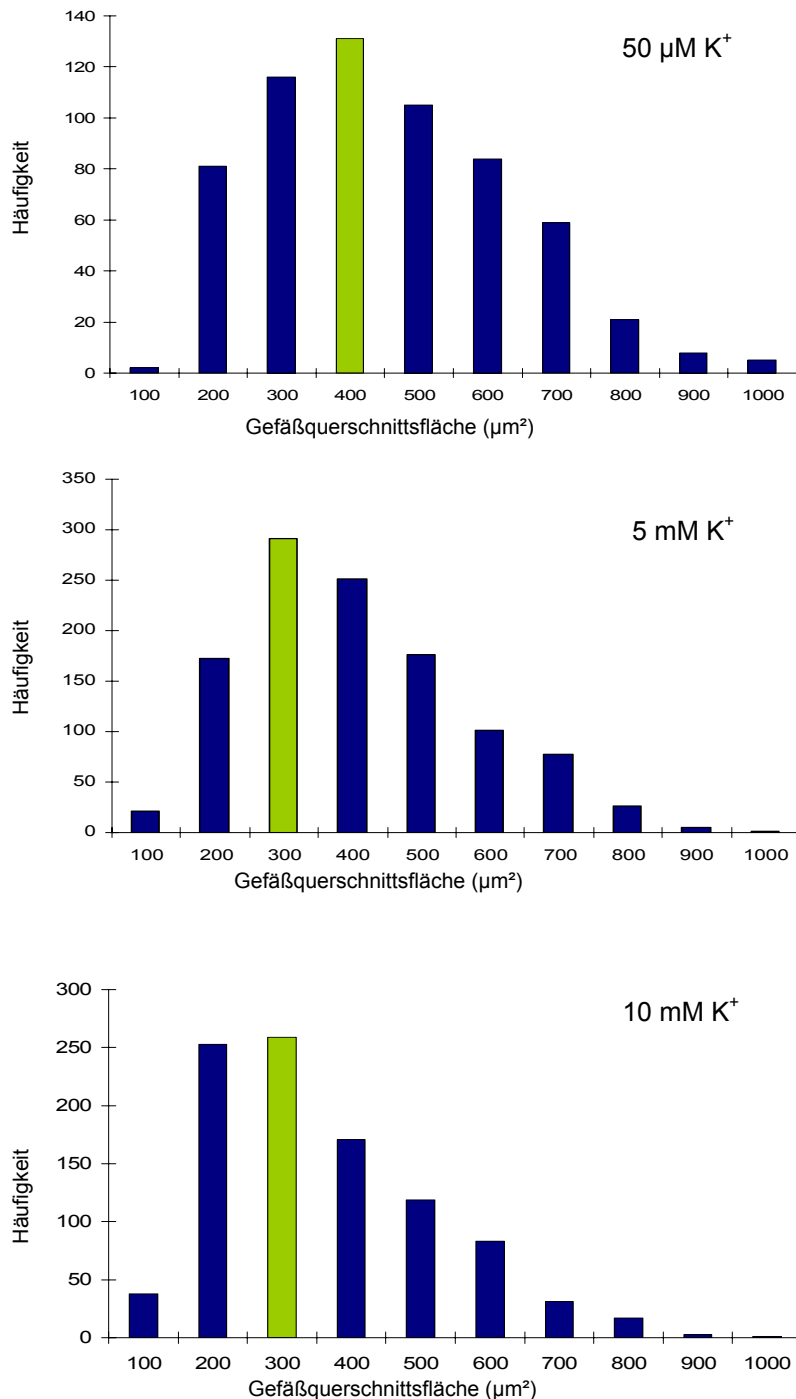


Abb. 3.9 : Häufigkeitsverteilung der Gefäßquerschnittsfläche bei unterschiedlicher Kaliumernährung. Farblich hervorgehoben (grün) ist jeweils die Größenklasse mit der größten absoluten Häufigkeit.

Die Abnahme der Gefäßgröße bei zunehmender Kaliumernährung ging einher mit einer Zunahme der Häufigkeit von Gefäßzellen im neugebildeten Holzgewebe (Abb. 3.10 und 3.11). Diese Zunahme war bei verstärkter Kaliumernährung am deutlichsten ausgeprägt. So betrug die Anzahl der Gefäße pro mm^2 Xylemfläche bei reduzierter Kaliumernährung 573 ± 17 Gefäße / mm^2 , bei normaler Kaliumernährung 656 ± 63 Gefäße / mm^2 und bei verstärkter Kaliumernährung 893 ± 86 Gefäße / mm^2 . Die Gefäßdichte (Gefäßfläche / Xylemfläche) stieg bei zunehmender Kaliumernährung leicht. Der Quotient für die Gefäßdichte ergab bei reduzierter Kaliumernährung $0,250 \pm 0,027$, bei normaler Kaliumernährung betrug er $0,274 \pm 0,053$ und bei erhöhter Kaliumernährung $0,288 \pm 0,024$ (Tab. 3.1).

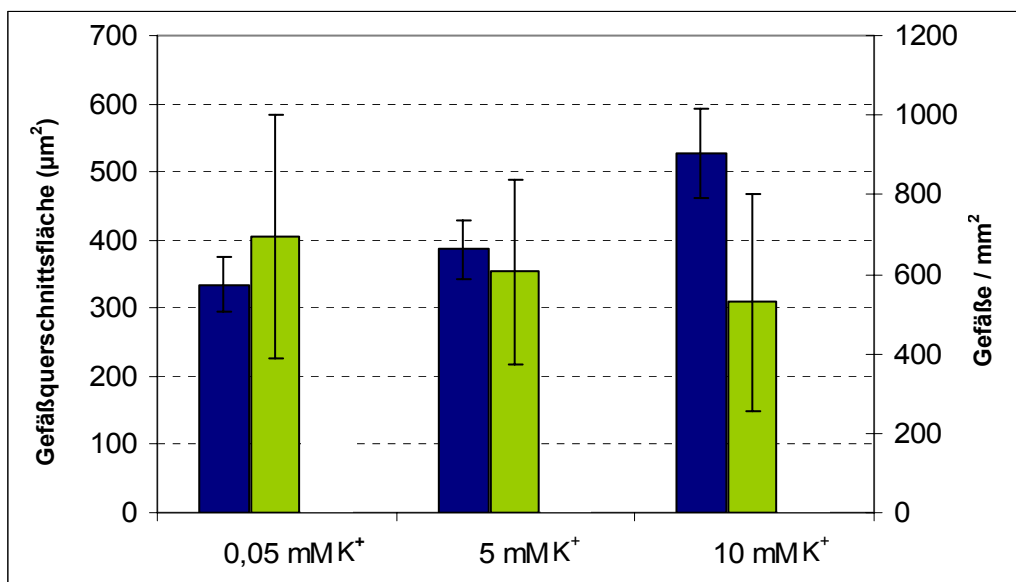


Abb. 3.10: Gegenüberstellung von Gefäßhäufigkeit und Gefäßquerschnittsfläche.
 (■) Anzahl der Gefäße pro Xylemfläche (■) Mittlere Gefäßquerschnittsfläche.

Einhergehend mit der Zunahme der Gefäßanzahl bei verstärkter Kaliumernährung konnte regelmäßig eine auffällige Clusterbildung kleiner Gefäße in dieser Versuchsgruppe beobachtet werden, die in den beiden anderen Versuchsgruppen nicht in dieser ausgeprägten Form zu beobachten war (Abb. 3.11).

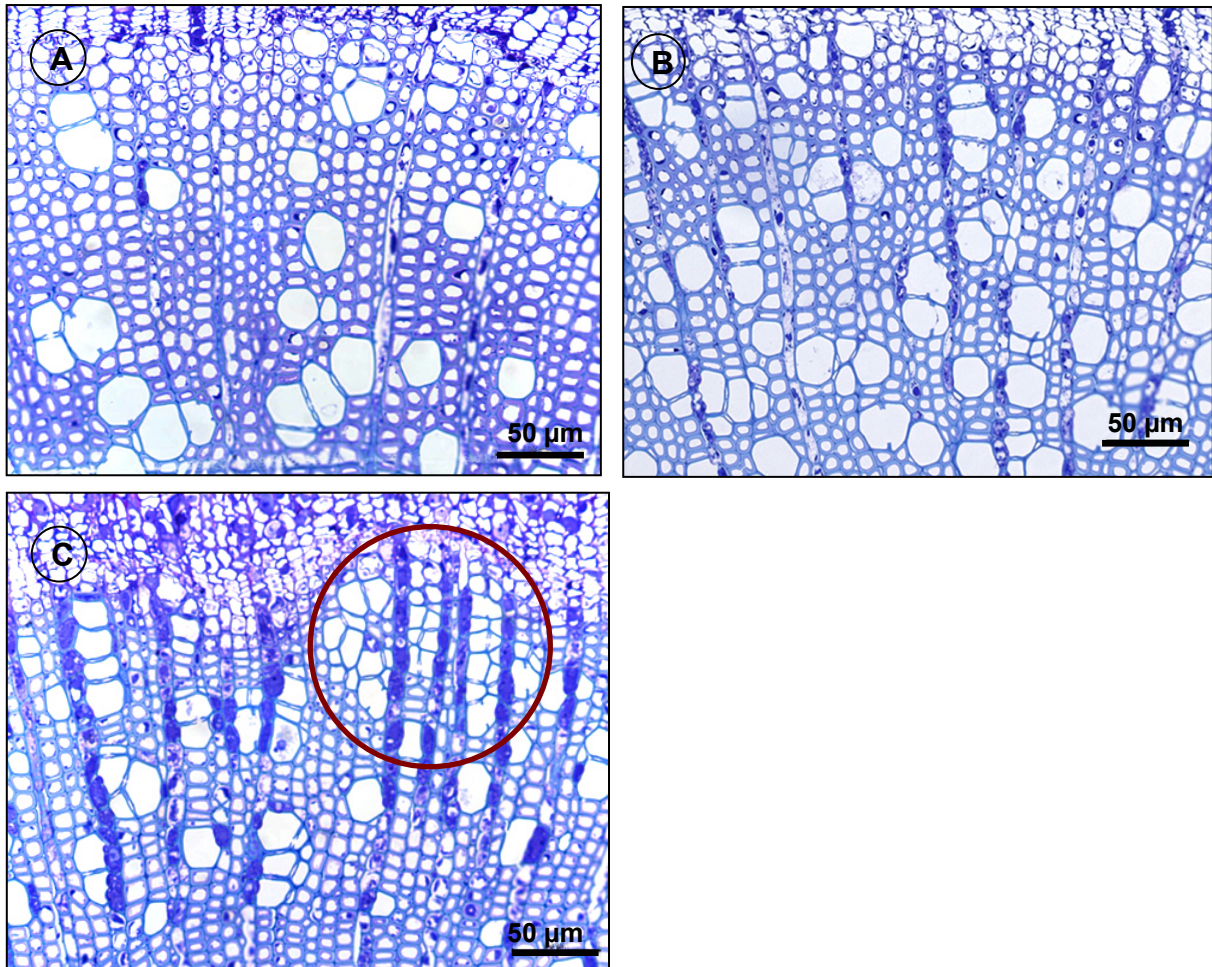


Abb. 3.11: Einfluss der Kaliumernährung auf die Anzahl und die Verteilung von Gefäßen. **A)** Gefäßverteilung bei Versorgung mit 50 µM Kalium. **B)** Gefäßverteilung bei Versorgung mit 5 mM Kalium. **C)** Deutliche Clusterung der Gefäße bei Versorgung mit 10 mM Kalium. Die geclusterten Gefäße stehen meist in Verbindung zu Holzstrahlen. Zudem erscheinen die Gefäße kleiner als bei Pflanzen mit reduzierter Kaliumernährung (A).

Im Gegensatz zu Gefäßen konnte bei Xylemfasern kein Einfluss der Kaliumernährung auf die Größenentwicklung ihrer Querschnittsfläche festgestellt werden. So betrug die Faserquerschnittsfläche bei reduzierter Kaliumernährung $107 \pm 36 \mu\text{m}^2$, bei normaler Kaliumernährung $111 \pm 32 \mu\text{m}^2$ und bei verstärkter Kaliumernährung $106 \pm 38 \mu\text{m}^2$ (Tab. 3.1). Untersuchungen der Faserlänge zeigten jedoch im Gegensatz zur Querschnittsfläche eine Zunahme der Faserlänge bei reduzierter Kaliumernährung. Die Messergebnisse sind als Häufigkeitsverteilung in Abb. 3.12 dargestellt. Die Längensklasse mit der größten absoluten Häufigkeit lag bei reduzierter Kaliumernährung bei 600 µm, bei den beiden anderen Versuchsvarianten lag sie dagegen bei 500 µm. Im Mittel betrug die Faserlänge bei reduzierter Kaliumernährung $566 \pm 77 \mu\text{m}$, bei normaler Kaliumernährung $485 \pm 78 \mu\text{m}$ und bei verstärkter Kaliumernährung $494 \pm 80 \mu\text{m}$ (Tab. 3.1).

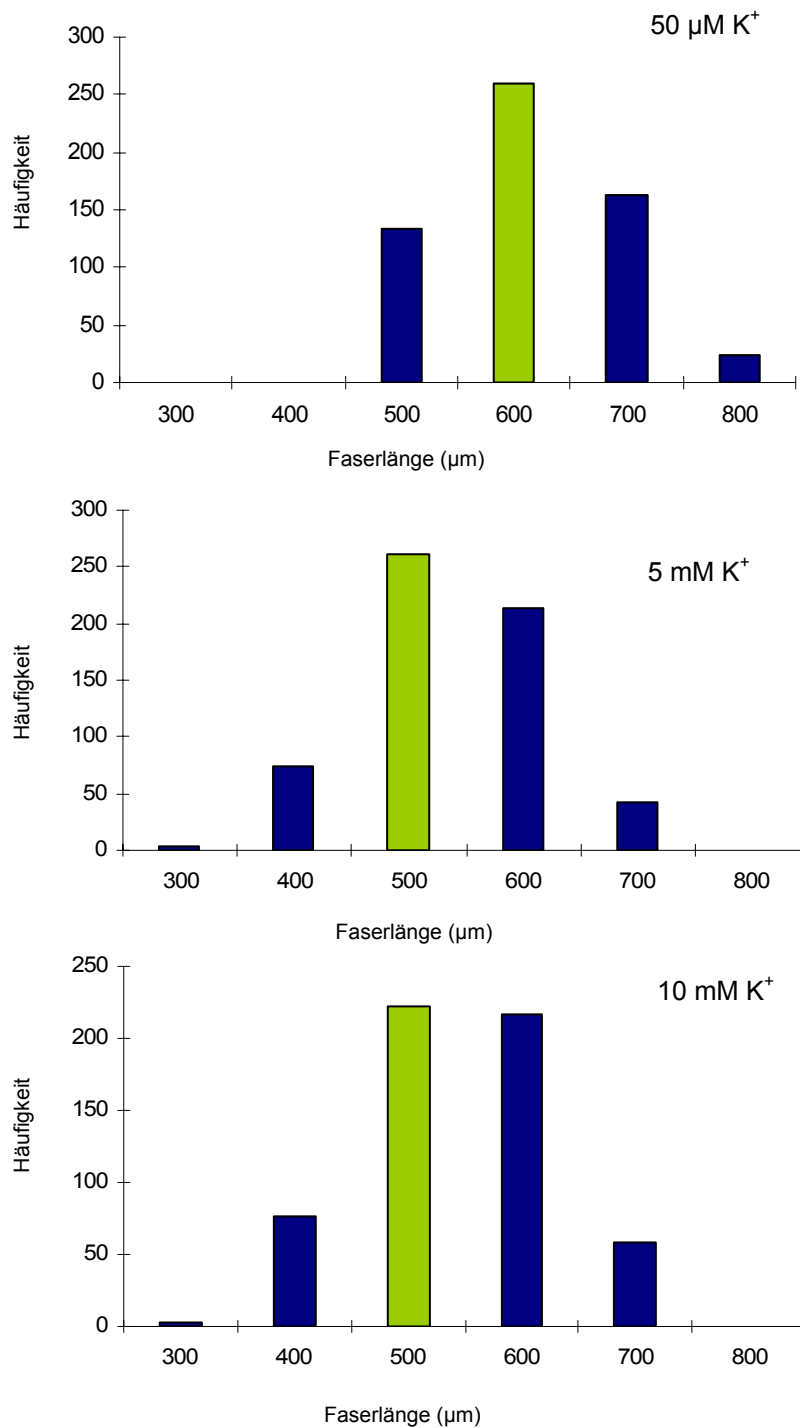


Abb. 3.12: Häufigkeitsverteilungen der Faserlänge bei unterschiedlicher Kaliumernährung. Farblich hervorgehoben (grün) ist jeweils die Größenklasse mit der größten absoluten Häufigkeit.

Um zu überprüfen, ob eine unterschiedliche Kaliumernährung den radialen Holzzuwachs beeinflusst, wurde nach Abschluss der Wachstumsphase (6 Monate) an jeweils 10 Versuchspflanzen der radiale Holzzuwachs gemessen. Trotz einer relativ starken Streuung der Einzelwerte konnte gezeigt werden, dass der Zuwachs bei reduzierter Kaliumernährung im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsvarianten deutlich verrin-

gert war. So betrug der radiale Holzzuwachs bei reduzierter Kaliumernährung $0,9 \pm 0,2$ mm, bei normaler Kaliumernährung $1,6 \pm 0,5$ mm und bei verstärkter Kaliumernährung $1,7 \pm 0,6$ mm (Tab. 3.1).

Alle histometrischen Auswertungen der Holzanatomie der drei Versuchvarianten sind in Tab. 3.1 zusammenfassend dargestellt.

| | 50 μ M | | 5 mM | | 10 mM | |
|---|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|
| | Mittelwert | SD | Mittelwert | SD | Mittelwert | SD |
| Gefäßquerschnittsfläche (μm^2) | 405 | 178 | 354 | 163 | 309 | 160 |
| Anzahl der Gefäße pro mm^2 | 573 | 17 | 656 | 63 | 893 | 86 |
| Gefäßdichte (Gefäßfläche / Xylemfläche) | 0,250 | 0,027 | 0,274 | 0,053 | 0,288 | 0,024 |
| Faserquerschnittsfläche (μm^2) | 107 | 36 | 111 | 32 | 106 | 38 |
| Faserlänge (μm) | 566 | 77 | 485 | 78 | 494 | 80 |
| Anzahl der Cambiumzellen in radialer Richtung | 4-6 | | 5-7 | | 6-10 | |
| Anzahl expandierender Xylemzellen in radialer Richtung | 2-3 | | 4-5 | | 5-7 | |
| Radialer Xylemzuwachs nach Abschluss der Vegetationsperiode (mm) | 0,9 | 0,2 | 1,6 | 0,5 | 1,7 | 0,6 |

Tab. 3.1: Gegenüberstellung von anatomischen Parametern der Holzbildung bei unterschiedlicher Versorgung der Versuchspflanzen mit Kalium. Bei den histometrischen Messungen der Gefäße und Fasern wurden je Variante drei Versuchspflanzen mit jeweils zwei unterschiedlichen Proben des Stammquerschnitts ausgewertet. Für die Bestimmung des radialen Zuwachses wurde nach Abschluss der Wachstumsphase an je 10 Bäumen der radiale Zuwachs bestimmt. Abkürzung: SD = Standardabweichung normalverteilt.

3.4 Einfluss der Kaliumernährung auf die cambiale Ultrastruktur

Zusätzlich zu den anatomischen Untersuchungen wurden ultrastrukturelle Untersuchungen im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) durchgeführt. Die zelluläre Feinstruktur cambialer Zellen und sich differenzierender Xylemzellen der Versuchspflanzen zeigte keine eindeutigen Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsvarianten. Auffällig war lediglich, dass cambiale Zellen von Pflanzen mit reduzierter Kaliumernährung häufig eine geringe Ausdehnung der Vacuole und damit bedingt einen erhöhten cytoplasmatischen Anteil zeigten. Zudem zeigte sich in Cambiumzellen bei reduzierter Kaliumversorgung eine erhöhte Anzahl von Mitochondrien (Abb. 3.13).

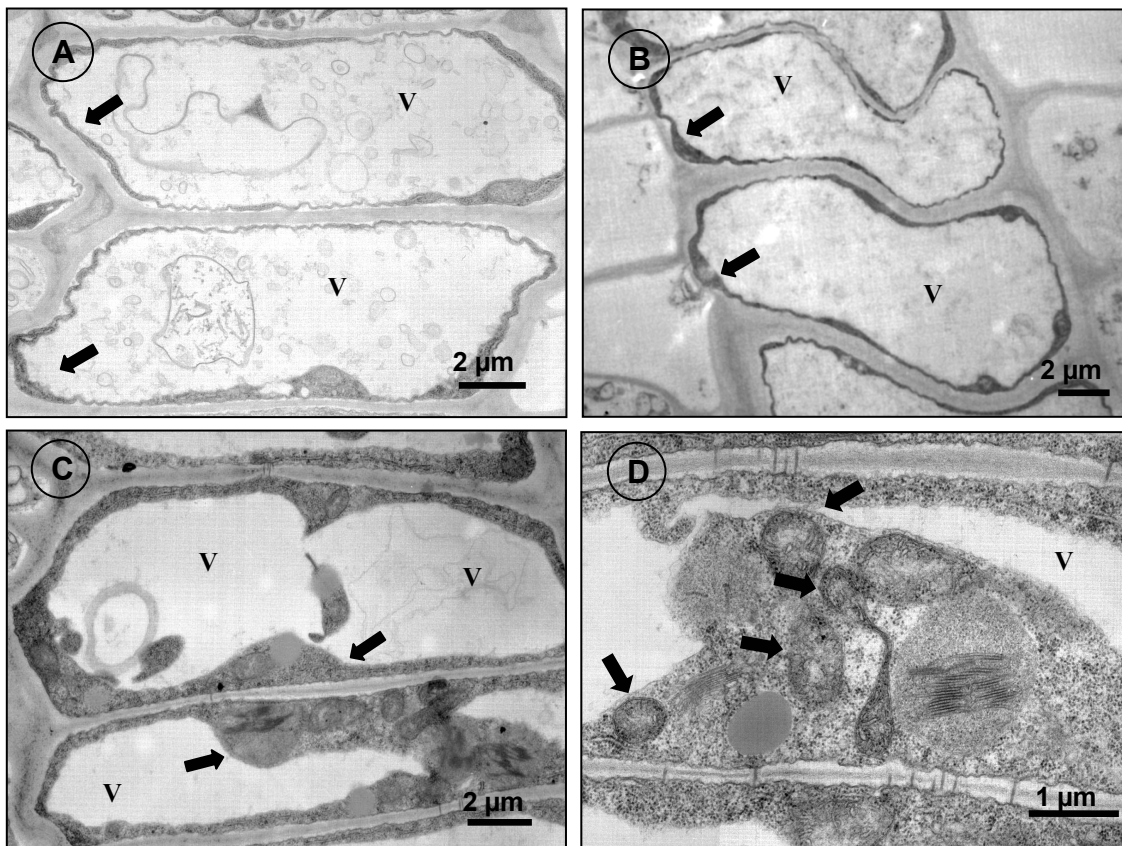


Abb. 3.13: Einfluss der Kaliumernährung auf die Ultrastruktur der cambialen Zellen.

A) Typisches Bild aktiver Cambiumzellen bei normaler Kaliumversorgung (5mM K^+). Auffallend ist ein schmaler Saum des Cytoplasma (Pfeile). Die Vacuole (V) nimmt beinahe den gesamten Zellraum ein.

B) Typisches Bild aktiver Cambiumzellen bei verbesserter Kaliumversorgung (10 mM K^+). Wie bei A) zeigt sich eine starke Vacuolisierung.

C) Anreicherung von Cytoplasma (Pfeile) und geringere Ausdehnung der Vacuole (V) im Cambium bei reduzierter Kaliumversorgung ($50\ \mu\text{M K}^+$).

D) Ausschnitt aus einer cambialen Zelle einer Versuchspflanze mit reduzierter Kaliumversorgung. Auftreten zahlreicher Mitochondrien im Cytoplasma (Pfeile).

3.5 Einfluss der Kaliumernährung auf die chemische Holzzusammensetzung

Ein erster Hinweis auf eine Beeinflussung der Holzchemie durch unterschiedliche Kaliumernährung ergab sich nach Färbung von Stammquerschnitten der Versuchspflanzen mit Acridinorange-Malachitgrün. Die zur Darstellung des Lignifizierungsgrades der Zellwand genutzte Methode (v. AUFSEB 1973) zeigte eine unterschiedliche Färbung des Holzgewebes in Abhängigkeit von der Kaliumernährung der Versuchspflanzen. Stark lignifizierte Gewebebereiche erscheinen bei dieser Methode grün, während schwächer lignifizierte Gewebebereiche durch eine orange Färbung angezeigt werden. Bei reduzierter Kaliumernährung der Pflanzen war eine deutlich intensivere grüne Färbung des ausdifferenzierten Holzes zu beobachten, während bei normaler und bei verstärkter Kaliumernährung der Pflanzen das ausdifferenzierte Holzgewebe mehr orange gefärbt erschien (Abb. 3.14).

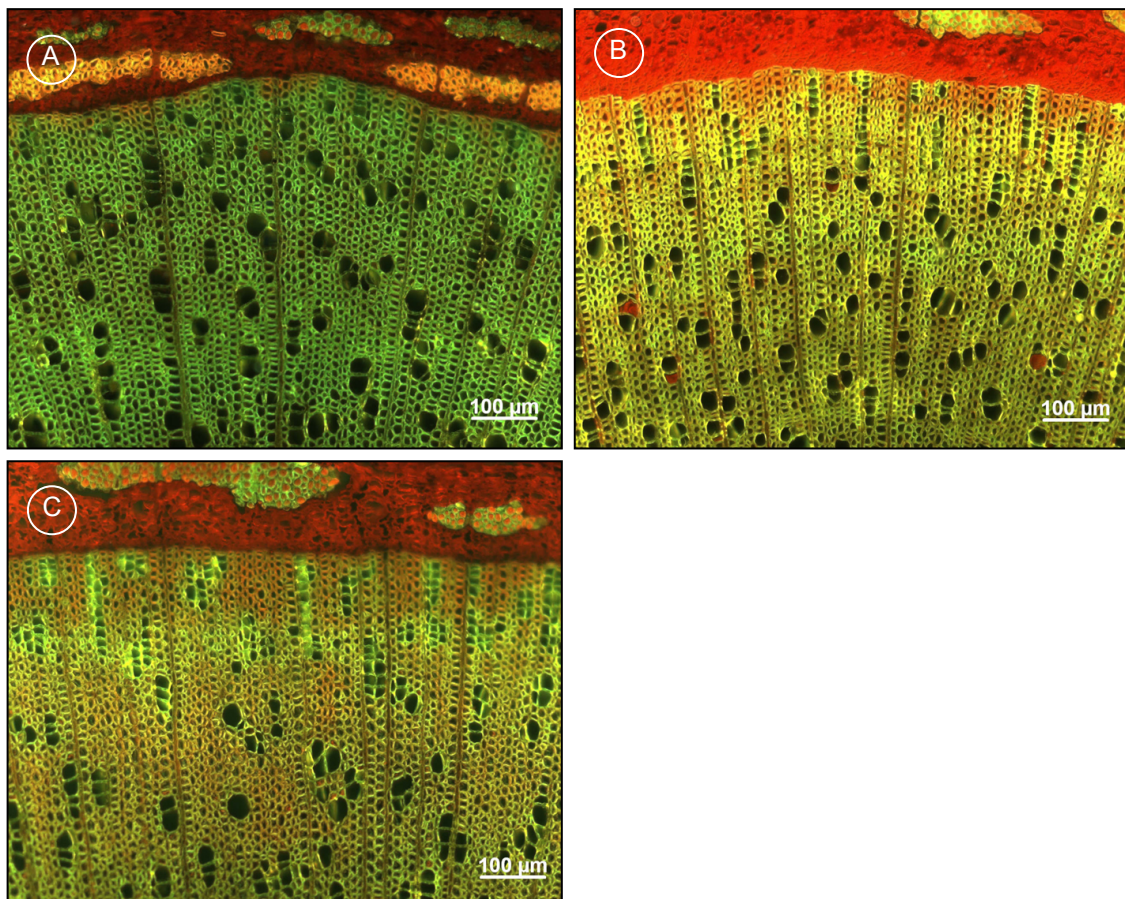


Abb. 3.14: Acridinorange-Malachitgrünfärbung. Grüne Färbung zeigt hohen Ligningehalt an, gelborangefärbung schwächere Lignineinlagerung. **A)** Pflanzen mit reduzierter Kaliumernährung zeigen eine intensiv grüne Färbung des Holzgewebes. **B)** Pflanzen mit normaler Kaliumernährung zeigen eine gelblich-grünliche Färbung des Holzgewebes. **C)** Pflanzen mit verbesserter Kaliumernährung zeigen eine rötlich bis grünliche Färbung des Holzgewebes.

Um die Ergebnisse der Acridinorange-Malachitgrünfärbung auch durch eine quantitative Ligninbestimmung zu bestätigen, wurde nach einer Methode von Runkel und Wilke (1951) der Gesamtligningehalt des neu gebildeten Holzgewebes bestimmt. Es zeigte sich, dass sich die Ligningehalte bezogen auf extraktfreies, trockenes Holz mit zunehmender Kaliumernährung leicht verringerten. Sie betragen bei reduzierter Kaliumernährung 17,5 %, bei normaler Kaliumernährung 16,1 % und bei verstärkter Kaliumernährung 14,9 %. Da mit der angewandten Methode der Gehalt an säurelöslichem Lignin nicht erfasst wird, wurde im UV-Spektrometer zusätzlich das säurelösliche Lignin bestimmt. Der Gehalt an säurelöslichem Lignin lag jedoch bei allen Proben deutlich unter 1 %. Somit konnte ein möglicher Einfluss von säurelöslichem Lignin auf die Messungen des Ligningehaltes nach Runkel und Wilke (1951) ausgeschlossen werden.

Die Extraktgehalte des Holzgewebes, die als Vorarbeit der Ligninbestimmung ermittelt worden waren (siehe Kap. 2.4.2), zeigten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Bei reduzierter Kaliumernährung betrug der Extraktgehalt des Holzes 2,7 %, bei normaler Kaliumernährung 2,4 % und bei verstärkter Kaliumernährung 2,6 %.

Der Cellulosegehalt der Versuchspflanzen wurde über den Gesamtglucosegehalt nach Vollhydrolyse des unter Versuchsbedingungen gebildetem Holzgewebe ermittelt (siehe Kapitel 2.4.4). Es zeigte sich, dass analog zu den ermittelten Unterschieden im Ligningehalt auch ein deutlicher Einfluss der Kaliumernährung auf den Cellulosegehalt nachweisbar war. So betragen die Cellulosegehalte bei reduzierter Kaliumernährung 39 % und bei normaler sowie bei verstärkter Kaliumernährung 45 %. Tabelle 3.2 gibt zusammengefasst die Werte der Lignin-, Extraktstoff- und Cellulosegehalte wieder.

| Probe | Extraktstoffgehalt in % | Ligningehalt in % | Cellulosegehalt in % |
|----------------------|-------------------------|-------------------|----------------------|
| 50 $\mu\text{M K}^+$ | 2,7 | 17,5 | 39 |
| 5 mM K^+ | 2,4 | 16,1 | 45 |
| 10 mM K^+ | 2,6 | 14,9 | 45 |

Tab. 3.2: Extraktstoff-, Lignin- und Cellulosegehalte bei unterschiedlicher Kaliumernährung. Das Probenmaterial für die Messungen setzte sich aus dem unter Versuchsbedingungen gebildetem Holzgewebe von jeweils drei Bäumen einer Versuchsgruppe zusammen. Die Messwerte des Lignin- und Cellulosegehalts sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Die Messwerte des Extraktstoffgehaltes sind Einfachbestimmungen.

3.6 Einfluss der Kaliumernährung auf das osmotische Potential der Holzbildungszone und die Akkumulation organischer Osmotika

Wie in Kapitel 3.2 bereits beschrieben, zeigten Elementanalysen mittels AAS sowie EDXA eine signifikante Abhängigkeit der Kaliumgehalte der Holzbildungszone von der Kaliumernährung. Messungen des osmotischen Gewebepotentials zeigten weiterhin einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Kaliumernährung, dem Kaliumgehalt und der Osmolarität im Bereich der Holzbildungszone der Versuchspflanzen. So war mit abnehmender Kaliumernährung, bzw. abnehmendem Gehalt an Kalium im Gewebe der Holzbildungszone, ein deutliches Absinken des relativen¹ osmotischen Potentials feststellbar (s. Abb. 3.15). Auffallend war jedoch, dass bei sehr geringer Kaliumernährung die Osmolarität im Vergleich zum Kaliumgehalt im Gewebe der Holzbildungszone nur relativ schwach abnahm. So reduzierte sich bei einer 200fach geringeren Kaliumversorgung der Versuchspflanzen (50 μM im Vergleich zu 10 mM) der Kaliumgehalt in der Holzbildungszone um das Fünffache, das relative osmotische Potential reduzierte sich dagegen um weniger als die Hälfte.

¹ Es konnten aus methodischen Gründen nur relative Werte für das osmotische Potential bestimmt werden (siehe Kap. 2.6)

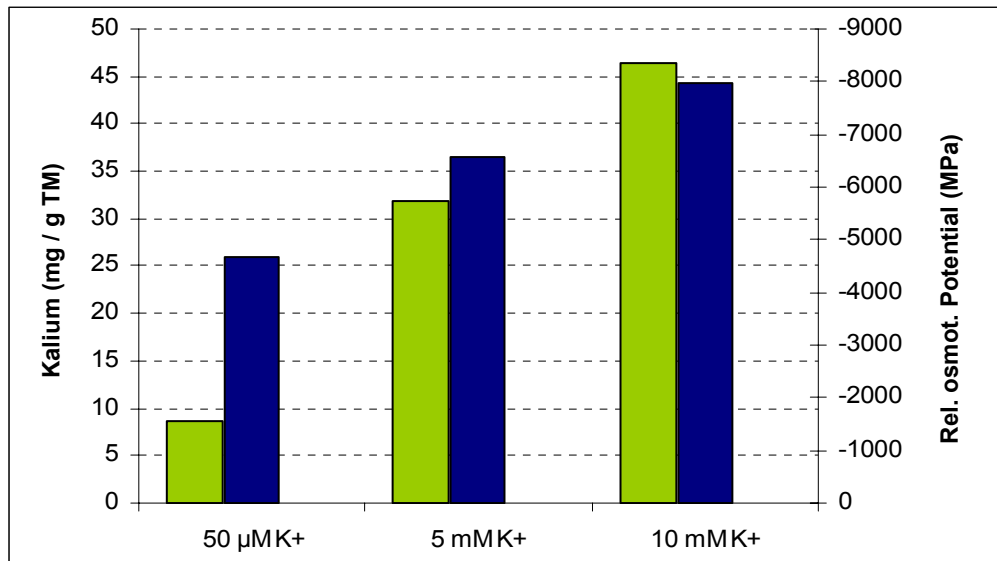


Abb. 3.15: Gegenüberstellung von Kaliumgehalten (■) und relativem osmotischen Potential (■) im Bereich der Holzbildungszone in Abhängigkeit von der Kaliumernährung. Das Probenmaterial setzte sich je Variante aus drei Versuchsbäumen zusammen. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte von Doppelbestimmungen aus Mischproben von jeweils drei vollständig beernteten Versuchspflanzen.

Um Rückschlüsse auf das Verhalten weiterer osmotisch bedeutsamer Substanzen zu erhalten, wurde bei den Pflanzen der Versuchsvarianten der Gehalt an Zuckern (Fructose, Glucose, Saccharose) und Malat in der Holzbildungszone bestimmt. Es zeigte sich, dass die Saccharose- und Malatgehalte mit zunehmender Kaliumversorgung ansteigen, während sich die Fructose- und Glucosekonzentrationen nicht deutlich veränderten. Die höchsten Gehalte an Saccharose und Malat wurden jeweils bei der Variante mit verbesserter Kaliumversorgung gemessen. Besonders deutlich äußerte sich der Einfluss der Kaliumernährung auf den Saccharose- und Malatgehalt, während die Fructose- und Glucose-Gehalte sich vergleichsweise gering veränderten (Abb. 3.16).

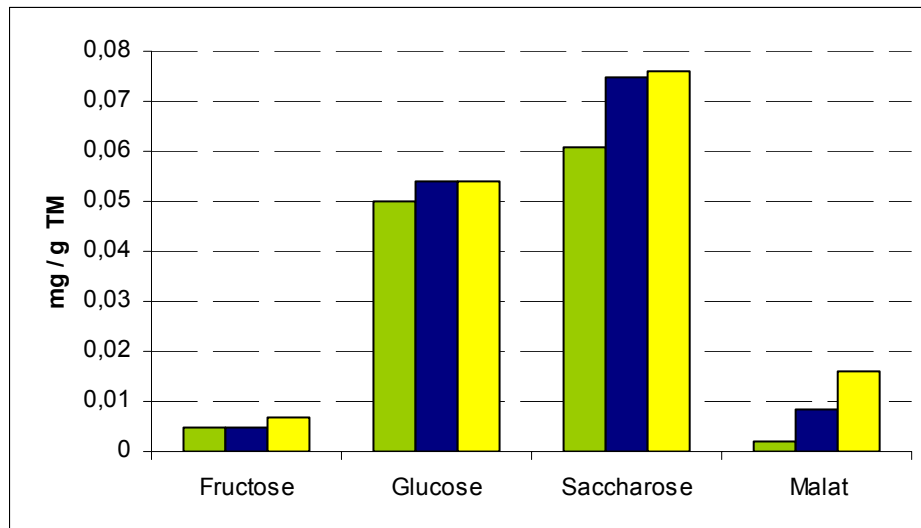


Abb. 3.16: Gehalte an Fructose, Glucose, Saccharose und Malat im Bereich der Holzbildungszone in Abhängigkeit von der Kaliumernährung (■ 50 µM K⁺, ■ 5 mM K⁺ sowie ■ 10 mM K⁺). Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte von Doppelbestimmungen aus Mischproben von jeweils drei vollständig beernteten Versuchspflanzen.

3.7 Saisonale Änderung von Kalium- und Natriumgehalt, relativem osmotischen Potential und Cambiumaktivität der Holzbildungszone

In einem Freilandversuch wurden von Versuchspflanzen mit unterschiedlicher Kaliumernährung (50 µM K⁺, 5 mM K⁺ und 10 mM K⁺) monatlich Proben genommen, um die saisonal bedingten Veränderungen des Kaliumgehalts, des relativen osmotischen Potentials und der cambialen Aktivität im Bereich der Holzbildungszone zu verfolgen sowie mögliche Zusammenhänge zwischen diesen Parametern herauszustellen.

Die Kaliumgehalte wurden mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) quantitativ bestimmt. In allen drei Versuchsgruppen zeigte sich ein Anstieg der Kaliumgehalte vom Frühjahr zum Sommer und ein Abfall der Kaliumgehalte zum Ende der Vegetationszeit im September (Abb. 3.17 A). Im Vergleich zueinander war der beobachtete Anstieg mit zunehmender Kaliumernährung stärker ausgeprägt. Die Versuchsgruppe mit reduzierter Kaliumernährung zeigte nur einen schwach ausgeprägten Anstieg der Kaliumgehalte, welche sehr deutlich unter denen der beiden Versuchsgruppen mit normaler oder verstärkter Kaliumernährung lagen. Auffällig war, dass die Versuchspflanzen mit normaler Kaliumernährung im August nochmals eine starke Zunahme der Kaliumgehalte im Bereich der Holzbildungszone zeigten.

Das relative osmotische Potential in der Holzbildungszone variierte im Verlauf der Vegetationsperiode in guter Übereinstimmung zu den Kaliumgehalten und zeigte vergleichbare Abhängigkeiten von der Kaliumernährung. So stiegen die gemessenen Werte von Frühjahr bis Frühsommer an und sanken dann bis September wieder auf ihr Ausgangsniveau vom Beginn der Vegetationsperiode ab (Abb. 3.17 B). Die Werte der Versuchsvariante mit reduzierter Kaliumernährung lagen unter denen der beiden anderen Versuchsgruppen. Auffällig war wiederum, dass bei der Versuchsgruppe mit normaler Kaliumversorgung das relative osmotische Potential der Holzbildungszone im August nochmals stark anstieg, wogegen bei den anderen beiden Versuchsvarianten ein Maximum im Juni gemessen wurde.

Als Weiser für die cambiale Zellteilungsaktivität wurde zusätzlich die Anzahl der cambialen Zellen mikroskopisch bestimmt. Vergleichbar mit den Kaliumgehalten und dem relativen osmotischen Potential in der Holzbildungszone stieg die Anzahl der cambialen Zellen vom Frühjahr bis zum Sommer an und sank zum Ende der Vegetationsperiode wieder ab (Abb. 3.17 C). Bei der Variante mit normaler Kaliumernährung wurde wiederum ein Maximum der cambialen Aktivität im August bestimmt, wogegen dieses bei der Variante mit reduzierter Kaliumernährung sowie bei der Variante mit verstärkter Kaliumernährung im Juni lag. Im Vergleich zueinander war der Anstieg der Zahl cambialer Zellen mit zunehmender Kaliumernährung stärker ausgeprägt. Die Werte der Variante mit reduzierter Kaliumernährung stiegen nur schwach an und lagen somit deutlich unter denen der beiden anderen Versuchsgruppen.

Insgesamt zeigten sich sehr auffällige Übereinstimmungen zwischen Kaliumgehalt, relativem osmotischen Potential und Cambiumaktivität. Diese Übereinstimmungen zeigten sich sowohl im saisonalen Verlauf der Messwerte, als auch in ihrer Abhängigkeit von der unterschiedlich gestalteten Kaliumernährung (Abb. 3.17).

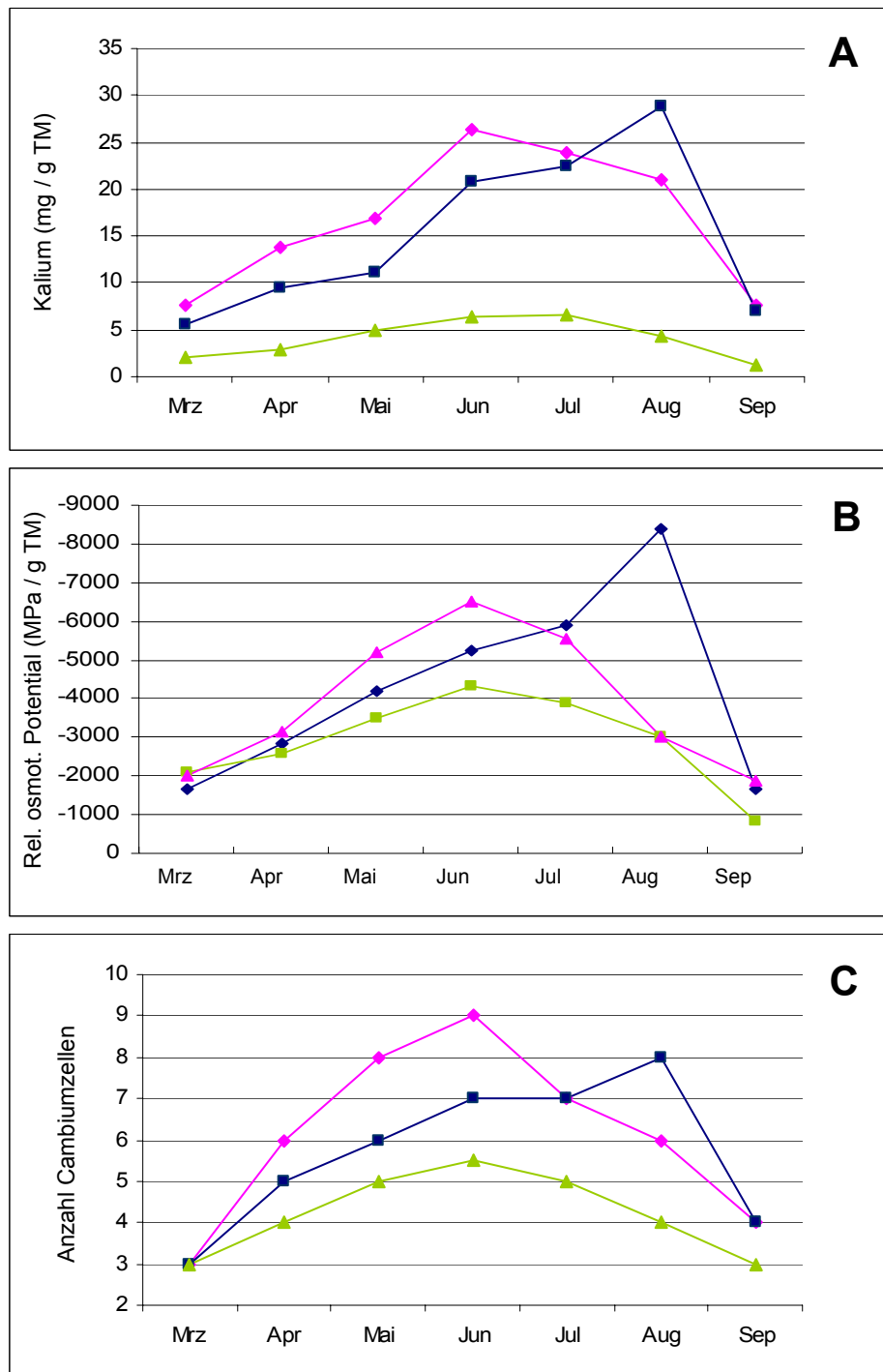


Abb. 3.17: Gegenüberstellung von Kaliumgehalt, relativem osmotischem Potential und cambialer Aktivität bei unterschiedlicher Kaliumernährung: (■) reduzierte Kaliumernährung, (■) normale Kaliumernährung und (◆) verbesserte Kaliumernährung. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte von Doppelbestimmungen aus Mischproben von jeweils drei vollständig beernteten Versuchspflanzen.

A) Kaliumgehalt im Bereich der der Holzbildungszone.

B) Relatives osmotisches Potential im Bereich der Holzbildungszone.

C) Anzahl der cambialen Zellen.

Elementanalysen der im Labor angezogenen Versuchspflanzen mittels EDXA zeigten eine deutliche Akkumulation von Natrium im Cambium der Pflanzen mit reduzierter Kaliumernährung (Abb. 3.3). Um diesen Befund auch durch quantitative Messungen abzusichern, wurden die Natriumgehalte der Holzbildungszone der drei Versuchsvarianten des Freilandsversuchs über den Verlauf einer Vegetationsperiode mittels AAS bestimmt (Abb. 3.18). Im Vergleich zueinander zeigte die Versuchsvariante mit reduzierter Kaliumernährung von März bis Juli die höchsten Natriumgehalte. Von Juli an nahm der Natriumgehalt in der Holzbildungszone dieser Pflanzen, einhergehend mit abklingender cambialer Aktivität (vgl. Abb.3.17 C), wieder deutlich ab. Auffällig war wiederum ein nochmaliger Anstieg der Natriumgehalte bei den Pflanzen mit normaler Kaliumversorgung im August, welcher bei diesen Pflanzen von einem Anstieg der cambialen Aktivität begleitet war. Die Ergebnisse der ortsgenauen, semiquantitativen Elementbestimmung mittels EDXA in den cambialen Zellen des Stammgewebes konnten somit auch durch quantitativer Elementbestimmung im AAS bestätigt werden.

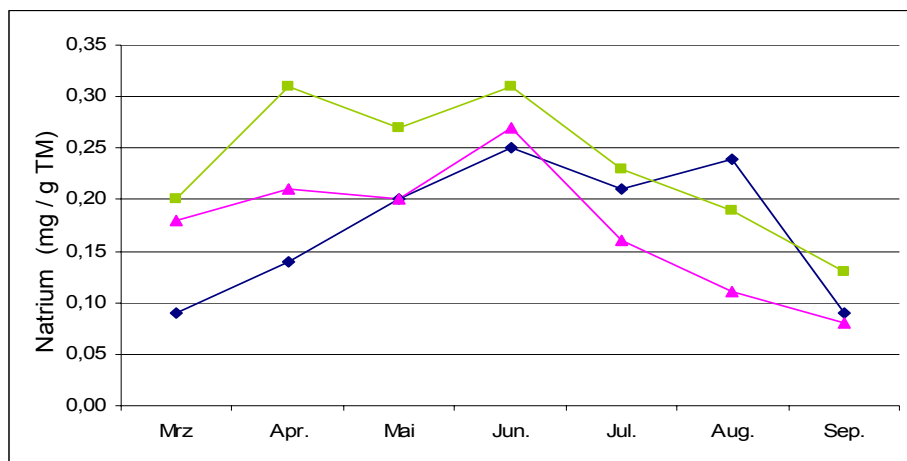


Abb. 3.18: Natriumgehalte der Holzbildungszone bei unterschiedlicher Kaliumernährung: (■) reduzierte Kaliumernährung, (◆) normale Kaliumernährung und (▲) verbesserte Kaliumernährung. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte von Doppelbestimmungen aus Mischproben von jeweils drei vollständig beernteten Versuchspflanzen.

3.8 Effekt von Natrium auf die Kaliumaufnahme bei reduzierter Kaliumernährung

Die gesteigerte Natriumaufnahme bei reduzierter Kaliumernährung (Abb. 3.3 und 3.14) deutet auf eine Einbindung von Natrium in die Prozesse der Kaliumaufnahme bei reduzierter Kaliumernährung hin. Um dies auch durch experimentelle Daten zu belegen, wurde ein weiterer Wachstumsversuch durchgeführt. Es wurden zwei Versuchsgruppen gebildet, die bei reduzierter Kaliumernährung mit normaler Natriumversorgung (1 mM) oder ohne Natriumversorgung wuchsen (siehe Tabelle 2.2). Nach einer Wachstumsphase von sechs Wochen wurden mittels EDXA die Kaliumwerte im Cambium der beiden Varianten gemessen. Der Kaliumwert der Variante mit normaler Natriumversorgung lag mit $1,79 \pm 0,57$ (P:B) fast doppelt so hoch wie der Kaliumwert der Variante, die unter Natriumausschluss wuchs. In dieser Variante wurde ein Kaliumwert von $0,9 \pm 0,26$ (P:B) gemessen (siehe Abb. 3.19).

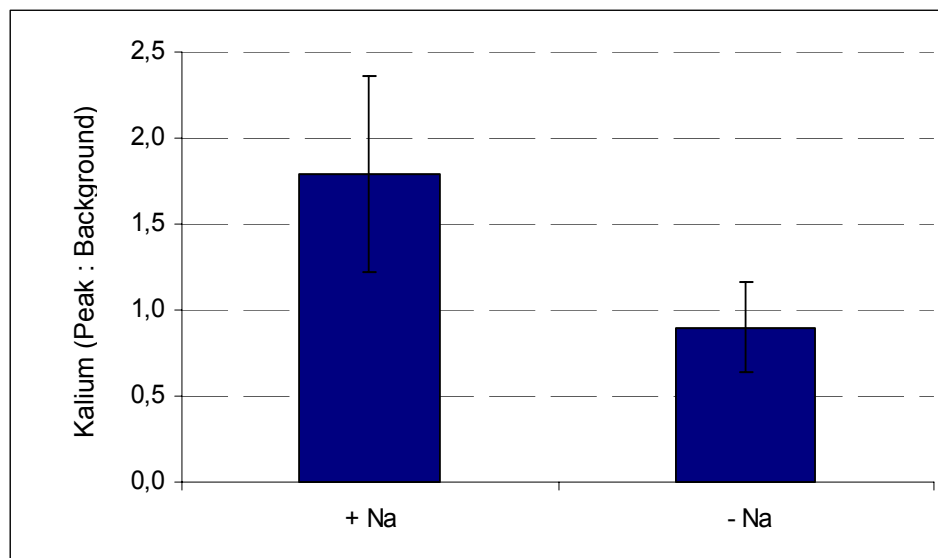


Abb. 3.19: Relative Kaliumwerte des Cambiums in Abhängigkeit von der Natriumversorgung, dargestellt als Peak : Background Verhältnisse von EDXA Messungen im Rasterelektronenmikroskop (Mittelwerte aus je 10 Einzelmessungen).

3.9 Einfluss von Abscisinsäure auf den Kaliumgehalt und die Anatomie der Holzbildungszone

Abscisinsäure (ABA) ist ein bedeutendes Pflanzenhormon, das in Gehölzen an der Regulation der Holzbildung beteiligt ist (LACHAUD 1989). Nach Applikation von 100 μM ABA¹ über einen Zeitraum von 8 Tagen wurden mittels EDXA deutlich reduzierte Kaliumgehalte im Cambium von *P. tremula x tremuloides* gemessen (Abb. 3.20). Die Kaliumwerte im Cambium nach ABA Applikation betragen $1,41 \pm 0,25$ (P:B) im Vergleich zu Kaliumwerten von $3,16 \pm 0,72$ (P:B) bei Kontrollpflanzen, die nur mit Wasser an der Stammoberfläche behandelt wurden.

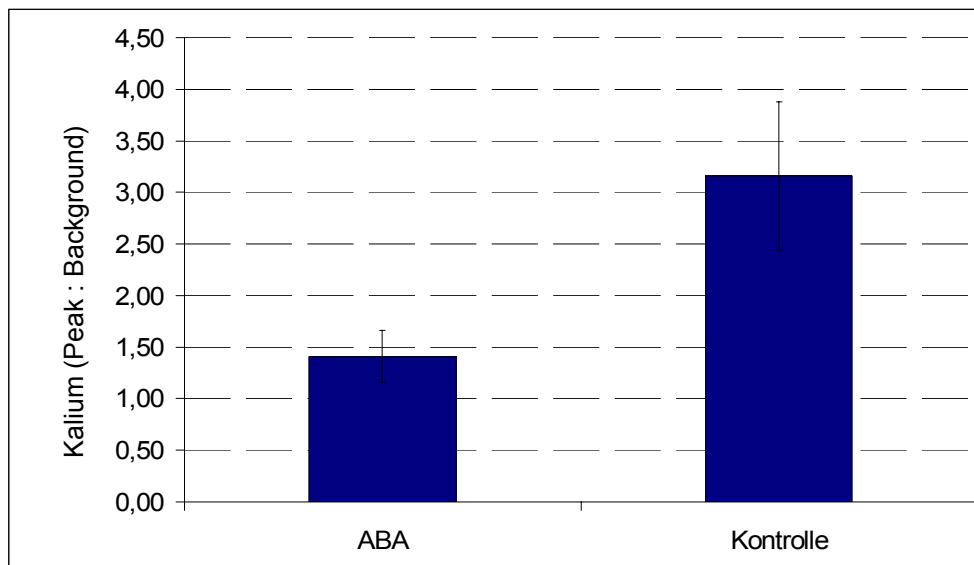


Abb. 3.20: Relative Kaliumgehalte im Cambium von *P. tremula x tremuloides* nach externer Applikation von ABA bzw. Wasser (Kontrolle). Dargestellt als Peak : Background Verhältnisse von EDXA Messungen im Rasterelektronenmikroskop (Mittelwerte aus je 10 Einzelmessungen).

Lichtmikroskopische Untersuchungen der beiden Versuchsvarianten zeigten eine deutliche Beeinflussung der Holzbildung durch ABA (Abb. 3.21). So setzte sich die cambiale Zone der Versuchspflanzen mit ABA-Applikation aus 2-3 radial aufeinanderfolgenden Zellreihen zusammen, wogegen die cambiale Zone der Kontrollpflanzen aus 4-6 radial aufeinanderfolgenden Zellreihen bestand. Zudem zeigte sich bei Pflanzen mit ABA-Applikation eine deutliche Reduktion der Zellexpansionszone und damit bedingt ein deutlich früheres Einsetzen der Sekundärwandbildung.

¹ Nach Entfernen des Periderms wurde 100 μM ABA in Wasser gelöst zweimal täglich am Stamm aufgetragen. Bei Kontrollen wurde Wasser aufgetragen.

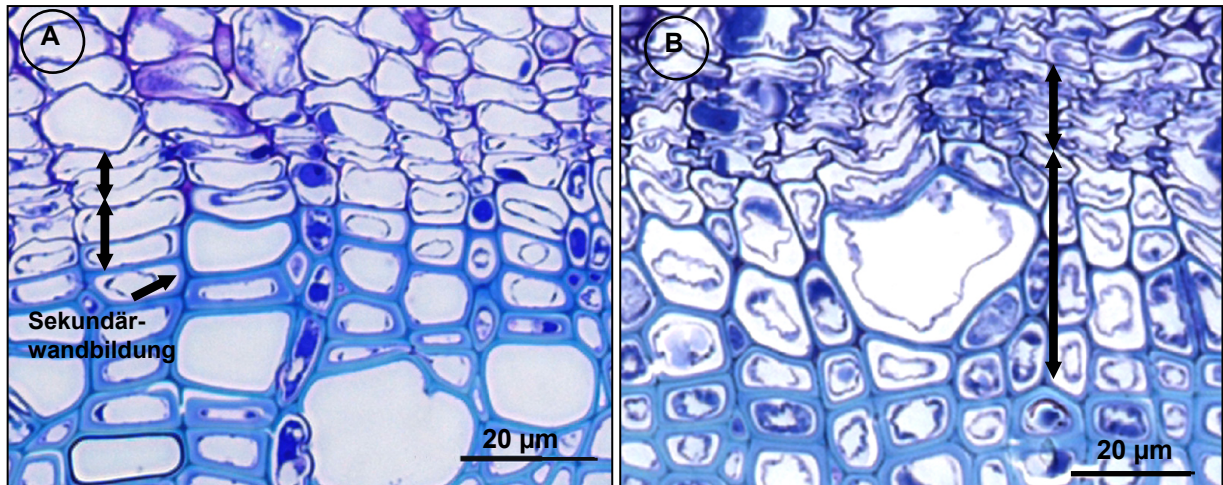


Abb. 3.21: Einfluss von Abscisinsäure auf die radiale Ausdehnung der cambialen Zone sowie der Zellexpansionszone (Pfeile). **A)** Pappel mit ABA behandelt. Cambium: 2-3 Zellen; Zellexpansionszone: 2-3 Zellen; Frühzeitiges Einsetzen der Sekundärwandbildung. **B)** Pappel mit Wasser behandelt. Cambium: 4-6; Differenzierungszone: 3-5 Zellen.

3.10 Lokalisierung der Kaliumkanäle PTK2 und PTORK

Neben der Analyse anatomischer und physiologischer Aspekte des kaliumabhängigen Holzwachstums war es Ziel der vorliegenden Arbeit erste Einblicke in die molekularen Grundlagen des Kaliumhaushaltes der Holzbildungszone zu gewinnen. Einen Schwerpunkt der Arbeit bildeten daher immunohistochemische Untersuchungen von Ionen-transportproteinen, die in den zellulären Kaliumtransport eingebunden sind. Durch die Arbeitsgruppe Hedrich¹ wurden unterschiedliche Kaliumtransporter von *P. tremula x tremuloides* kloniert und funktionell charakterisiert (LANGER *et al.* 2002). Von diesen wurden für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zwei Kaliumkanalproteine für die Herstellung spezifischer Antikörper ausgewählt. PTK2 (*P. tremula* K^+ channel 2) ist ein schwach spannungsregulierter Kaliumkanal der *Shaker*-Familie, der im pflanzlichen Gewebe einwärtsgerichtete Ströme vermittelt. PTORK (*P. tremula* *outward rectifying* K^+ channel) ist ein spannungsabhängiger auswärtsgerichteter Kaliumkanal, der ebenfalls der *Shaker*-Familie angehört (Abb. 1.4). Unter Verwendung der entsprechenden spezifischen Antikörper sollte versucht werden, pflanzen-

¹ Julius von Sachs-Institut, Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg, Julius-von-Sachs-Platz 2, 97082 Würzburg

che Kaliumkanäle auf Proteinebene *in situ* nachzuweisen und ihre gewebsspezifische Lokalisation zu zeigen.

Der Nachweis der Spezifität der für die immunologischen Untersuchungen verwendeten Antikörper (s. Kap. 2.8) gegenüber dem jeweiligen Kaliumkanal wurde mittels Westernblotanalyse geführt. Trotz intensiver Bemühungen gelang ein Nachweis der Antikörperspezifität an pflanzlichem Gewebe aufgrund der sehr geringen Konzentration dieser Ionenkanäle in der pflanzlichen Plasmamembran (GAYMARD et al. 1996, URBACH et al. 2000) nicht. Da die Ionenkanalproteine PTK2 und PTORK in der Plasmamembran lokalisiert sind wurden unter anderem Plasmamembranen mittels Zentrifugation im Zweiphasengradienten aus Gewebehomogenaten isoliert (HAWKESFORD et al. 1993) und für die Westernblotanalyse verwendet. Diese Versuche waren jedoch aus dem geschilderten Grund nicht erfolgreich.

Für den Nachweis der Spezifität der verwendeten Antikörper gegenüber dem jeweiligen Kaliumkanal wurde schließlich die sogenannte Oocyten-Technik genutzt. Hierfür wurde c-RNA von PTK2 und PTORK in Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert und aus diesen später die Membranproteine isoliert (BECKER et al. 1996)¹. So ergab die Westernblotanalyse an der Membranfraktion der Oozyten eine dem Molekulargewicht der jeweiligen Kaliumkanalproteine entsprechende Markierung einer einzelnen Bande im Bereich von ca. 94 kDa (Abb. 3.22). Im Gegensatz dazu zeigten Membranfraktionen von Oozyten ohne Injektion von cRNA nach der Westernblotanalyse keine Markierung auf dem Blot.

¹ Die Präparation der Oozyten wurde von Herrn Dietmar Geiger, die Proteinseparation wurde von Herrn Dr. Dirk Becker, beide aus der Arbeitsgruppe Hedrich durchgeführt.

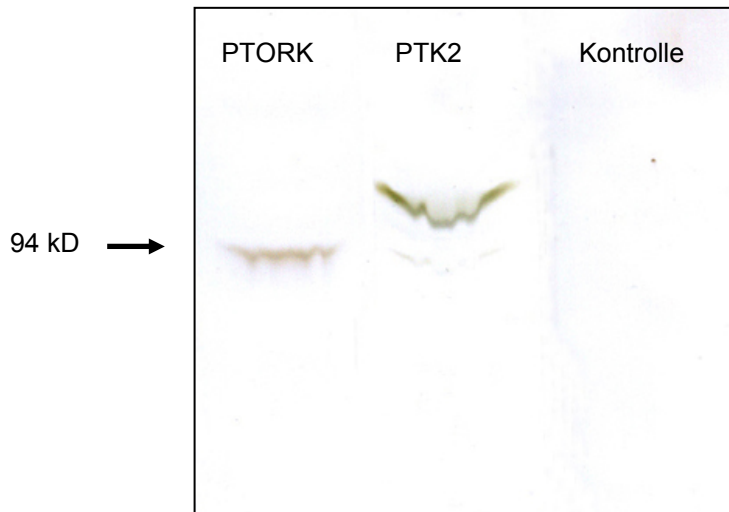


Abb. 3.22: Westernblot der Membranfraktionen von Oocyten mit PTORK c-RNA sowie PTK2 c-RNA. Markierung einer einzelnen Bande im Bereich von 94 kD. Aus der Aminosäuresequenz abgeleitete Molekulargewichte für PTORK: 93,7 kDa und für PTK2: 94,2 kDa. Kontrolle: Oocyten ohne Injektion von c-RNA.

Das Auftreten der Kaliumkanalproteine PTK2 und PTORK im Stammgewebe von *P. tremula x tremuloides* wurde außerdem immunohistochemisch im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die immunofluoreszenzmikroskopischen Lokalisierungen wurden wiederholt an aktivem Stammgewebe durchgeführt. Zur Überprüfung der saisonalen Abhängigkeit im Auftreten und der Verteilung der Ionentransportproteine wurden zudem Proben von Stammgewebe im Herbst- und Winterzustand mit Proben von aktivem Stammgewebe verglichen.

Um die Spezifität der im Gewebe erhaltenen Fluoreszenzmarkierungen zu zeigen, wurden jeweils Kontrollproben als Referenz verwendet. Hierfür wurden die spezifischen Antikörper vor der Inkubation mit dem Gewebeschnitt mit dem entsprechenden Peptid abgesättigt, oder durch Präimmunsereum ersetzt (siehe Kap. 2.8.2).

Als Ergebnis mehrmals durchgeführter Immunolokalisierungen konnten eindeutig die Kaliumkanalproteine PTK2 und PTORK im aktiven Stammgewebe von *P. tremula x tremuloides* nachgewiesen werden, wobei sich die gewebespezifische Lokalisierung der beiden Kaliumkanäle deutlich unterschied (Abb. 3.23 und 3.24).

Im Gegensatz hierzu zeigten Pflanzen im Herbst- und Winterzustand bei allen durchgeführten Immunolokalisierungen von PTK2 und PTORK keine spezifische Markierung (Abb. 3.23 I, 3.24 L). Hier war nur eine leichte, durch Autofluoreszenz und unspezifische Antikörperbindungen verursachte Hintergrundfluoreszenz des Gewebes feststellbar. Das gleiche Bild ergab sich bei den Kontrollproben in denen der spezifische Antikörper mit dem entsprechenden Peptid abgesättigt oder durch Präimmenserum ersetzt wurde (Abb. 3.23 B, 3.24 M).

3.10.1 Immunolokalisierung von PTK2

Eine spezifische Markierung des Kaliumkanalproteins PTK2 ergab sich in den untersuchten Stammquerschnitten vorwiegend im Bereich des Cambiums und des inneren Phloems, welches direkt an das aktive Cambium angrenzt (Abb. 3.23 A). Bei höherer Vergrößerung zeigt sich eine spezifische Markierung vorwiegend in parenchymatischen Phloemzellen (Abb. 3.23 C/D). Cambiumzellen waren dagegen selten und meist nur sehr diffus markiert, ob es sich dabei um eine spezifische Markierung handelt ist unsicher. Desweiteren war PTK2 in Zellen des Strahlparenchyms lokalisiert (Abb. 3.23 A, E/F und G/H), wobei Markierungen sowohl im Strahlparenchym des Xylems als auch im Strahlparenchym des Phloems zu finden waren. Im Holzstrahlparenchym waren gefäßkontaktierende Zellen ebenso häufig markiert wie Holzstrahlzellen ohne Gefäßkontakt (Abb. 3.23 G/H). PTK2 konnte weder in Holzfaserzellen noch in Gefäßen gefunden werden. Alle Kontrollproben zeigten lediglich eine unspezifische Hintergrundmarkierung (Abb. 3.23 B). Auch immunohistochemische Untersuchungen von PTK2 an Stammgewebe im Winterzustand zeigten keine spezifische Markierung (Abb. 3.23 I).

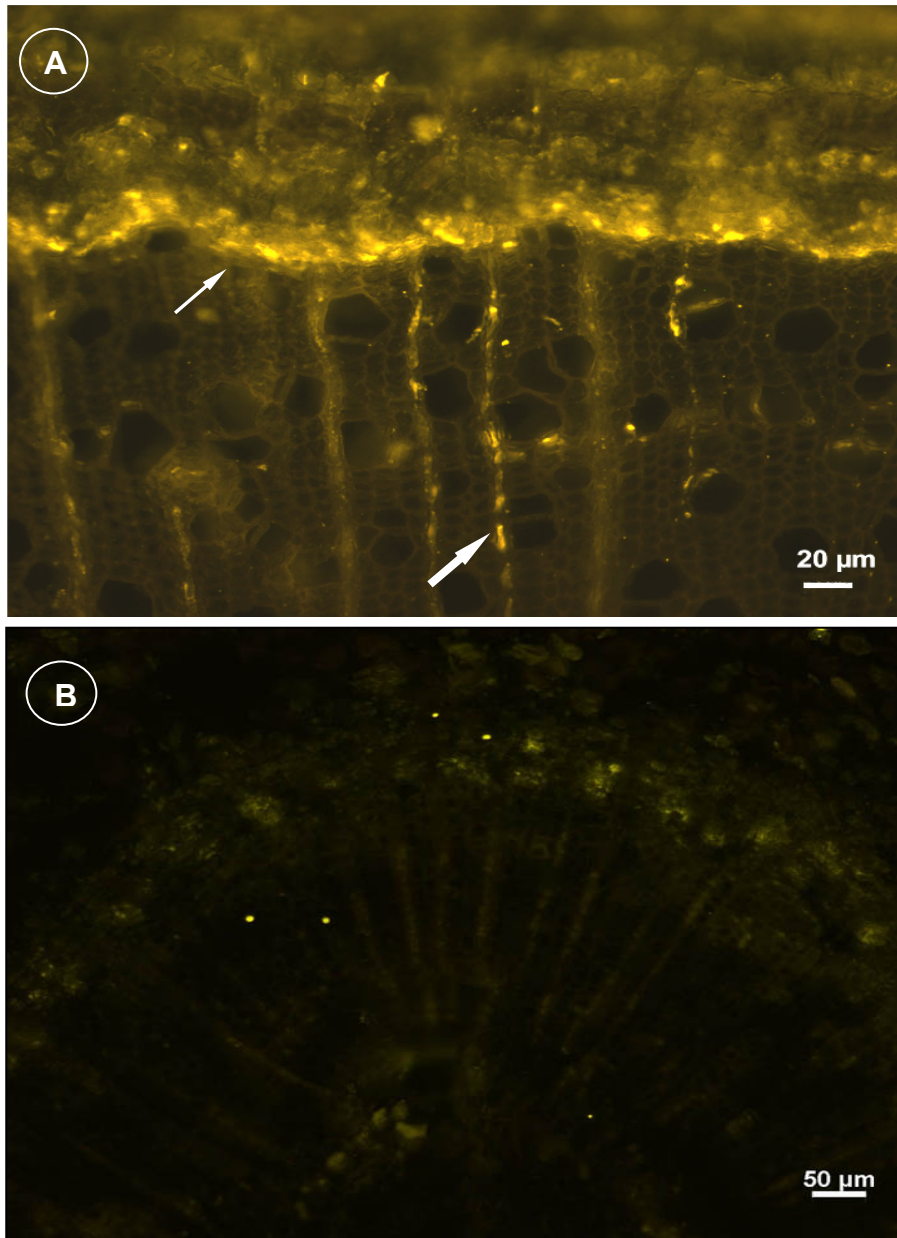


Abb. 3.23: Lokalisierung des Kaliumkanalproteins PTK2 im aktiven Stammgewebe von *P. tremula x tremuloides*. **A)** Gelbe Fluoreszenzmarkierung im Bereich Cambium und Phloem (dünner Pfeil) sowie in den Holzstrahlzellen (dicker Pfeil). **B)** Kontrolle. Gewebeschnitte der selben Stammprobe wie in (A), inkubiert mit Peptid abgesättigtem Antikörper.

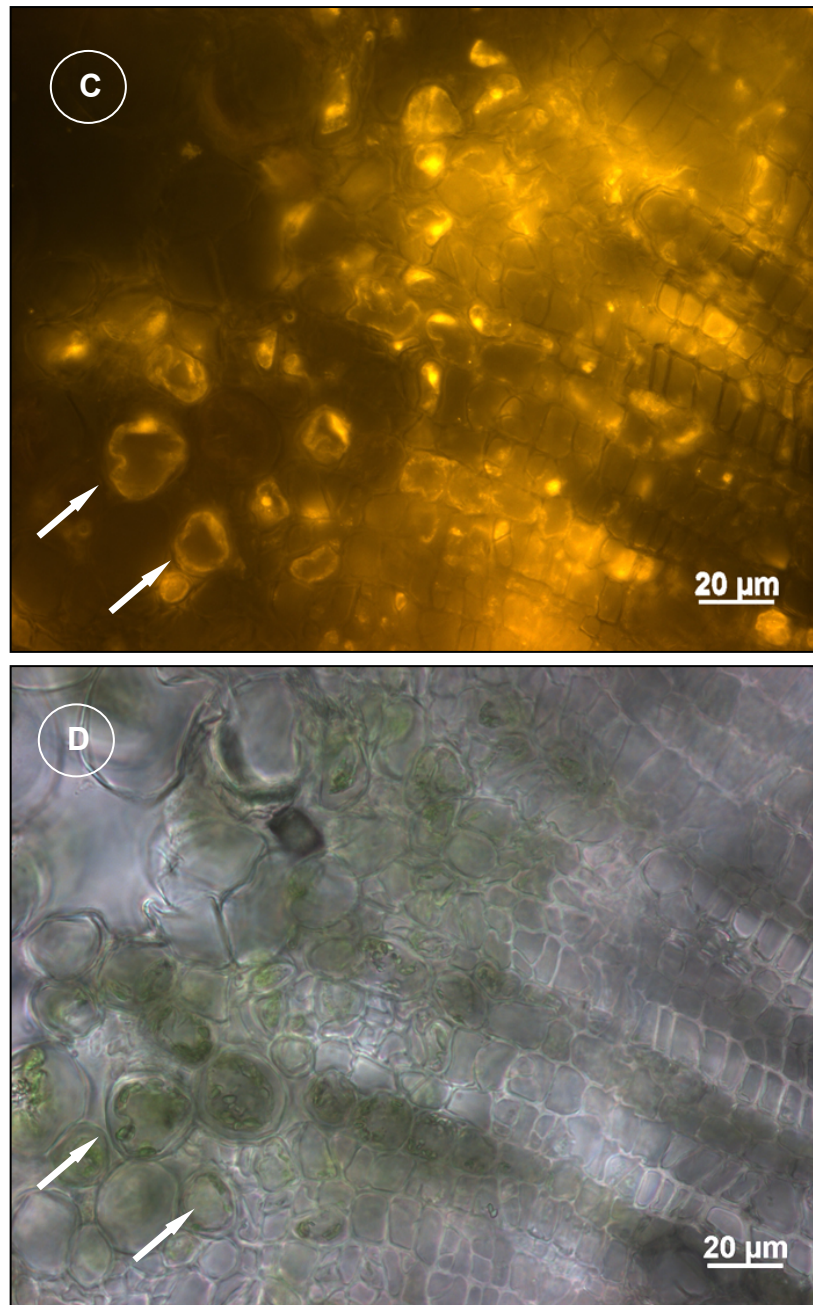


Abb. 3.23: **C)** Spezifische Markierungen des Kaliumkanalproteins PTK2 im Phloemparenchym (Pfeile). **D)** Lichtmikroskopische Aufnahme desselben Ausschnitts wie in (C).

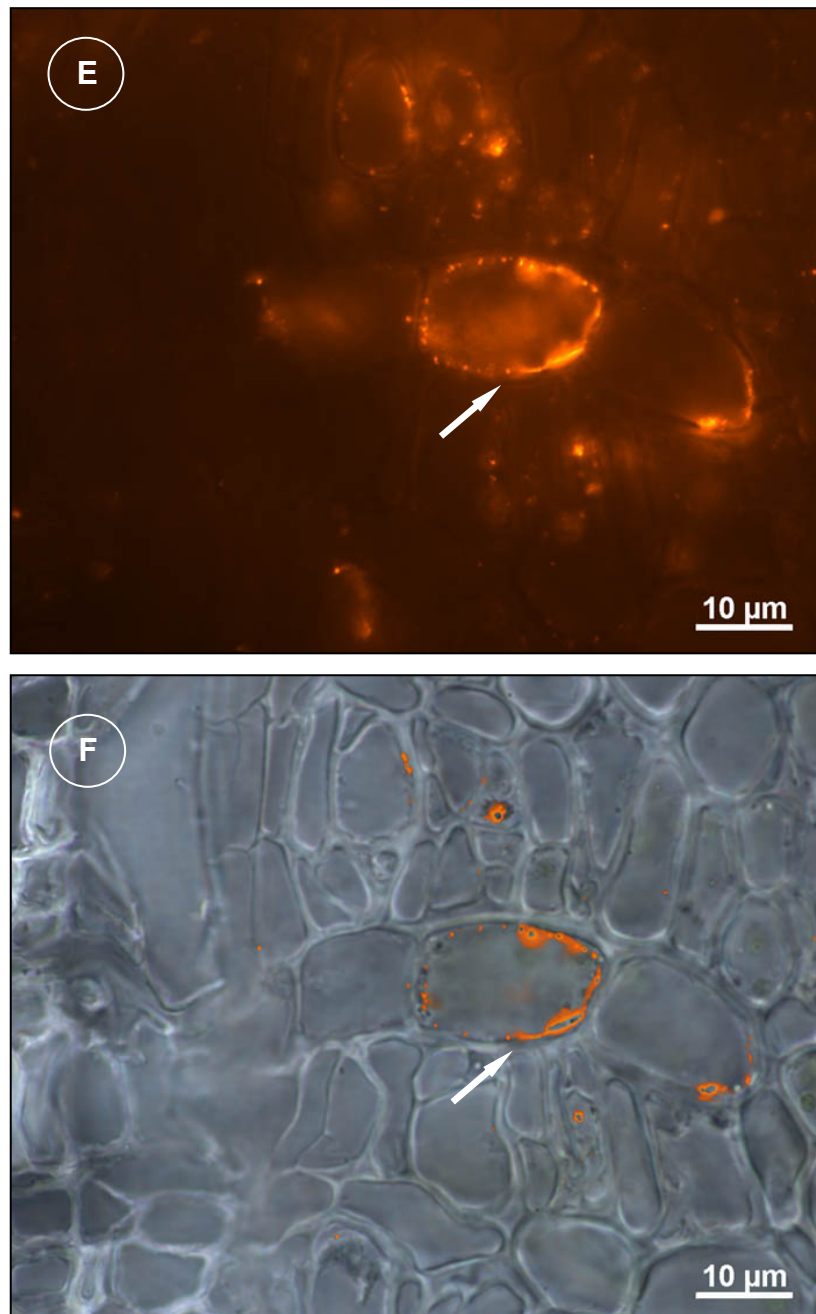


Abb. 3.23: E) Spezifische Markierung einer Strahlzelle im Phloem. Die Markierung kann deutlich der Plasmamembran der Strahlzelle zugeordnet werden (Pfeile). F) Überlagerung einer lichtmikroskopischen Aufnahme des in (E) dargestellten Gewebebereichs mit dem spezifischen Fluoreszenzsignal aus (E).

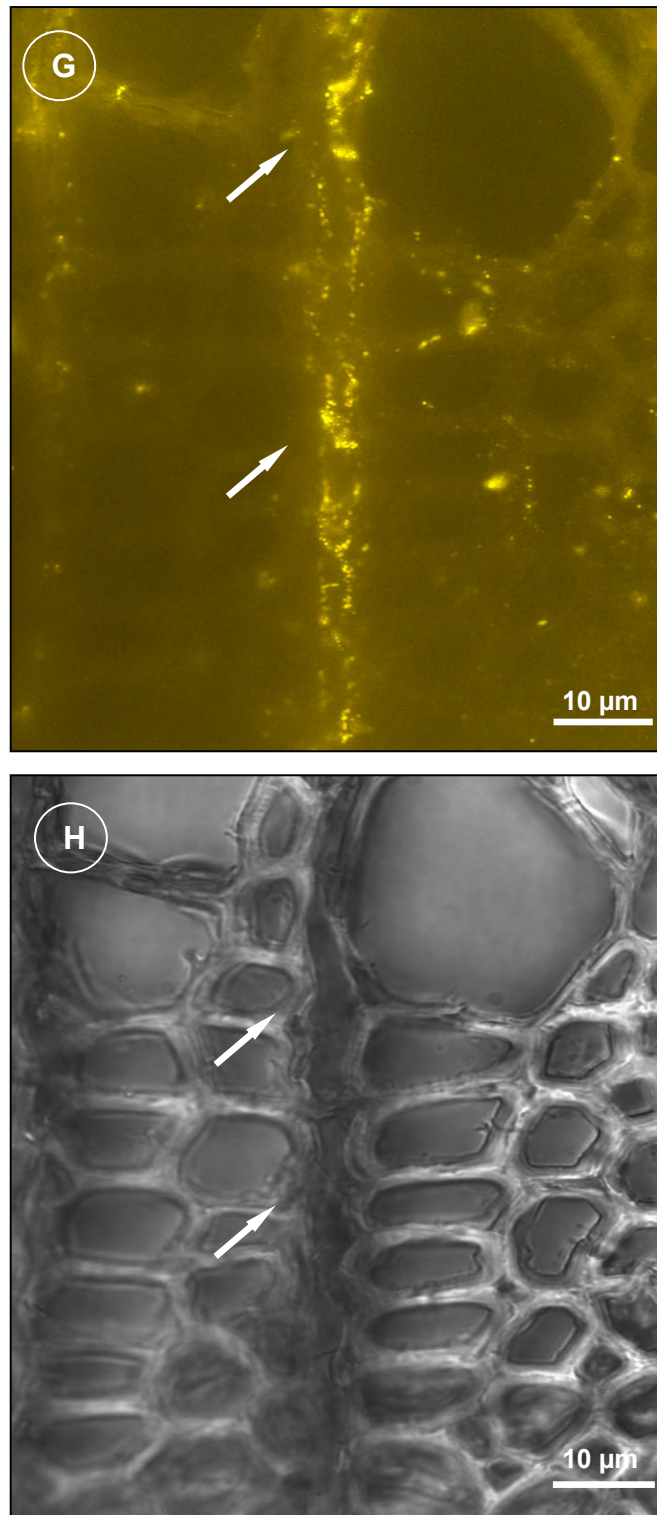


Abb. 3.23: **G)** Spezifische Markierungen in Holzstrahlzellen mit und ohne Kontakt zu Gefäßen (Pfeile). **H)** Lichtmikroskopische Aufnahme des in (G) dargestellten Gewebebereichs.

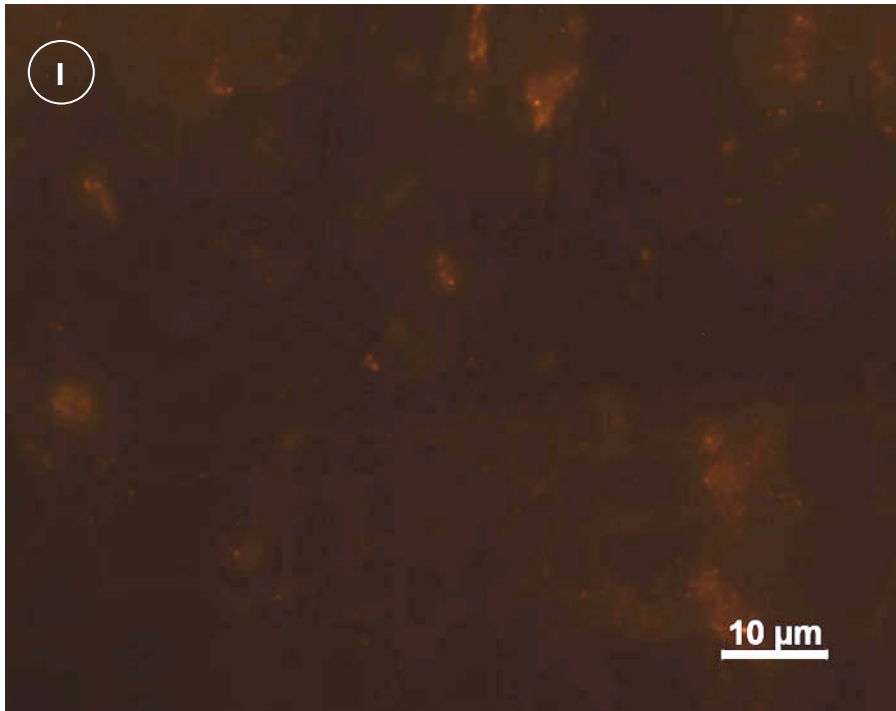


Abb. 3.23: I) Stammquerschnitt von *P. tremula x tremuloides* im Winterzustand. Im Ruhezustand lässt sich keine spezifische Markierung des Kaliumkanals PTK2 nach Inkubation der Proben mit spezifischem Antikörper nachweisen.

3.10.2 Immunolokalisierung von PTORK

Eine spezifische Markierung des Kaliumkanalproteins PTORK fand sich im aktiven Stammgewebe von *P. tremula x tremuloides* in Siebröhren des Phloems (Abb. 3.24 A/B), in Holzstrahlzellen (Abb. 3.24 C/D, E/F) und in jungen, sich differenzierenden Holzfaserzellen (Abb. 3.24 G/H). Im Vergleich zu PTK2 ließen sich die Markierungen für PTORK deutlicher der Plasmamembran zuordnen. Besonders auffällig war die punktartige Verteilung der Markierung entlang der Plasmamembran. In den Holzstrahlzellen trat die Markierung überwiegend in Kontaktzellen¹ auf. Dabei war meist eine einseitige Verteilung der Markierung in Richtung der Gefäßzelle zu beobachten (Abb. 3.24 C, E). Im Gegensatz zu sich differenzierenden Fasern zeigten sich differenzierende Gefäße keinerlei Markierung. In den Zellen des Cambiums konnten ebenfalls keine Markierungen gefunden werden. Alle Kontrollproben (Abb. 3.24 M) zeigten ebenso wie Stammquerschnitte im Winterzustand (Abb. 3.24 L) lediglich eine unspezifische Hintergrundmarkierung.

Da bekannt ist, dass die Expression homologer Kanäle von PTORK in *Arabidopsis thaliana* durch Abscisinsäure (ABA) aktiviert wird (DEEKEN *et al.* 2003) wurde zusätzlich der Effekt von ABA auf den Kaliumkanal PTORK in *P. tremula x tremuloides* untersucht. Nach Vorbehandlung von Stammgewebe mit 50 µM ABA über einen Zeitraum von 5 h ließen sich Markierungen sowohl in Siebröhren als auch in Xylemfasern scheinbar häufiger beobachten (Abb. 3.24 I). Aufgrund der sehr geringen Konzentration des Ionenkanalproteins PTORK in der pflanzlichen Plasmamembran waren die spezifischen Markierungen jedoch bei allen durchgeführten Lokalisierungen nur in sehr geringer Intensität zu beobachten, weshalb sie nur bei vergleichsweise hohen Vergrößerungen erfasst werden konnten². Es gelang daher nicht Übersichtsaufnahmen mit geringer Vergrößerung und entsprechend kleinen Bildausschnitten von mit ABA behandelten und unbehandelten Gewebe festzuhalten und diese vergleichend gegenüberzustellen. Die immunohistochemischen Untersuchungen gaben somit nur einen Hinweis darauf, dass die Expression des Kaliumkanals PTORK durch Abscisinsäure induziert wird. Ein quantitativer Nachweis konnte jedoch mit dieser Methode nicht gegeben werden.

¹ Gefäßkontaktierende Zellen des Holzstrahlparenchyms (BRAUN 1967).

² Aufnahmen bei hoher Vergrößerung resultieren in einer stärkeren Intensität des Fluoreszenzsignals.

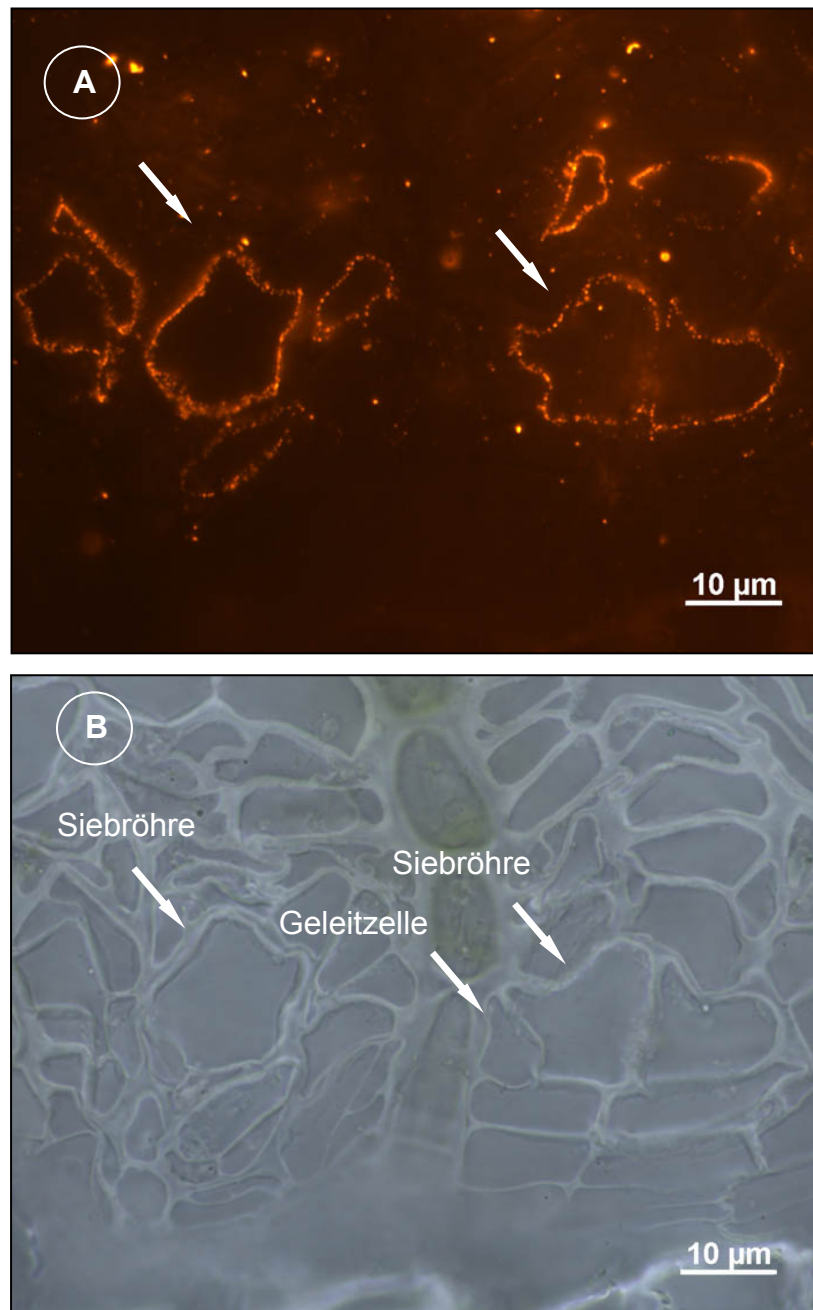


Abb. 3.24: Lokalisierung des Kaliumkanalproteins PTORK im aktiven Stammgewebe von *P. tremula x tremuloides*. **A)** Spezifische Markierungen an der Plasmamembran von Siebröhren im inneren Phloem. Auffällig ist eine punkartige Verteilung der Markierung (Pfeile). **B)** Lichtmikroskopische Aufnahme desselben Ausschnitts wie in (A).

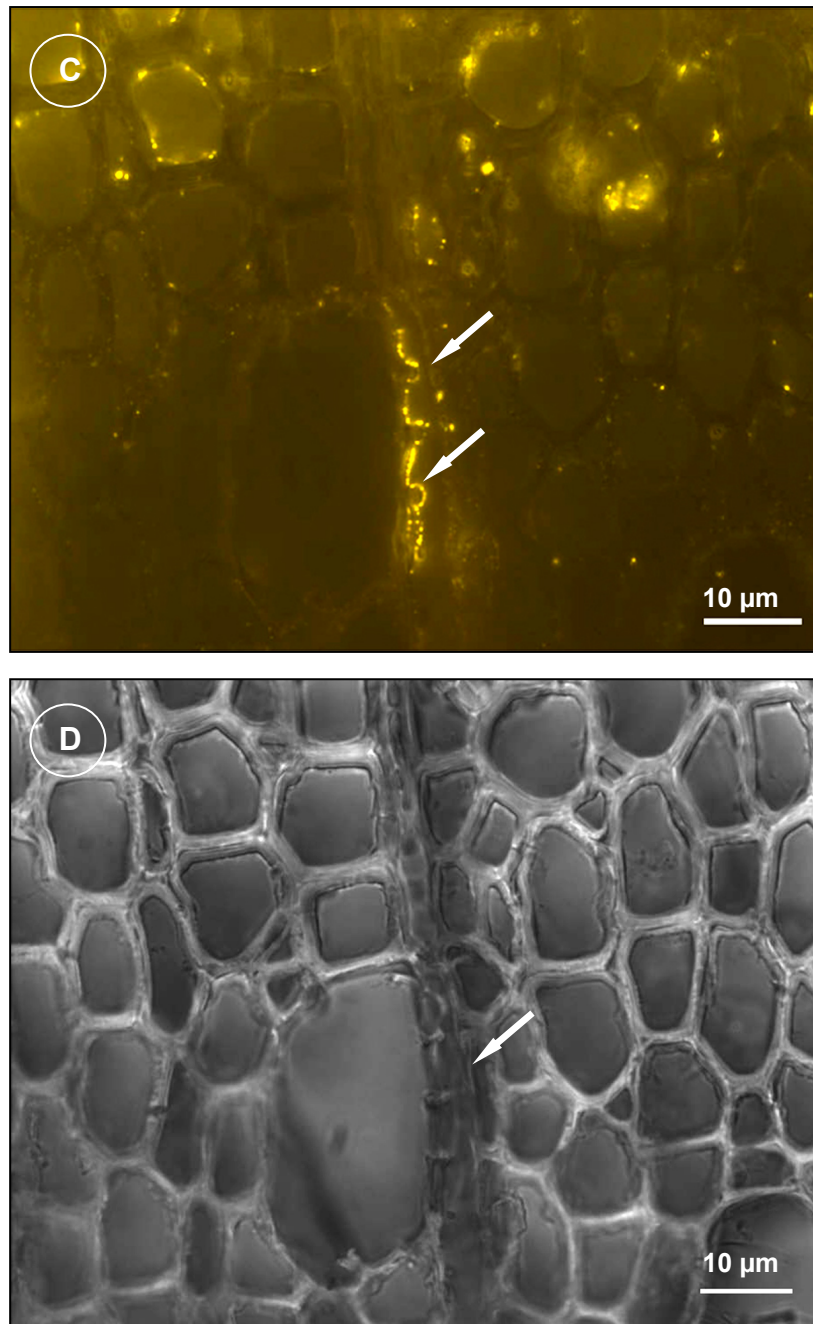


Abb. 3.24: C) Spezifische Markierung einer Holzstrahlzelle. Einseitige Ausrichtung der Markierung zu einem Gefäß (Pfeile). Auffällig ist eine punkartige Verteilung der Markierung an der Plasmamembran. D) Lichtmikroskopische Aufnahme desselben Ausschnitts wie in (C).

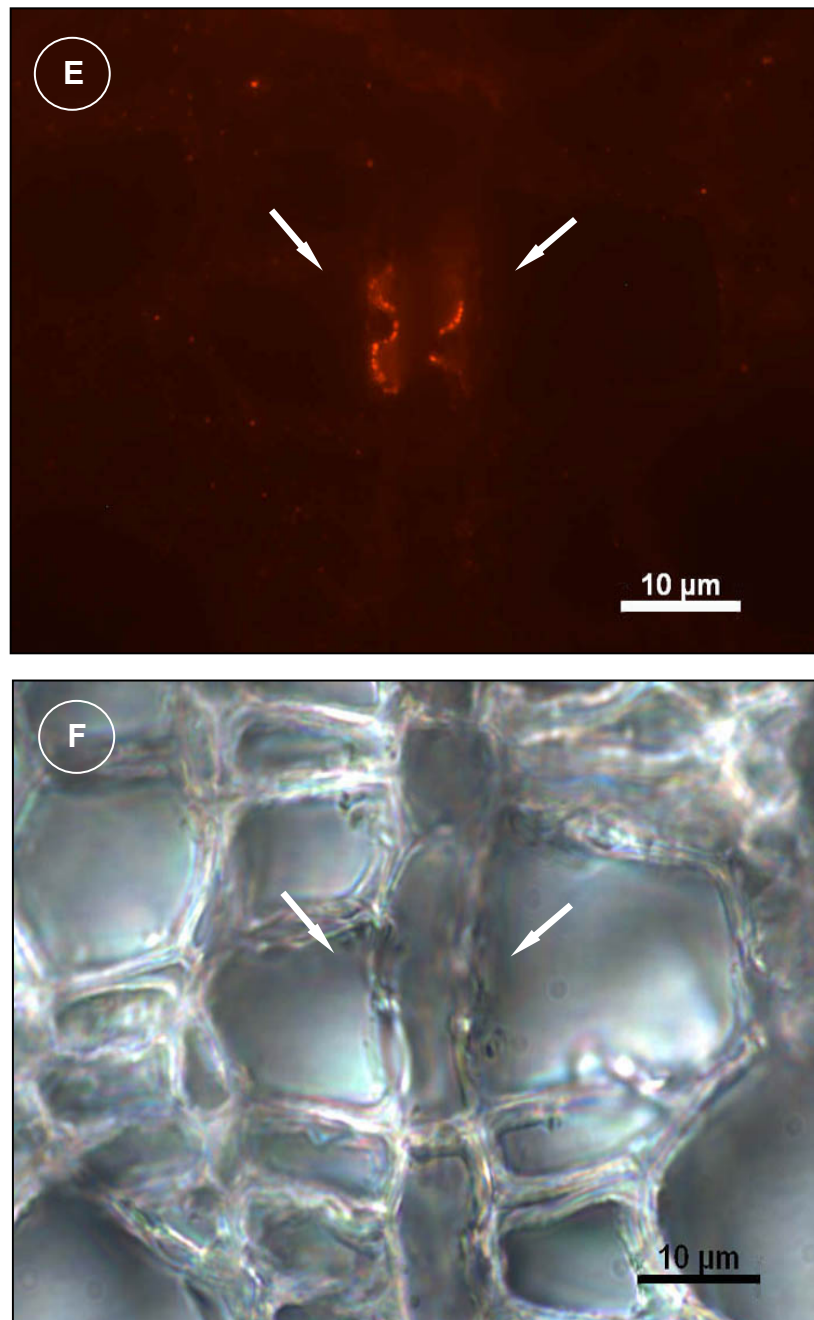


Abb. 3.24: **E)** Spezifische Markierung einer Holzstrahlzelle. Beidseitige Ausrichtung der Markierung zu Gefäßen (Pfeile). **F)** Lichtmikroskopische Aufnahme desselben Ausschnitts wie in (E).

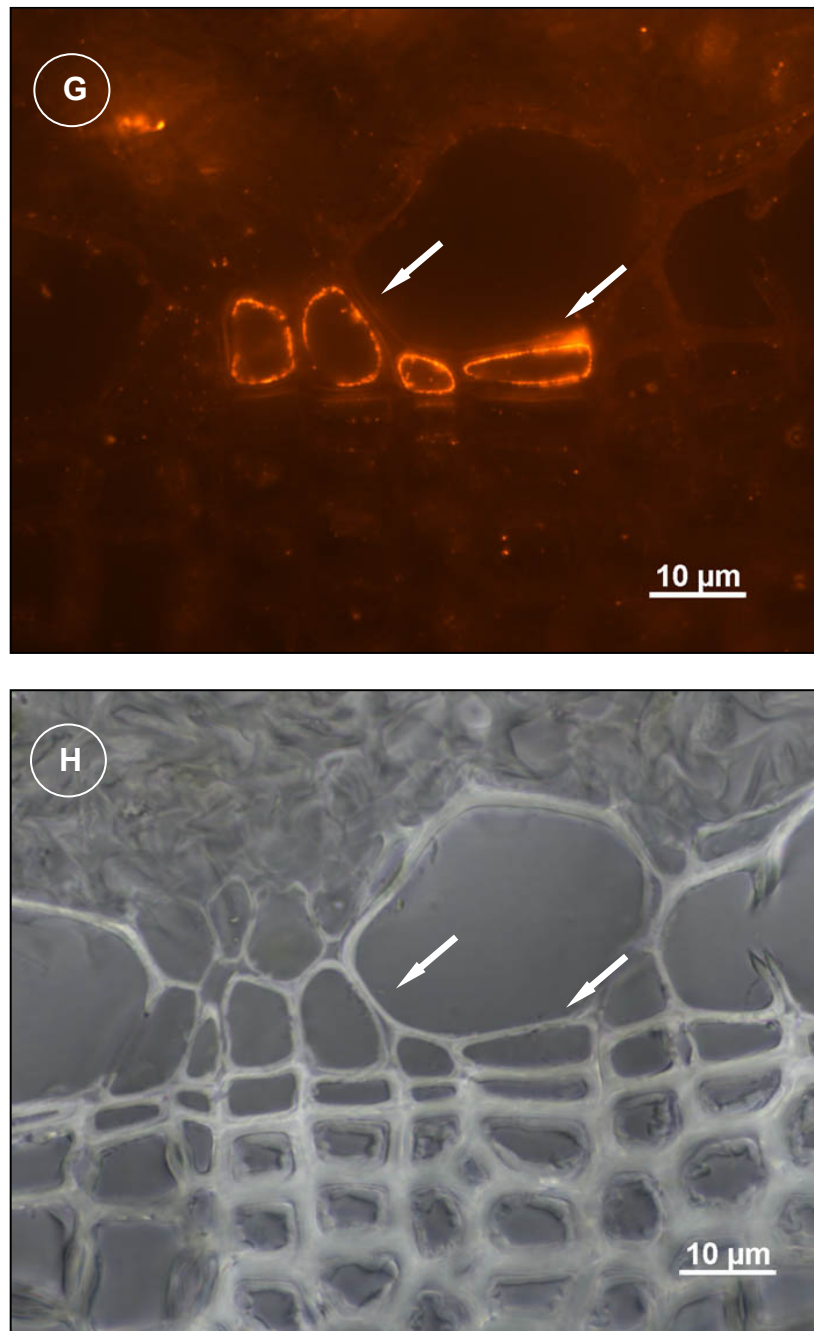


Abb. 3.24: **G)** Spezifische Markierungen junger Fasern (Pfeile). Die Markierung ist eindeutig an der Plasmamembran lokalisiert. Gefäße zeigen keine Markierung. **H)** Lichtmikroskopische Aufnahme desselben Ausschnitts wie in (G).

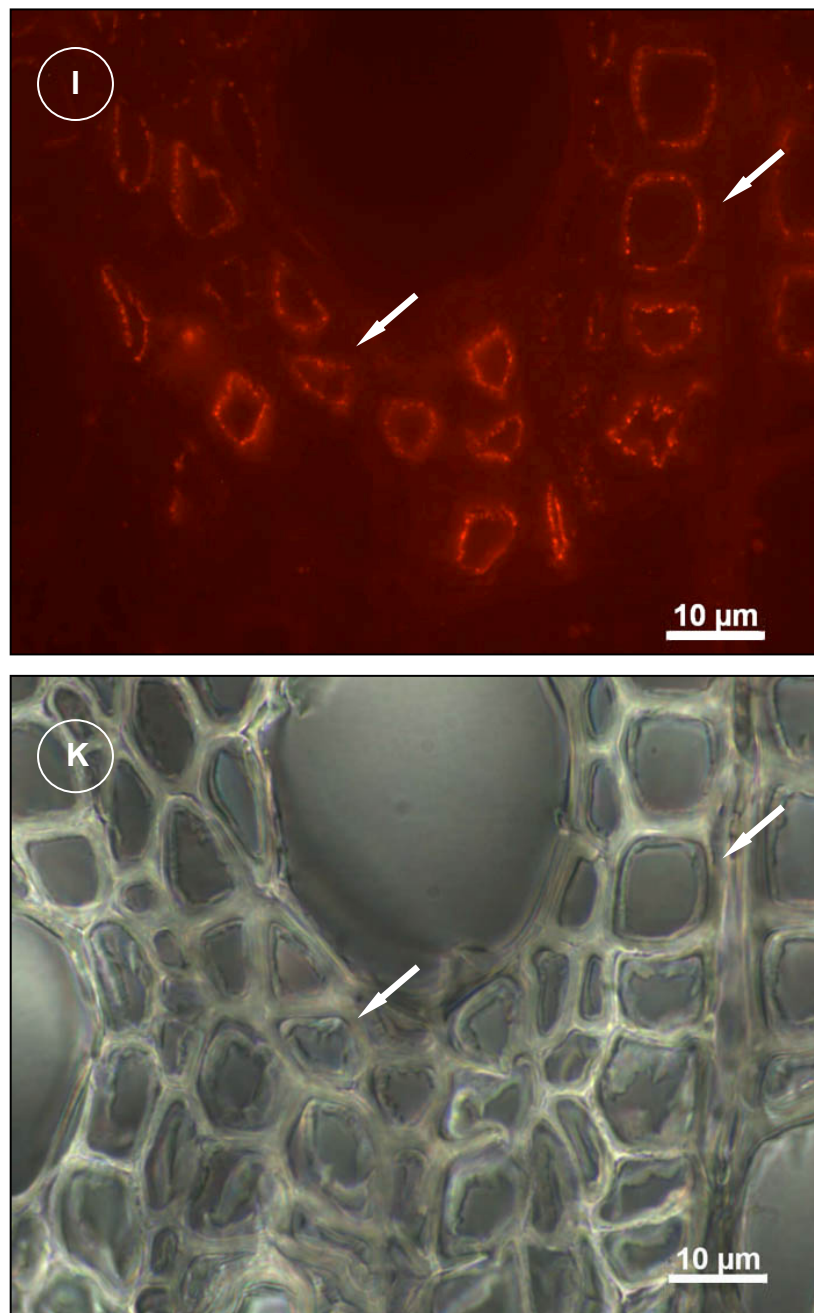


Abb. 3.24: I) Stammgewebe vorbehandelt für 5 h mit 50 µM ABA. Gehäufte Markierung junger Fasern. K) Lichtmikroskopische Aufnahme desselben Ausschnitts wie in (I).

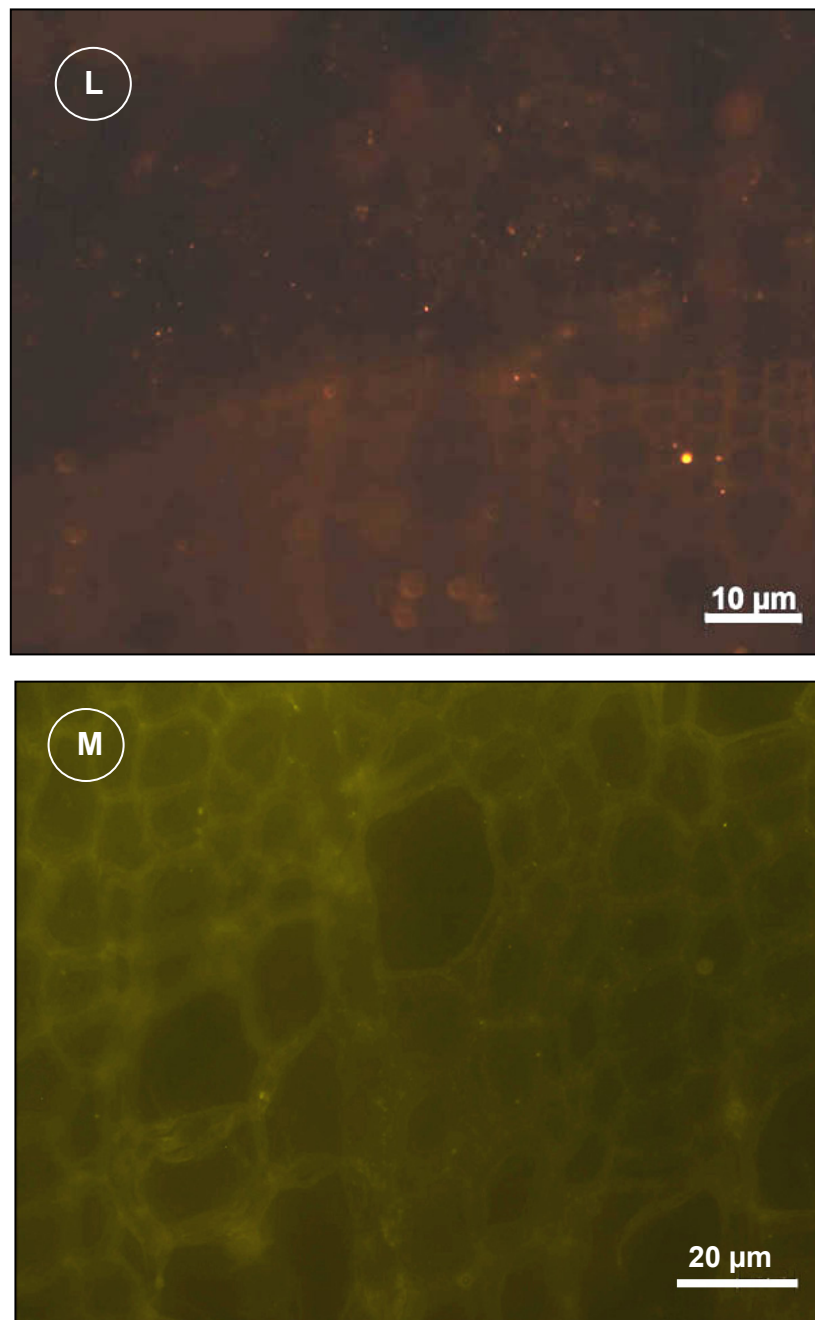


Abb. 3.24: L) Stammgewebe von *P. tremula x tremuloides* im Winterzustand inkubiert mit spezifischem Antikörper gegen PTORK. Keine Fluoreszenzmarkierung ersichtlich. M) Kontrolle: Stammgewebe von *P. tremula x tremuloides* im aktiven Zustand, inkubiert mit peptidgesättigtem Antikörper. Keine Fluoreszenzmarkierung nachweisbar.

3.10.3 Immungoldmarkierung im Transmissionselektronenmikroskop

Mit verschiedenen Verfahren der Immunogoldmarkierung wurde versucht auf der Ebene der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) die Feinlokalisierung der Kaliumkanalproteine PTK2 und PTORK innerhalb der Zelle zu zeigen. Die Markierungsversuche wurden sowohl an kompakten Gewebestücken nach der *preembedding* Methode¹, als auch an eingebetteten Ultradünnschnitten nach der *postembedding* Methode durchgeführt. Die Anwendung der *preembedding* Methode war aufgrund der sehr schlechten Erhaltung zellulärer Strukturen nicht erfolgreich, so dass für weitere Versuche nur die *postembedding* Methode wie in Kapitel 2.8.3 beschrieben angewandt wurde. Erste Lokalisierungsversuche nach dieser Methode wurden jedoch durch das Auftreten sehr starker, unspezifischer Hintergrundmarkierungen erschwert. Durch Überführung der Ultradünnschnitte auf kohlebedampfte Nickelgrids, anstelle von den üblicherweise verwendeten formvarbeschichteten Nickelgrids, konnten jedoch unspezifische Hintergrundmarkierungen deutlich reduziert werden.

Die Kontrolle der Spezifität der erhaltenen Markierungen erfolgte durch Vergleich mit entsprechenden Kontrollproben. Hierzu wurden die spezifischen Antikörper mit dem jeweiligen Peptid abgesättigt.

Es zeigte sich bei den mehrfach durchgeführten Markierungsversuchen, dass eine Feinlokalisierung der Kaliumkanalproteine durch ihre sehr geringe Konzentration in der pflanzlichen Plasmamembran stark erschwert ist. So gelang eine Feinlokalisierung des Kaliumkanalproteins PTORK im TEM nicht, da spezifische Markierungen auf Grund ihrer sehr geringen Häufigkeit nicht eindeutig von unspezifischer Hintergrundmarkierung unterschieden werden konnten.

Das Kaliumkanalprotein PTK2 konnte dagegen mit der *postembedding Methode* eindeutig in parenchymatischen Zellen des Phloems sowie in Holzstrahlzellen nachgewiesen werden (Abb. 3.25 A-D). Die Markierungen waren hierbei an der Plasmamembran dieser Zellen konzentriert, während sich die Markierungen anderer Zellstrukturen nicht von den Hintergrundmarkierungen der Kontrollproben unterscheiden ließen und somit als unspezifisch einzuordnen waren.

¹ Nach der *preembedding* Methode wird die Markierungsprozedur vor der Einbettung der Proben durchgeführt. Nach der *postembedding* Methode werden nach Einbettung der Proben Ultradünnschnitte angefertigt. Die Markierungsprozedur erfolgt an den Ultradünnschnitten.

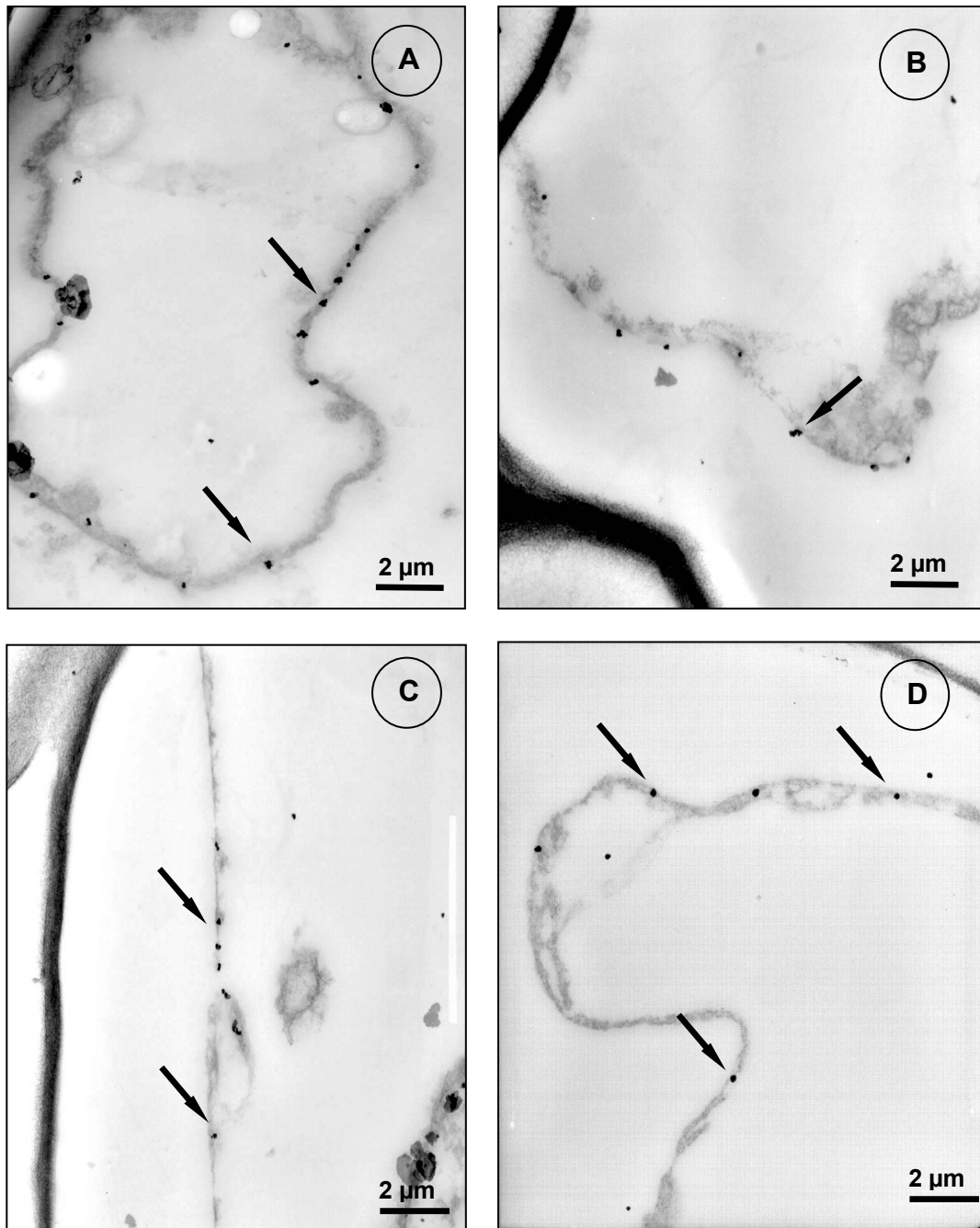


Abb. 3.25: Feinlokalisierung von PTK2 im TEM. **A)** und **B)** Spezifische Markierungen entlang der Plasmamembran von Holzstrahlzellen (Pfeile). **C)** und **D)** Spezifische Markierungen entlang der Plasmamembran von Phloemparenchymzellen (Pfeile).

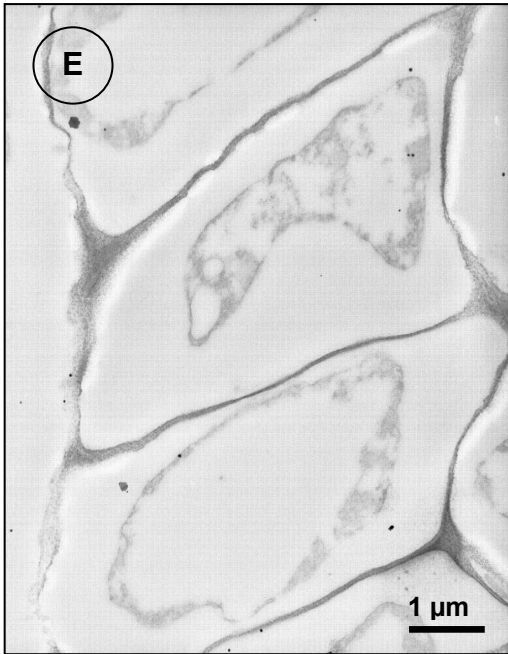


Abb. 3.25: E) Kontrollprobe, inkubiert mit Peptid-gesättigtem Antikörper. Vereinzelt unspezifische Markierungen.

3.11 Einfluss der Kaliumernährung auf die PM H⁺ ATPase

Die PM H⁺-ATPase spielt eine wichtige Rolle beim Transport von K⁺ durch die Ionenkanäle der pflanzlichen Plasmamembran (BRISKIN and GAWIENOWSKY 1996). Aus diesem Grund wurde in die vorliegende Arbeit eine Untersuchung der PM H⁺-ATPase einbezogen. Immunologische Techniken wurden angewandt, um den Einfluss der unterschiedlichen Kaliumernährung auf die PM H⁺-ATPase zu untersuchen. Unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers (s. Kap. 2.8) gegen die PM H⁺-ATPase wurden Westernblot Analysen und Enzymlokalisierungen durchgeführt. Die Spezifität des genutzten Antikörpers gegenüber dem entsprechenden Enzym aus *P. tremula x tremuloides* konnte durch Westernblotanalyse von Gewebehomogenaten gezeigt werden. Entsprechend dem bekannten Molekulargewicht der PM H⁺-ATPase erkannte der Antikörper im Westernblot ein einzelnes Polypeptid im Bereich von 100 kD (Abb. 3.26 A). Desweiteren bestand die Möglichkeit, die durch unterschiedliche Kaliumernährung bedingten Veränderungen im Auftreten der PM H⁺-ATPase abzuschätzen. So ließ sich durch die Westernblotanalyse ein deutlicher Unterschied im Enzymgehalt des Stammgewebes zeigen. Bei der Kaliummangelvariante zeigte sich (bei Einsatz gleicher Proteinnengen) im Molekulargewichtsbereich von 100 kDa eine deutlich stärkere Bande als bei normaler Kaliumernährung. Dies wird durch einen Vergleich der Bandenintensität mittels Graustufenmessung besonders deutlich (s. Abb. 3.26 B).

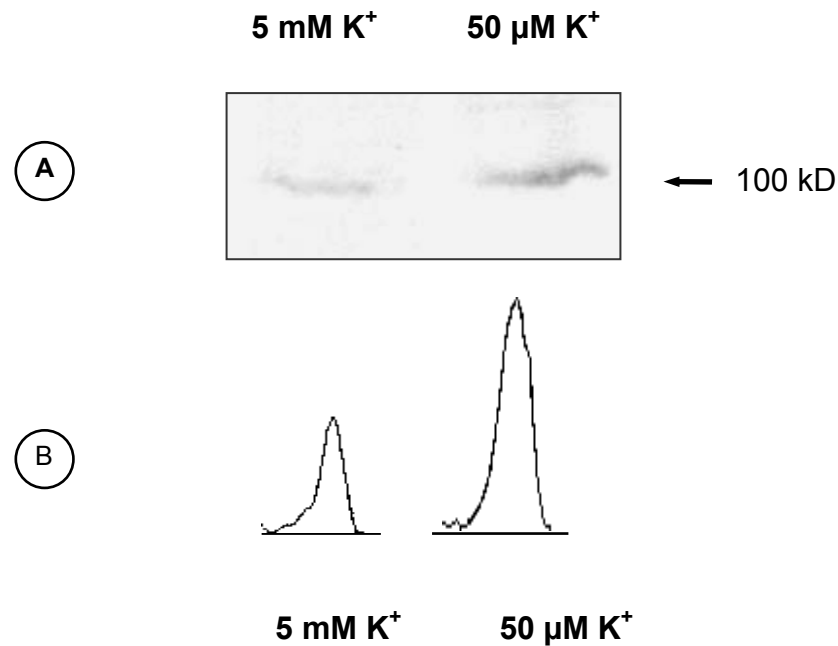


Abb. 3.26: **A)** Westernblot von Stammgewebehomogenaten beprobt mit monoklonalem Antikörper 46 E5 B11, subclone F6 gegen PM H⁺-ATPase. Jeweils 20 µg aufgetragenes Gesamtprotein von Pflanzen mit normaler Kaliumernährung (5 mM K⁺) und Pflanzen mit reduzierter Kaliumernährung (50 µM K⁺). In beiden Spuren zeigte sich die spezifische Markierung eines einzelnen Polypeptids im Bereich von 100 kDa. **B)** Vergleich der Bandenintensität durch Graustufenmessung. Das Zweiggewebehomogenat von Pflanzen mit reduzierter Kaliumversorgung zeigt deutlich stärkere Bandenintensität im Bereich von 100 kDa.

Neben dem Einfluss der Kaliumversorgung auf den Gehalt des Stammgewebes an PM H⁺-ATPase wurde auch die Verteilung des Enzyms im Stammquerschnitt untersucht. Hierzu wurden immunohistologische Lokalisierungen im Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Kaliumernährung keinen Einfluss auf die Verteilung der PM H⁺-ATPase im Stamm hat. So war das Enzym in Pflanzen beider Versuchsgruppen (normale und reduzierte Kaliumversorgung) in Zellen des Phloems, des Cambiums, des Holzstrahlparenchyms und in sich differenzierenden Xylemzellen nachweisbar (Abb. 3.27 A-D). Sehr auffällig war jedoch eine unterschiedliche Intensität der Fluoreszenzmarkierungen im Stammgewebe beider Versuchsvarianten. So waren Zellen des Holzstrahlparenchyms der Pflanzen mit reduzierter Kaliumversorgung deutlich stärker markiert als bei der Variante mit normaler Kaliumversorgung (Abb. 3.27 A-D). Kontrollen zeigten keine Markierungen (Abb. 3.27 E).

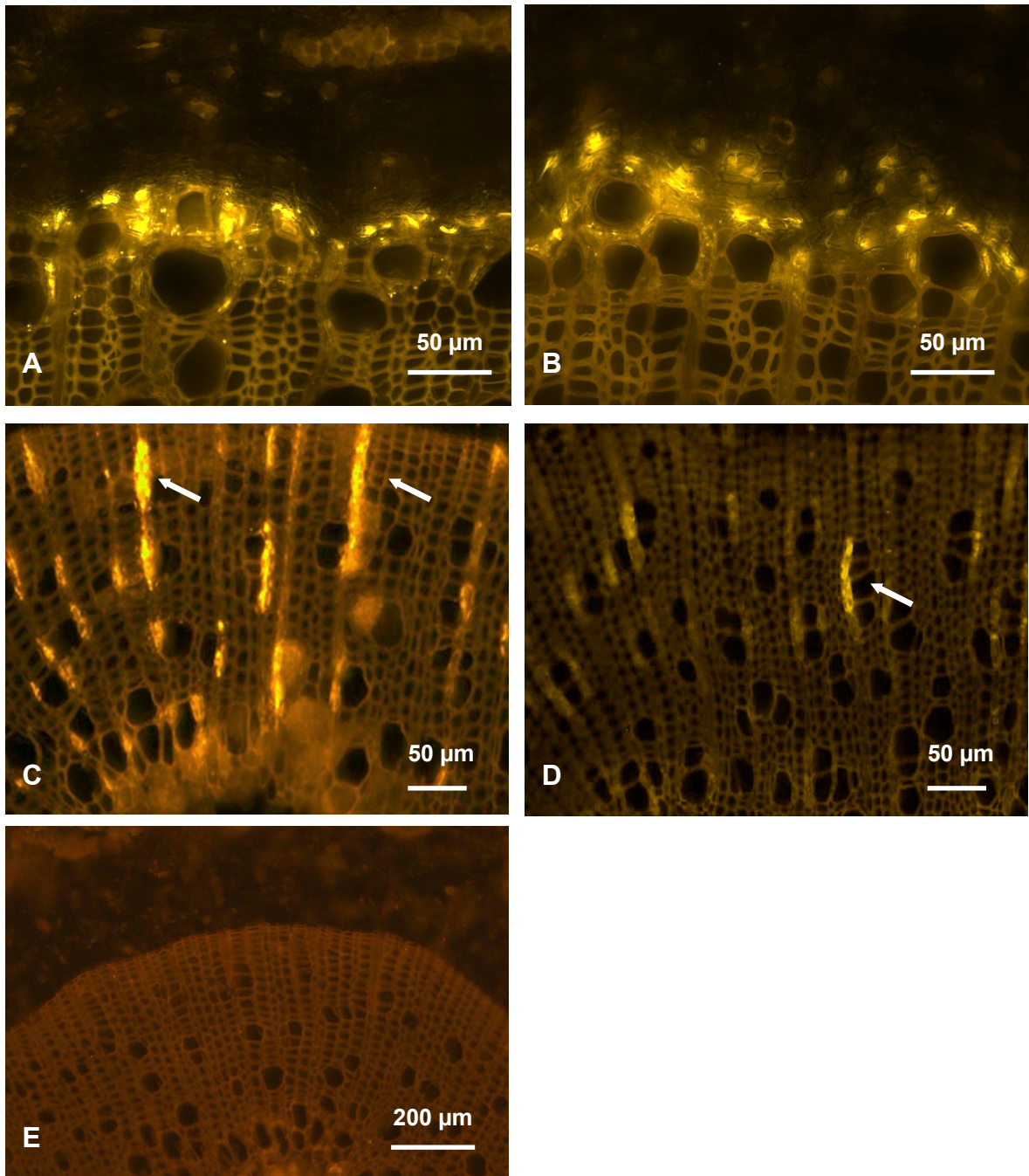


Abb. 3.27: Einfluss der Kaliumernährung auf das Auftreten der PM H^+ -ATPase im Stammgewebe der Versuchspflanzen. **A)** und **C)** Stammquerschnitte von Pflanzen mit reduzierter Kaliumversorgung. Auftreten der PM H^+ -ATPase im Bereich Cambium / Xylem und im Holzstrahlparenchym. Auffällig starke Fluoreszenzmarkierung von Holzstrahlzellen (Pfeile). **B)** und **D)** Stammquerschnitt von Pflanzen mit normaler Kaliumversorgung. Auftreten der PM H^+ -ATPase im Bereich Cambium / Xylem und im Holzstrahlparenchym. Vergleichsweise geringe Markierung im Holzstrahlparenchym (Pfeil). **E)** Kontrolle, spezifischer Antikörper gegen PM H^+ -ATPase wurde durch unspezifisches Maus IgG ersetzt.

4 Diskussion

Ein zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit war es, am Beispiel der Modellpflanze *P. tremula x tremuloides*, die Bedeutung des Kaliumhaushaltes für die holzbildenden Prozesse im vasculären Cambium und den aus ihnen hervorgehenden xylogenen Zellerivaten aufzuklären. Hierfür wurde durch unterschiedlich gestaltete Kaliumernährung der Kaliumgehalt im Bereich der Holzbildungszone von Versuchspflanzen gezielt verändert. Dabei war eine Beeinflussung physiologischer Vorgänge in anderen Bereichen der Versuchspflanzen und damit bedingt eine sekundäre Beeinflussung der holzbildenden Prozesse nicht auszuschließen. So ist bekannt, dass Kaliummangel in Pflanzen die Photosyntheserate mindert (SEN GUPTA *et al.* 1989) oder das Wurzelwachstum aktiviert (PEUKE *et al.* 2002). Die Manipulation der Ernährung erwies sich jedoch als einzig praktikabler Weg die Kaliumgehalte im Bereich der Holzbildungszone gezielt zu variieren. Da, wie auch aus den durchgeführten Elementanalysen ersichtlich, das cambiale Gewebe ein besonders starkes *sink* für Kalium darstellt (siehe auch KUHN *et al.* 1997; AREND *et al.* 2002), wirkt sich eine Variation der Kaliumernährung vergleichsweise stark auf den cambialen Kaliumhaushalt aus. Mikroanalytische Untersuchungen der Elementverteilung im Stammgewebe der Versuchsbäume zeigten zudem, dass eine Variation der Kaliumernährung einen besonders starken Effekt auf den Gewebebereich der Holzbildungszone hatte, während die Gewebe des Phloems und ausdifferenzierten sekundären Xylems vergleichsweise gering beeinflusst wurden. Der Versuchsansatz über die Mineralernährung den Kaliumhaushalt der Holzbildungszone zu variieren ist somit, trotz einer Beeinflussung anderer pflanzenphysiologischer Grundprozesse, als geeignetes Mittel zur Untersuchung der Bedeutung von Kalium für die Holzbildung zu sehen.

4.1 Einfluss der Kaliumernährung auf die Elementgehalte und den Kaliumhaushalt der Holzbildungszone

Elementgehalte im Stammgewebe der Versuchspflanzen wurden sowohl mittels mikroanalytischer Röntgenanalyse (EDXA) als auch mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) bestimmt. Dabei ermöglichte die EDXA in Kombination mit der Rasterelektronenmikroskopie eine semiquantitative Elementbestimmung im intakten Stammgewebe auf zellulärer Ebene. Ergänzend hierzu erlaubte die AAS eine quantitative Bestimmung der Elementgehalte größerer Gewebebereiche.

Durch die Kombination von EDXA und AAS konnte eine deutliche Abhängigkeit der Kaliumgehalte cambialer Zellen und sich differenzierender Xylemzellen von der Kaliumernährung der Versuchspflanzen belegt werden. Eine Verringerung der Kaliumversorgung reduzierte deutlich die Kaliumgehalte in diesen Zellen, während eine verstärkte Kaliumversorgung die Kaliumgehalte in diesen Zellen erhöhte. Der zentrale Versuchsansatz über die Mineralernährung die Kaliumgehalte in den Zellen der Holzbildungszone zu variieren, war somit erfolgreich. Unter Kaliummangel angezogene Versuchspflanzen ließen sich zudem phänotypisch eindeutig von den beiden anderen Versuchsvarianten unterscheiden. Sie zeigten mit fortgeschrittener Versuchsdauer typische Kaliummangelsymptome, wie Blattnekrosen, reduziertes Sprosswachstum und eine geringere Stabilität der Sprossachse (PISSAREK 1973; MARSCHNER und ÇAKMAK 1989).

EDX-Analysen der Kaliumverteilung im Stammgewebe zeigten weiterhin eine deutliche Akkumulation von Kalium im Cambium und der Xylemdifferenzierungszone im Vergleich zu anderen Gewebebereichen. Diese war bei verbesserter Kaliumernährung am stärksten ausgeprägt, während unter limitierenden Kaliumbedingungen nur noch eine schwach ausgeprägte Akkumulation zu beobachten war. Dabei wurde vor allem in sich differenzierenden Gefäßen und cambialen Zellen, welche eine extrem starke Vakuolisierung aufweisen (AREND und FROMM 2003), der Kaliumgehalt durch die unterschiedlich gestaltete Mineralernährung stark variiert. Dies deutet darauf hin, dass die Veränderungen der Kaliumkonzentration vor allem im Bereich der Vacuole stattfinden, während das Cytoplasma wenig zu den beobachteten Veränderungen der Kaliumkonzentration beiträgt. So wurde bereits in Untersuchungen von WALKER *et al.* (1996) gezeigt, dass eine Veränderung der pflanzlichen Kaliumversorgung vor allem den Kaliumhaushalt der Vacuole variiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin ein Zusammenhang zwischen dem zellulären Kaliumgehalt und der radialen Zellstreckung der sich aus dem Cambium differenzierenden Xylemzellen festgestellt werden. In cambialen Zellen und in sich differenzierenden Gefäßen wurden vergleichsweise hohe Kaliumwerte gemessen, während diese in differenzierenden Faserzellen deutlich geringer waren. So erfordert die starke Volumenzunahme der aus dem Cambium hervorgehenden Gefäße sicherlich einen besonders ausgeprägten Mechanismus der Zellstreckung, welcher durch eine verstärkte Akkumulation von Kalium angetrieben wird (PITMAN *et al.* 1971; LÜTTGE and HIGINBOTHAM 1979; HSIAO and LÄUCHLI 1986; MARSCHNER 1995). Die im Gegensatz zu Gefäßen

schwächer ausgeprägte Zellstreckung der kleinumigeren Fasern kann somit die vergleichsweise geringe Akkumulation von Kalium in diesen Zellen erklären.

Neben Kalium als auffälligstem Element in den Zellen der Holzbildungszone zeigten die durchgeführten EDX-Analysen zudem eine durch Variation der Mineralernährung bedingte Veränderung im Auftreten weiterer Elemente. So war bei Versuchspflanzen mit reduzierter Kaliumernährung eine deutliche Anreicherung von Natrium im Bereich der Holzbildungszone feststellbar. Es konnte somit ein deutlicher K^+ / Na^+ -Ionenantagonismus für *P. tremula x tremuloides* demonstriert werden. Dies stimmt mit Beobachtungen an krautigen Pflanzen überein, die eine erhöhte Natriumaufnahme unter Kaliummangelbedingungen zeigten (PISSAREK 1973; PEUKE *et al.* 2002). Da bekannt ist, dass Natrium Kalium in seiner osmoregulatorischen Funktion teilweise ersetzen kann (LEIGH und Wyn JONES 1984; MARSCHNER 1995; MÄSER *et al.* 2002), ist die beobachtete Akkumulation von Natrium als ein Kompensationsmechanismus für die reduzierte Kaliumversorgung der Pflanze erklärbar. So wird Natrium unter Kaliummangelbedingungen zur Aufrechterhaltung des Zellurgors anstelle von Kalium in der Vacuole akkumuliert und dient zusätzlich als Ladungsausgleich für organische Säuren und Anionen. Im Cytoplasma kann jedoch Kalium, das dort an vielen metabolischen Funktionen beteiligt ist, wie z. B. der Proteinsynthese, nicht durch Natrium ersetzt werden (WALKER *et al.* 1996; POTTOSIN *et al.* 2003). Das verstärkt durch die Kaliummangelpflanzen aufgenommene Natrium kann somit Kalium sicherlich nur in beschränktem Maße in seinen vielfältigen Funktionen ersetzen, so dass Pflanzen mit reduzierter Kaliumversorgung trotz verstärkter Natriumaufnahme deutliche Kaliummangelsymptome ausbildeten.

Mit Hilfe eines weiteren Wachstumsversuchs wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Kaliumgehalte der Holzbildungszone von Pflanzen unter Kaliummangelbedingungen durch zusätzlichen Natriumausschluss stärker reduziert werden, als im Vergleich zu Pflanzen, die unter Kaliummangelbedingungen mit normaler Natriumversorgung angezogen wurden. Diese Beobachtung als auch die gesteigerte Natriumaufnahme bei Kaliummangel deuten auf die Existenz hochaffiner Kaliumtransporter hin, die unter Kaliummangelbedingungen aktiviert werden und Kalium in Form eines Na^+ / K^+ Symports in die Zelle transportieren. An *Arabidopsis thaliana* wurde für den hochaffinen Kaliumtransporter HKT1 (High affinity K^+ transporter) bereits ein solcher, durch Kaliummangel aktivierter Na^+ / K^+ Symport gezeigt (RUBIO *et al.* 1995; Rigas *et al.* 2001;

Mäser *et al.* 2002). Auch an Pappel konnte kürzlich ein hochaffiner Kaliumtransporter (PtKup1) kloniert werden (LANGER *et al.* 2002). Ob PtKup1 Kalium wie HKT1 in Form eines Na^+ / K^+ Symportes in die Zelle transportiert, muss durch weitergehende funktionelle Charakterisierungen dieses Transporters überprüft werden. Die Ergebnisse des in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsversuchs geben jedoch deutliche Hinweise darauf, dass auch bei Bäumen unter Kaliummangel hochaffine Transportproteine aktiviert werden, die Kalium in Form eines Na^+ / K^+ Symportes aktiv entgegen hohe Konzentrationsgradienten in die Zelle transportieren und hierdurch die Kaliumversorgung des Baumes sicherstellen.

4.2 Einfluss der Kaliumernährung auf die Holzanatomie und Holzchemie

Licht-, elektronenmikroskopische und holzchemische Untersuchungen ermöglichten eine Gegenüberstellung der durch die Mineralernährung bedingten Änderungen anatomischer und holzchemischer Merkmale des Cambiums und des neugebildeten Holzgewebes. Hierbei zeigte sich, dass die meisten Parameter, die zur Charakterisierung des Holzwachstums untersucht wurden, besonders stark bei Pflanzen der Kaliummangelvariante (Kaliumversorgung: $50 \mu\text{M K}^+$) beeinflusst wurden. Häufig war beim Vergleich der untersuchten Parameter zwischen den drei Versuchsvarianten eine zunehmende oder abnehmende Tendenz des Einflusses der Kaliumernährung zu erkennen. So ergab sich mit zunehmender Kaliumernährung ein Anstieg des radialen Holzzuwachses, der Anzahl cambialer Zellen, der Anzahl expandierender Xylemzellen sowie der Häufigkeit von Gefäßen im neugebildeten Holzgewebe. Dagegen nahm die Gefäßquerschnittsfläche mit zunehmender Kaliumernährung ab. Die Faserlänge zeigte beim Vergleich der drei Versuchsvarianten nur bei Pflanzen der Kaliummangelvariante eine Beeinflussung durch die Kaliumernährung. Bei diesen Versuchspflanzen konnte eine deutliche Zunahme der Faserlänge beobachtet werden. Die Parameter Gefäßdichte sowie Faserquerschnittsfläche zeigten keine deutlichen Unterschiede beim Vergleich der drei Versuchsvarianten. Es wurde nur eine leichte Zunahme der Gefäßdichte mit zunehmender Kaliumversorgung beobachtet, wogegen kein Einfluss der Kaliumernährung auf die Faserquerschnittsfläche festgestellt werden konnte.

Die beobachtete deutliche Reduktion des radialen Xylemzuwachses der Kaliummangelvariante stimmt mit Untersuchungen an krautigen Pflanzen überein (PISSAREK 1973;

PEUKE *et al.* 2002) und steht in engem Zusammenhang mit der beobachteten Reduktion der Anzahl cambialer Zellen, die als ein Weiser der Holzbildungsaktivität gesehen werden kann (LARSON 1994; UGGLA *et al.* 1998; PUECH *et al.* 2000). So verursachte die stark verringerte Kaliumversorgung vermutlich eine Reduktion der Teilungsaktivität der Cambiumzellen, welche einen geringeren radialen Xylemzuwachs nach sich zieht. Durch eine reduzierte Zellteilungsaktivität des Cambiums und eine dadurch verminderte Neubildung cambialer Zellerivate ließe sich desweiteren die geringe Anzahl expandierender Xylemzellen erklären, die bei den Pflanzen der Kaliummangelvariante in der Zone der Zellstreckung beobachtet wurden.

Ebenso lässt sich die Zunahme der Faserlänge bei Pflanzen der Kaliummangelvariante in einen Zusammenhang mit der reduzierten Holzbildungsaktivität setzen. So stimmt die beobachtete Zunahme der Faserlänge bei Pflanzen der Kaliummangelvariante, bei gleichzeitiger Abnahme des Xylemzuwachses, mit Untersuchungen an *Picea abies* überein, die ebenfalls eine inverse Beziehung zwischen der Wachstumsrate und der Faserlänge beschreiben (HERMAN *et al.* 1998; MÄKINEN *et al.* 2002). Weiterhin zeigen Untersuchungen der Faserlänge von BISSET und DADSWELL (1950) und LIESE und AMMER (1957) an verschiedenen Arten der Gattung *Populus* sowie von MÄKINEN *et al.* (2002) an *Picea abies* einen saisonal bedingten Anstieg der Faserlänge vom Frühholz zum Spätholz. Diese Beobachtung korreliert ebenfalls mit der Abnahme der Holzbildungsaktivität während der Spätholzbildung. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, wird die Holzbildungsaktivität stark durch die Kaliumernährung beeinflusst. Somit ließe sich die beobachtete Zunahme der Faserlänge bei Pflanzen der Kaliummangelvariante durch ihre verminderte Holzbildungsaktivität erklären.

Ein sehr ähnlicher Zusammenhang könnte sich auch für die festgestellte Abhängigkeit der Gefäßquerschnittsfläche von der Kaliumernährung ergeben. So beschreiben holz-anatomische Untersuchungen von MEYER-UHLENRIED (1957) an *Populus robusta* eine Zunahme der Gefäßquerschnittsfläche bei verringerter Holzbildungsaktivität. Eine verringerte Holzbildungsaktivität, wie sie bei abnehmender Kaliumversorgung zu beobachten war, würde somit die Zunahme der Gefäßquerschnittsfläche bei abnehmender Kaliumversorgung der Versuchspflanzen erklären.

Im Gegensatz zur Gefäßquerschnittsfläche stieg die Gefäßhäufigkeit mit zunehmender Kaliumernährung deutlich an. Zudem war bei verstärkter Kaliumernährung eine sehr auffällige clusterartige Ansammlung kleiner Gefäße im neugebildeten Holzgewebe be-

obachtbar. Die Kaliumernährung nahm somit Einfluss auf die Entwicklung cambialer Zellen zu Gefäß- oder Faserzellen. Sowohl die mit zunehmender Kaliumernährung ansteigende Zahl von Gefäßen als auch die unterschiedlichen Kaliumgehalte in den sich aus dem Cambium differenzierenden Gefäß- und Faserzellen weisen darauf hin, dass der Kaliumgehalt eine maßgebliche Größe ist, welche die Form- und Größenentwicklung cambialer Zellen zu Gefäß- oder Faserzellen beeinflusst. So entwickeln sich möglicherweise cambiale Zellderivate bei höheren Kaliumgehalten verstärkt zu Gefäßen, während cambiale Zellen mit geringeren Kaliumgehalten sich zu Fasern entwickeln. Diese Vermutung wird indirekt durch die Tatsache unterstützt, dass Gefäße aufgrund ihrer anatomischen Lage einen sehr intensiven Kontakt zum Strahlparenchym besitzen (Braun 1967) und somit im Vergleich zu Faserzellen bevorzugt von der Kaliumversorgung über das Strahlparenchym profitieren. Auch die Beobachtung, dass bei verstärkter Kaliumversorgung clusterartige Ansammlungen von Gefäßen zumeist in unmittelbarer Nähe zum Strahlparenchym zu finden waren, deutet auf einen Zusammenhang zwischen Kaliumgehalt und Gefäßbildung.

Weitere Hinweise finden sich in Untersuchungen zur Wirkung von Auxin auf die Holzbildung, welche in Pappeln mit erhöhten Auxingehalten ebenfalls eine Reduktion des Gefäßquerschnitts, eine Zunahme der Gefäßhäufigkeit sowie eine Clusterung der Gefäße zeigten (TUOMINEN *et al.* 1997; JUNGHANS *et al.* 2003). Da Auxin über die Aktivierung der PM H^+ -ATPase (HAGER *et al.* 1991; AREND *et al.* 2002) und einwärtsgerichteter Kaliumkanäle (PHILIPPAR *et al.* 1999; TODE and LÜTHEN 2001) den zellulären Kaliumhaushalt erhöht, ist zu vermuten, dass Pflanzen mit erhöhten Auxingehalten auch erhöhte Kaliumgehalte in den Zellen des sich differenzierenden Holzgewebes haben. Das beschriebene Gefäßmuster scheint somit ein typisches Bild des Holzgewebes bei hoher Kaliumverfügbarkeit zu sein.

Im Gegensatz zu den eingangs beschriebenen anatomischen Parametern zeigte die Gefäßdichte (Gefäßfläche / Xylemfläche) nur eine geringe Beeinflussung durch die Kaliumernährung. Sie stieg mit zunehmender Kaliumversorgung nur geringfügig an. Diese Beobachtung ist im Einklang mit holzanatomischen Untersuchungen von KOLTZENBURG (1966) an ökologisch unterschiedlich begünstigten Bäumen, die keine Beeinflussung der Gefäßdichte trotz unterschiedlicher Licht-, Temperatur-, oder Nährstoffversorgung zeigten. Der Parameter Gefäßdichte scheint somit durch externe Faktoren wenig beeinflussbar zu sein. Ebenfalls konnte kein Einfluss der Kaliumernährung

auf die Faserquerschnittsfläche festgestellt werden. Bei allen drei Versuchsvarianten der vorliegenden Arbeit war die Faserquerschnittsfläche relativ einheitlich.

Im Gegensatz zum dargestellten Einfluss limitierender Kaliumernährung auf die Holz-anatomie zeigten Hybridpappeln (*P. tremula x tremuloides*) unter limitierenden Stickstoffbedingungen eine Reduktion der Faser- und Gefäßquerschnittsfläche, eine Zunahme der Häufigkeit von Gefäßen und keine Beeinflussung der Länge der Faserzellen (PUECH *et al.* 2000). Unter limitierenden Kaliumbedingungen wurde in dieser Arbeit dagegen keine Beeinflussung der Faserquerschnittsfläche, eine Zunahme der Gefäßquerschnittsfläche, eine Abnahme der Gefäßhäufigkeit sowie eine Zunahme der Faserlänge beobachtet. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die beobachteten anatomischen Veränderungen der Kaliummangelvariante generelle Effekte einer Nährstoffmangelversorgung sind.

Untersuchungen der zellulären Feinstruktur zeigten keine eindeutige Beeinflussung der Versuchspflanzen durch die Kaliumernährung. Bei einigen cambialen Zellen der Kaliummangelvariante war jedoch eine reduzierte Ausdehnung der Vakuole, einhergehend mit einer Anreicherung von Cytoplasma im Zelllumen zu beobachten. Dies ließe sich durch eine Herabsetzung des osmotischen Potentials der Vakuole cambialer Zellen, aufgrund reduzierter Kaliumgehalte erklären. Da jedoch auch bei der Kaliummangelvariante Cambiumzellen mit sehr starker Vacuolisierung zu beobachten waren, kann diese Beobachtung nicht eindeutig auf den Einfluss des Kaliummangels zurückgeführt werden. So ist die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Beeinflussung der Holzbildung durch unterschiedliche Kaliumernährung überwiegend auf Veränderungen physiologischer oder molekularer Funktionen und weniger auf Veränderungen der zellulären Feinstruktur zurückzuführen.

Da gezeigt werden konnte, dass die Kaliumernährung einen Einfluss auf die Holz-anatomie ausübt, wurde in weiteren Versuchen überprüft, ob auch eine Beeinflussung der chemischen Zusammensetzung des im Versuchszeitraum gebildeten Holzgewebes vorliegt. Histochemische Untersuchungen des Lignifizierungsgrades im Fluoreszenzmikroskop (v. AUFSEß 1973) gaben einen ersten Hinweis auf eine Beeinflussung der Holzchemie durch die Kaliumernährung, da sie eine verstärkte Lignifizierung des Holzgewebes in Pflanzen der Kaliummangelvariante anzeigten. Diese Beobachtung konnte durch die quantitative Ligninbestimmung bestätigt werden. So zeigte sich, dass eine ab-

nehmende Kaliumversorgung der Pflanzen eine zunehmende Lignifizierung des Holzgewebes verursachte.

Ein möglicher Zusammenhang ergibt sich hier zu der festgestellten Akkumulation von Kupfer unter Kaliummangelbedingungen, da Kupfer ein wichtiger Cofaktor von Enzymen der Lignin-Biosynthese ist (MARSCHNER 1995). An krautigen Pflanzen konnte bereits gezeigt werden, dass bei reduziertem Kupferangebot eine reduzierte Lignifizierung von Xylemzellen erfolgt (PISSAREK 1974; RAHIMI und BUSSLER 1974; BUSSLER 1981). Daneben könnte die erhöhte Aufnahme von Kupfer auch in Zusammenhang mit der beobachteten erhöhten Anzahl von Mitochondrien in cambialen Zellen der Kaliummangelvariante (Abb 3.13) stehen, da das kupferhaltige Enzym Cytochrom-Oxidase wichtige Oxidationsabläufe in den Mitochondrien katalysiert (MARSCHNER 1995). Die beobachtete Kupferakkumulation könnte durch spezifische Ionenkanäle vermittelt werden KOCHIAN (2000), welche eventuell durch Kaliummangel aktiviert werden.

Weitere Unterschiede in der chemischen Holzzusammensetzung ergaben sich für den Cellulosegehalt des im Versuchszeitraum gebildeten Holzgewebes. So war der Cellulosegehalt der Kaliummangelvariante im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsvarianten deutlich reduziert. Dies könnte neben der festgestellten Reduktion des Xylemzuwachses eine weitere mögliche Ursache für die geringere Stabilität der Sprossachse der Kaliummangelpflanzen sein, da die Zugfestigkeit der Sprossachse maßgeblich durch ihren Cellulosegehalt bestimmt wird (RYDEN *et al.* 2003).

4.3 Zusammenhang zwischen Kaliumgehalt, osmotischem Potential und cambialer Aktivität in der Holzbildungszone

Es konnte ein enger Zusammenhang zwischen Kaliumgehalt, relativem osmotischem Potential und cambialer Aktivität im Bereich der Holzbildungszone nachgewiesen werden. Diese Parameter zeigten einen auffällig übereinstimmenden saisonalen Verlauf und wurden auch sehr ähnlich durch unterschiedliche Kaliumernährung beeinflusst. Diese Übereinstimmungen verdeutlichen, dass Kalium sowohl das osmotische Potential der Holzbildungszone maßgeblich bestimmt (siehe auch DÜNISCH and BAUCH 1994 b), als auch die cambiale Aktivität wesentlich beeinflusst. Desweiteren belegen diese Ergebnisse die starke Einbindung von Kalium in die Prozesse der Holzbildung, insbesondere in den Prozess der Zellexpansion, der einer ausgeprägten Osmoregulation unterliegt

(HSIAO und LÄUCHLI 1986; MARSCHNER 1995). Die vorliegenden Ergebnisse untermauern somit Untersuchungen von DÜNISCH *et al.* (1998) und AREND *et al.* (2002), die die Bedeutung von Kalium als treibende Kraft einer osmotisch regulierten Zellexpansion hervorheben. Sicherlich erfordert die zunehmende Zahl expandierender Xylemzellen, wie sie bei zunehmender Kaliumversorgung beobachtet wurde, auch eine erhöhtes osmotisches Gewebepotential der Zellexpansionszone. Somit könnte die weite radiale Ausdehnung der Zellexpansionszone bei verstärkter Kaliumversorgung neben der erhöhten Zellteilungsaktivität auch auf das erhöhte osmotische Potential in diesem Gewebereich zurückzuführen sein.

Neben Kalium gibt es jedoch noch weitere anorganische Osmotika, wie Cl^- , Mg^{++} , Ca^{++} oder organische Osmotika wie Zucker, Malat oder Polyamine. Durch elementanalytische Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass Cl und Mg aufgrund ihrer sehr geringen Konzentration im Bereich der Holzbildungszone keine wichtige Rolle bei den osmotisch regulierten Prozessen der Holzbildung spielen. Mit Hilfe quantitativer Messungen wurde der Einfluss der Kaliumernährung auf die Konzentrationen an Saccharose, Glucose, Fructose und Malat in der Holzbildungszone untersucht. Im Gegensatz zu Beobachtungen an krautigen Pflanzen (GUARDIA und BENLLOCH 1980) wurde in der vorliegenden Arbeit bei den Versuchspflanzen mit reduzierter Kaliumversorgung kein Anstieg der Zucker-Gehalte gemessen. Vielmehr war die Konzentration an Saccharose der Kaliummangelvariante im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsvarianten deutlich reduziert, während die Gehalte an Fructose und Glucose durch die Kaliumernährung nicht wesentlich beeinflusst wurden. Vergleichbar mit dem Saccharosegehalt war auch der Gehalt an Malat in der Holzbildungszone der Kaliummangelvariante deutlich reduziert. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass die untersuchten organischen Osmotika bei der Kaliummangelvariante dieses in seiner Funktion als Osmotikum ersetzen.

4.4 Die Kaliumkanäle PTK2 und PTORK und ihre physiologische Bedeutung für die Holzbildung

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Kaliumgehalt des Holzgewebes streng mit der Holzbildungsaktivität korreliert und die Kaliumgehalte im Bereich der Holzbildungszone sich zellspezifisch unterscheiden. Demzufolge müssen Bäume über regulierende Mechanismen verfügen, über die sie die Kaliumaufnahme und -verteilung kontrollieren können. Eine wesentliche Funktion bei der kontrollierten zellulären Kaliumaufnahme und -abgabe übernehmen Kaliumtransportproteine (Kanäle und Transporter) (HEDRICH und ROELFSMA 1999; MÄSER *et al.* 2002; VÉRY und SENTENAC 2002). Da über die Mechanismen des zellulären Kaliumtransports in Bäumen noch wenig bekannt war, wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen an Kaliumkanälen durchgeführt. Hierzu wurde auf Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe Hedrich¹, welche die molekularen Grundlagen von Kaliumtransportproteinen analysierte, aufgebaut. Zur Aufklärung der molekularen Grundlagen des zellulären Kaliumtransportes an *Populus* wurde von der Arbeitsgruppe Hedrich zunächst eine EST-Datenbank (Expressed Sequence Tags) des cambialen Gewebes von *P. tremula x tremuloides* (STERKY *et al.* 1998) nach homologen Sequenzen zu aus *Arabidopsis thaliana* bekannten Kaliumkanälen durchsucht. Auf diese Weise gelang es drei Kaliumkanäle (PTK2, PTORK, KPT1) und einen Kaliumtransporter (PtKUP1) zu identifizieren. An Hand der Aminosäuresequenz ließen sich die Kaliumkanäle der *Shaker*-Familie zuordnen, wobei PTK2 (*Populus tremula* $\underline{\text{K}}^+$ channel 2) der AKT2/3-Unterfamilie, KPT1 ($\underline{\text{K}}^+$ channel *Populus tremula* 1) der KAT1-Unterfamilie und PTORK (*Populus tremula* outward rectifying $\underline{\text{K}}^+$ channel) der SKOR-Unterfamilie zugeordnet werden konnte. Der Kaliumtransporter PtKUP1 (*Populus tremula* $\underline{\text{K}}^+$ uptake transporter 1) reihte sich in die Familie der KUP/HAK/KT-Transporter ein (Abb. 1.5; LANGER *et al.* 2002; Dissertation LANGER 2003). Durch Realtime-Quantitative-PCR und Northern-Blot-Analysen wurden die Transkriptgehalte von PTORK, PTK2, KPT1 und PtKUP1 in verschiedenen Geweben von *Populus* bestimmt². Dabei konnte eine Expression von PTK2 und PTORK im Blattstiel, im Phloem sowie im Bereich Cambium / Xylem des Stammes gezeigt werden. Im Phloem und im Blattstiel überwog die PTK2 Expression, wogegen im Xylem

¹ Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Julius-von-Sachs-Institut, Universität Würzburg, Julius-von-Sachs-Platz 2, 97082 Würzburg

² Untersuchungen von Katharina Langer im Rahmen ihrer Promotionsarbeit, Julius-von-Sachs-Institut, Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg, Julius-von-Sachs-Platz 2, 97082 Würzburg

PTK2 und PTORK gleichhoch exprimiert waren. Im Gegensatz zu den beiden Kaliumkanälen PTK2 und PTORK waren KPT1 sowie der Kaliumtransporter PtKUP1 in allen untersuchten Geweben in nahezu gleichbleibend geringen Mengen vertreten. Weiterhin konnte mittels Realtime-Quantitativer-PCR eine Korrelation zwischen der Transkriptmenge von PTK2 und PTORK und dem saisonalen Verlauf der Holzbildungsaktivität gezeigt werden (Abb. 4.1 b; LANGER *et al.* 2002; Dissertation LANGER 2003). Aus diesen Gründen wurden für die Untersuchungen des zellulären Kaliumtransports und der kaliumabhängigen Holzbildung in der vorliegenden Arbeit die Kaliumkanäle PTK2 und PTORK ausgewählt.

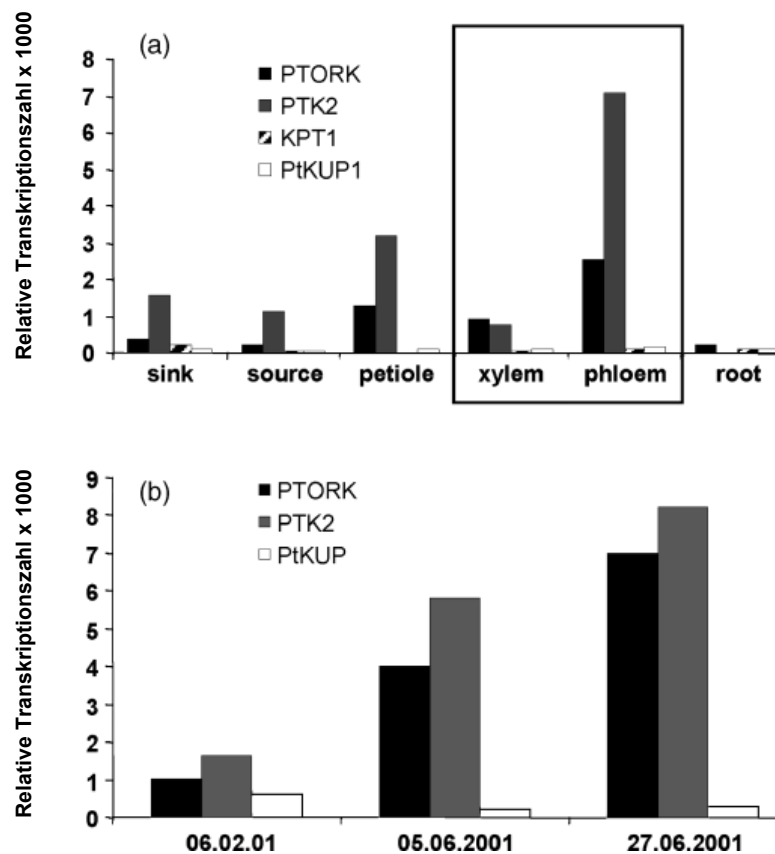


Abb. 4.1: Expressionsanalyse von Kaliumtransportproteinen mittels Realtime-Quantitativer-PCR (aus LANGER *et al.* 2002).

A) Transkriptgehalte von PTORK, PTK2, KPT1 und PtKUP1 in unterschiedlichen Geweben von *P. tremula x tremuloides*.

B) Saisonale Veränderungen der Transkriptgehalte von PTORK, PTK2 und PtKUP im Stammgewebe von *P. tremula x tremuloides*.

Die Kaliumkanäle PTK2 und PTORK wurden mittels Patch-Clamp-Messungen elektrophysiologisch charakterisiert. An PTK2-exprimierenden Oozyten wurde gezeigt, dass dieser Kanal als schwach spannungsabhängiger Kaliumkanal sowohl einwärts- als auch auswärtsgerichtete Ströme vermittelt¹. Untersuchungen an Protoplasten einer Pappel-Suspensionskultur² deuteten jedoch darauf hin, dass PTK2 im pflanzlichen Gewebe nur einwärtsgerichtete Ströme vermittelt (LANGER *et al.* 2002). Elektrophysiologische Messungen an PTORK-exprimierenden Oocyten³ und an Pappel-Protoplasten⁴ zeigten spannungsabhängige Kalium-Auswärtsströme. PTORK fungiert somit im pflanzlichen Gewebe als auswärtsgerichteter Kaliumkanal.

Um die Mechanismen des zellulären Kaliumhaushalts der Holzbildungszone näher zu beleuchten, wurde in der vorliegenden Arbeit das Auftreten der Kaliumkanäle PTK2 und PTORK im Stammgewebe von *P. tremula x tremuloides* untersucht. Aufgrund der sehr geringen Konzentration von Kaliumkanälen in der pflanzlichen Zellmembran (SUSSMAN und HARPER 1989; GAYMARD *et al.* 1996; URBACH *et al.* 2000) war der immunohistochemische Nachweis der Kanalproteine PTK2 und PTORK erheblich erschwert. So war bislang der immunochemische Nachweis pflanzlicher Kaliumkanalproteine auf c-RNA-exprimierende Insektenzellen oder *Xenopus laevis*-Oozyten beschränkt (GAYMARD *et al.* 1996; URBACH *et al.* 2000). Die Spezifität der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper wurde ebenfalls mittels Westernblot an PTK2 bzw. PTORK c-RNA exprimierenden Oozyten gezeigt. In Übereinstimmung mit Versuchen von URBACH *et al.* (2000) gelang auch in der vorliegenden Arbeit der immunochemische Nachweis von Kaliumkanalproteinen durch Westernblotanalyse am pflanzlichen Gewebe nicht. Erstmals konnte jedoch mittels Immunolokalisierung ein *in situ* Nachweis für pflanzliche Kaliumkanäle auf Proteinebene erbracht werden. Dabei gelang der immunohistochemische Nachweis von PTK2 und PTORK im Fluoreszenzmikroskop. PTK2 konnte auch auf zellulärer Ebene im Transmissionselektronenmikroskop lokalisiert werden. Weiterhin konnte eine zellspezifische Lokalisierung der Kaliumkanäle PTK2 und PTORK in unterschiedlichen Gewebebereichen gezeigt werden. Dabei

^{1,3} Untersuchungen von Dietmar Geiger im Rahmen seiner Promotionsarbeit, Julius-von-Sachs-Institut, Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg, Julius-von-Sachs-Platz 2, 97082 Würzburg.

^{2,4} Untersuchungen von Andrea Stinzinger im Rahmen ihrer Promotionsarbeit, Julius-von-Sachs-Institut, Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg, Julius-von-Sachs-Platz 2, 97082 Würzburg.

ergab sich eine saisonale Abhängigkeit im Auftreten beider Kanalproteine. So konnten Markierungen nur am aktiven, holzbildenden Stammgewebe beobachtet werden. Die Saisonalität der Expression dieser beiden Kaliumkanäle wurde ebenfalls durch Bestimmung ihrer Transkriptgehalte mittels quantitativer Realtime PCR gezeigt (LANGER *et al.* 2002; Dissertation LANGER 2003).

PTK2 konnte vor allem im Bereich des inneren Phloems, in parenchymatischen Zellen lokalisiert werden. Desweiteren fand sich PTK2 in Zellen des Strahlparenchyms innerhalb von Phloem und Xylem. Im Xylem wurden Markierungen ebenso häufig an Kontaktzellen¹, wie an Strahlzellen ohne Kontakt zu Gefäßen beobachtet. Durch zusätzliche Feinlokalisierungen im Transmissionselektronenmikroskop konnte PTK2 eindeutig der Plasmamembran zugeordnet werden.

Sowohl die Lokalisierung von PTK2 als auch seine bekannte Funktion als Einwärtsgleichrichter deuten auf eine wichtige Rolle von PTK2 bei der Kaliumbeladung des Strahlparenchyms und des Phloemparenchyms hin. Die Funktion des Holzstrahlparenchyms als Versorgungssystem für das Cambium ist bekannt (SAUTER und KLOTH 1986; KUHN *et al.* 1997; DÜNISCH *et al.* 1998; SAUTER 2000). Durch die Aufnahme von Kalium aus dem Apoplasten in die Zellen des Strahlparenchyms ermöglicht PTK2 den radial verlaufenden symplastischen Kaliumtransport vom Phloem und Xylem zu den meristematischen Cambiumzellen. Somit ergibt sich eine wichtige Rolle für PTK2 als Kalium-Aufnahmesystem des Strahlparenchyms, was den weiteren symplastischen Kaliumtransport zum Cambium ermöglicht. Durch die Beladung der Holzstrahlen mit Kalium ist PTK2 zudem indirekt an der Speicherung von Kalium während der Ruhephase beteiligt, da das Strahlparenchym jahreszeitabhängig dem radialen Transport oder der Speicherung von Zucker, Aminosäuren und Mineralien dient (VAN BEL 1990). Weitere Funktionen könnten im Bereich der Assimilatentladung des Siebröhren/Geleitzellen-Komplexes im Phloem liegen, wie es für den zu PTK2 homologen Kanal VFK1 an *Vicia faba* gezeigt wurde (ACHE *et al.* 2001). Somit würde PTK2 indirekt die Assimilatversorgung des Cambiums, das ein *sink*-Gewebe für Assimilate ist (KRABEL *et al.* 2000), unterstützen. Da PTK2 jedoch nicht mit Sicherheit im Siebröhren/Geleitzellenkomplex nachgewiesen werden konnte, gelang es nicht seine Einbindung in die Assimilatentladung durch Ergebnisse der Immunolokalisierung zu belegen.

¹ Gefäßkontaktierende Zellen des Holzstrahlparenchyms (BRAUN 1967)

Im Gegensatz zu PTK2 wurde der auswärtsgleichrichtende Kaliumkanal PTORK in Siebröhren, in jungen Xylemfasern und in Zellen des Holzstrahlparenchyms mit Kontakt zu Gefäßen lokalisiert (Kontaktzellen). In Kontaktzellen war eine polare Ausrichtung der Markierung zu den angrenzenden Gefäßen zu beobachten. Gefäße und cambiale Zellen waren nicht markiert. Markierungen zeigten sich zumeist in punktartiger Form entlang der Plasmamembran. Dies deutet auf eine Clusterung dieses Kanalproteins in der Plasmamembran hin, wie es für die in Insektenzellen exprimierten, pflanzlichen Kaliumkanäle AKT1 und KAT1 bereits gezeigt wurde (URBACH *et al.* 2000).

Im Vergleich mit den durchgeführten Elementanalysen ergab sich eine auffällige Übereinstimmung der beobachteten Lokalisation von PTORK in sich differenzierenden Fasern mit den in diesen Zellen verringerten Kaliumgehalten. Sowohl das Auftreten von PTORK als auch die relativ geringen Kaliumgehalte verweisen auf einen Kaliumausstrom während der Differenzierung junger Faserzellen. PTORK als auswärtsgleichrichtender Kaliumkanal könnte somit über eine Reduktion des Kaliumgehaltes den Abschluss der Zellexpansion sich ausdifferenzierender Fasern vermitteln und hierdurch zu ihrer typischen Größen- und Formentwicklung beitragen. Im Gegensatz zu den großlumigen Gefäßen, deren Protoplast sehr rasch nach dem Abschluss der Zellexpansion aufgelöst wird, bleibt der Protoplast der Fasern auch nach dem Abschluss der Zellexpansion lange erhalten um den Aufbau sekundärer Zellwandschichten zu ermöglichen (AREND und FROMM 2003). Das in dieser Entwicklungsphase aus dem Faserprotoplasten in den Zellwandraum freigesetzte Kalium könnte somit wieder von Geweben mit hohem Kaliumbedarf aufgenommen werden. Solch ein „Recyclingsystem“ wurde durch Fluxmessungen für das Stammgewebe von *Ricinus communis* bereits beschrieben (PEUKE *et al.* 2002). Das im Apoplast des Xylems diffundierende Kalium könnte beispielsweise über PTK2 in das Holzstrahlparenchym geladen und hierdurch dem Cambium wieder zur Verfügung gestellt werden.

Im Leitgewebe des Phloems wird Kalium während der Vegetationsperiode gemeinsam mit Assimilaten von den *source*-Geweben (Blättern) zu den *sink* Geweben wie dem Cambium transportiert. Die Lokalisation von PTORK in den Siebröhren innerhalb des Phloems zeigt eine Entladung von Kalium in den Apoplasten des umgebenden Gewebes an. Dort könnte es durch passive Diffusion dem unmittelbar benachbarten Cambium zur Verfügung gestellt oder unter Beteiligung von PTK2 in das Strahlparenchym des Phloems geladen werden und über einen symplastischen Transport innerhalb des

Strahlparenchyms wiederum dem Cambium zugeführt werden. Desweiteren scheint PTORK aufgrund seiner Lokalisation in den Siebröhren die Assimilatentladung des Phloems zu fördern. So zeigten bereits ACHE *et al.* (2001) eine funktionelle Einbindung von Kalium und Kaliumkanälen in die Assimilatentladung des Phloems. PTORK könnte somit sowohl an der Kalium- als auch der Assimilatversorgung des benachbarten Cambiums beteiligt sein.

Die Lokalisation von PTORK in Kontaktzellen des Strahlparenchyms, sowie die polare Ausrichtung dieses Kanals zur Gefäßseite weist in diesen Zellen auf die Existenz eines Exportsystems für Kalium hin. Vergleichbar mit dem homologen Kaliumkanal SKOR, der im Xylemparenchym des Wurzelgewebes von *Arabidopsis thaliana* die Kaliumbeladung des Xylems vermittelt (GAYMARD *et al.* 1998), scheint PTORK im Stammgewebe von *Populus* ähnliche Funktionen zu übernehmen. Diese Beobachtung ist auf den ersten Blick unerwartet, da sie im Widerspruch zur bekannten Funktion der Kontaktzellen als Aufnahmesystem für Mineralstoffe steht (BRAUN 1967; DEBOER *et al.* 1985). Eine mögliche Funktion von PTORK in diesen Zellen könnte sich jedoch aus der sehr hohen Mobilität von Kalium innerhalb des Pflanzenkörpers erklären (MARSCHNER 1995, PEUKE *et al.* 2002). So würde ein durch PTORK getriebener Kaliumexport aus dem Symplasten des Strahlparenchyms in das apoplastische Langstreckentransportsystem des Xylems eine zügige Umverteilung von Kalium ermöglichen. Im Bedarfsfall wäre somit eine schnelle Mobilisierung von Kaliumreserven innerhalb der Pflanze sichergestellt.

Möglicherweise ergibt sich zudem ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation von PTORK in Kontaktzellen und der Aufnahme von organischen Metaboliten aus dem Xylemwasserstrom. So beschreibt VAN BEL (1990) für das Holzstrahlparenchym einen H^+ / K^+ Antiport in Verbindung mit der Substrataufnahme aus Gefäßen. Demnach wird Kalium in den Xylemstrom entlassen, während Aminosäuren gemeinsam mit Protonen in das Strahlparenchym aufgenommen werden. In Übereinstimmung hiermit beschreibt HIMPKAMP (1988) einen pH als auch kaliumabhängigen $H^+ /$ Glucose-Cotransport, der in *Populus balsamifera* die Aufnahme von Zuckern aus dem Xylem in das Holzstrahlparenchym vermittelt. Die Vermutung, dass PTORK in ein derartiges Aufnahmesystem von organischen Metaboliten eingebunden ist, wird auch durch die von HIMPKAMP (1988) gezeigte saisonale Variation der Aktivität dieses Aufnahmesystems gestärkt. So

konnte ein derartiges Transportsystem in Übereinstimmung mit dem saisonalen Auftreten von PTORK nur im aktiven Stammgewebe nachgewiesen werden.

Eine zusätzliche Funktion erhält ein durch PTORK vermittelter Kaliumausstrom durch eine Erhöhung der Mobilität anderer Kationen im Xylemwasserstrom, welche im Austausch durch Kalium von Bindestellen der Gefäßwand gelöst werden können. Hierdurch wird die Aufnahme dieser Ionen aus den Gefäßen in das Strahlparenchym gefördert (VAN BEL 1990).

4.5 Effekt von Abscisinsäure (ABA) auf die Holzbildung und den Kaliumhaushalt der Holzbildungszone

Abscisinsäure (ABA) ist ein pflanzliches Hormon, das in Gehölzen wesentlich an der Regulation der Holzbildung beteiligt ist (LACHAUD 1989). So wird neben der Funktion als Stressmediator auch eine Beteiligung von ABA an der saisonalen Regulation des Holzwachstums postuliert (LACHAUD 1989). Untersuchungen an krautigen Pflanzen wie Weizen (HAEDER und BEHRINGER 1981) oder Ricinus (PEUKE *et al.* 2002) haben zudem gezeigt, dass Pflanzen unter Kaliummangel vermehrt ABA produzieren. So wurde bei Ricinus-Pflanzen unter Kaliummangel ein Anstieg der ABA-Produktion im Wurzelgewebe festgestellt (PEUKE *et al.* 2002). Desweiteren ist bekannt, dass Kaliumkanäle durch ABA reguliert werden können (ROBERTS und SNOWMAN 2000). An *Arabidopsis thaliana* konnte eine erhöhte Expression des zu PTORK homologen Kaliumkanals GORK nach Behandlung mit ABA nachgewiesen werden (DEEKEN *et al.* 2003). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt von ABA auf den Kaliumgehalt des Cambiums, die Anatomie der Holzbildungszone und das Auftreten von PTORK im Stammgewebe von *P. tremulus x tremuloides* untersucht.

Es ergab sich hierbei eine deutliche Reduktion der Kaliumgehalte im Cambium nach Behandlung mit ABA. Weiterhin zeigte sich nach Applikation von ABA der gleiche Effekt auf die Anatomie der Holzbildungszone, wie er bei Pappeln unter Kaliummangelernährung beobachtet wurde. So war die Zahl der radial aufeinanderfolgenden Cambiumzellen sowie die radiale Ausdehnung der Zelldifferenzierungszone deutlich reduziert, was ein früheres Einsetzen der Sekundärwandbildung bedingte. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen beschreiben auch LITTLE und SAVIDGE (1987) sowie FROMM (1997) eine hemmende Wirkung von ABA auf die cambiale Aktivität von Bäumen.

Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass ABA den Kaliumgehalt des Cambiums beeinflusst und da bekannt ist, dass Kaliummangel zu einer verstärkten Produktion von ABA führt (HAEDER und BEHRINGER 1981; PEUKE *et al.* 2002), kann auf eine funktionelle Einbindung dieses Hormons in die kaliumabhängigen Prozesse der Holzbildung geschlossen werden. Die vergleichbaren Effekte einer ABA-Behandlung und einer Kaliummangelernährung auf die Anatomie der Holzbildungszone unterstützen diese Vermutung.

Ein möglicher Angriffspunkt für die Wirkung von ABA auf den Kaliumhaushalt der Holzbildungszone könnte der auswärtsgerichtete Kaliumkanal PTORK sein. Da, wie bereits erwähnt, für den zu PTORK homologen Kanal GORK eine Erhöhung der Expressionsrate durch ABA-Behandlung gezeigt wurde (DEEKEN *et al.* 2003), sollte in dieser Arbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen PTORK und ABA überprüft werden. Bei PTORK-Lokalisierungen im Anschluss an eine ABA-Applikation ließen sich markierte Xylemfasern häufiger beobachten. Dies deutet auf eine Erhöhung der Expressionsrate von PTORK durch ABA hin und ist im Einklang mit den Ergebnissen von Deeken *et al.* (2003). Da die Methodik der Fluoreszenzmikroskopie jedoch nicht geeignet ist quantitative Aussagen zu treffen, müsste diese Vermutung durch quantifizierende Nachweisverfahren (PCR, Westernblot) bestätigt werden.

Eine Aktivierung von PTORK durch ABA im Stammgewebe von *Populus* würde einen verstärkten Kaliumexport aus den Xylemfasern verursachen. Kalium aus Xylemfasern könnte hierdurch verstärkt freigesetzt werden, was zu einer Erhöhung der Mobilität von Kalium innerhalb der Pflanze führen könnte. So zeigten PEUKE *et al.* (2002) an *Ricinus* unter Kaliummangelbedingungen neben einer erhöhten ABA-Produktion der Wurzeln auch eine verstärkte Remobilisierung von Kalium aus den alten Teilen des Stammes, verbunden mit einer erhöhten Flussrate von Kalium innerhalb der Pflanze. Dies deutet darauf hin, dass ABA die Aktivität eines Kaliumrecycling-Systems verstärkt, was möglicherweise bei Kaliummangel als Kompensationsmechanismus für die verringerte Kaliumverfügbarkeit genutzt wird.

4.6 Einfluss der Kaliumernährung auf die H⁺-ATPase der Plasmamembran

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass das Cambium ein starkes *sink* für Kalium bildet. Diese Eigenschaft cambialer Zellen wird unter anderem durch die Aktivität der PM H⁺-ATPase bedingt (LACHAUD *et al.* 1999). Dementsprechend zeigten Lokalisierungen der PM H⁺-ATPase in *Populus trichocarpa* ein auffälliges Auftreten dieses Enzyms in cambialen Zellen. Desweiteren ließ es sich in sich differenzierenden Xylemzellen und in Kontaktzellen des Holzstrahlparenchyms nachweisen (AREND *et al.* 2002).

Aufgrund der zentralen Stellung im zellulären Transportgeschehen ist die PM H⁺-ATPase ein wichtiger Regulator der Mineralstoffaufnahme. Hierdurch beeinflusst sie wesentlich die osmotisch regulierten Prozesse der Zellstreckung sich differenzierender Zellen (SMART *et al.* 1998). Desweiteren führt der durch die PM H⁺-ATPase verursachte H⁺-Ausstrom zu einer Ansäuerung des Apoplasten und erhöht hierdurch die Dehnbarkeit der Zellwand in sich differenzierenden Zellen (KUTSCHERA 2001). Die Aktivität der PM H⁺-ATPase variiert im Jahreslauf einhergehend mit der Aktivität des Cambiums und wird durch die Wirkung von Auxin stimuliert. So ist im aktiven Stammgewebe der Gehalt an PM H⁺-ATPase hoch, während er nach Abschluss der Vegetationsperiode stark reduziert wird (BABIN 1995; LACHAUD *et al.* 1999; AREND *et al.* 2002). Dabei konnte eine Aktivierung der PM H⁺-ATPase durch Auxin insbesondere im Bereich der Zellteilungs- und Zellstreckungszone gezeigt werden (AREND *et al.* 2002; ROBER-KLEBER *et al.* 2003). Das durch die PM H⁺ ATPase an der Plasmamembran erzeugte elektrochemische Potential ist die treibende Kraft für die Aufnahme von Mineralien und Assimilaten durch Kanal- und Transportproteine (MICHELET und BOUTRY 1995; HOTH *et al.* 1997; MAATHIUS *et al.* 1997). Hieraus ergibt sich ein möglicher Zusammenhang zwischen der PM H⁺-ATPase und der Kaliumernährung der Pflanze. So wurde eine Beeinflussung der PM H⁺-ATPase durch die Kaliumernährung von Pflanzen bereits vermutet, konnte jedoch noch nicht experimentell nachgewiesen werden (SAMUELS *et al.* 1992).

Da in der vorliegenden Arbeit Pflanzen mit reduzierter Kaliumversorgung deutliche Kaliummangelsymptome sowie eine Veränderung ihrer Holzbildung zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass der Kaliumgehalt dieser Pflanzen einen kritischen Wert erreicht hat, durch den auch die Kaliumaufnahme und -verteilung innerhalb der Pflanze beeinflusst wird. Desweiteren zeigte sich beim Vergleich der Versuchsvarianten, dass trotz einer sehr stark verringerten Kaliumernährung die Kaliumgehalte in der Holzbil-

dungszone der Versuchspflanzen vergleichsweise schwach reduziert wurden. So verursachte eine Reduktion der Kaliumernährung von 5 mM auf 50 μ M (Faktor 100) z. B. im Juni nur eine Reduktion des Kaliumgehalts der Holzbildungszone von 20 mg / g TM auf 6 mg / g TM (ca. Faktor 3). Demzufolge muss in der Pflanze unter limitierten Kaliumbedingungen ein sehr effizientes Kaliumversorgungssystem existieren. Um zu überprüfen, ob die PM H⁺-ATPase hierin funktionell eingebunden ist, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss verringerter Kaliumernährung auf das Auftreten der PM H⁺-ATPase im Stammgewebe der Versuchspflanzen untersucht. Durch Westernblotanalyse konnte bei Pflanzen der Kaliummangelvariante eine verstärkte Bildung von PM H⁺-ATPase im Stammgewebe nachgewiesen werden. Ebenso zeigten Immunolokalisierungen im Fluoreszenzmikroskop ein deutlich stärkeres Auftreten der PM H⁺-ATPase in Kontaktzellen des Holzstrahlparenchyms dieser Pflanzen. Das verstärkte Auftreten der PM H⁺-ATPase in den Kontaktzellen der Kaliummangelpflanzen verweist auf eine von der Kaliumverfügbarkeit abhängige Regulierung des H⁺-Flusses von Holzstrahlzellen zu Gefäßen. So ist bekannt, dass ein erhöhter H⁺-Gradient an der Plasmamembran den Mineraltransport durch Ionenkanäle und Transporter aktiviert (MICHELET and BOUTRY 1995; SZE *et al.* 1999; PALMGREN *et al.* 2001). Für krautige Pflanzen konnte bereits gezeigt werden, dass die Aufnahme von Kalium aus dem Xylem in die angrenzenden Zellen des Kontaktparenchyms an den durch diese Zellen erzeugten H⁺-Gradienten gekoppelt ist (DEBOER *et al.* 1985). Daher kann das verstärkte Auftreten der PM H⁺-ATPase in Kontaktzellen als ein Regulationsmechanismus gesehen werden, der unter Kaliummangelernährung die Kaliumaufnahme des Holzstrahlparenchyms aus den Gefäßen fördert. Da das Holzstrahlparenchym den radialen Mineraltransport vom Xylem zu den teilungsaktiven Zellen des Cambiums vermittelt (BRAUN 1967; DÜNISCH *et al.* 1998; MURAKAMI *et al.* 1999), übernimmt die in den Kontaktzellen lokalisierte PM H⁺-ATPase möglicherweise eine Schlüsselfunktion bei der Regulierung des Kaliumtransfers zum cambialen Gewebe.

5. Zusammenfassung

Am Beispiel der Modellpflanze *P. tremula x tremuloides* wurde in der vorliegenden Arbeit eine anatomisch-physiologische Analyse zur Bedeutung von Kalium für die Holzbildung durchgeführt. Der zentrale Versuchsansatz bestand in der gezielten Beeinflussung des Kaliumhaushalts der Holzbildungszone von Versuchspflanzen durch Variation ihrer Kaliumernährung von 50 μM bis 10 mM Kalium. Es zeigte sich, dass die Holzstruktur, die Holzchemie und der Kaliumhaushalt wesentlich durch die vorgenommenen Variationen der Kaliumernährung beeinflusst werden.

- Mit abnehmender Kaliumversorgung nahm die Anzahl der Gefäße deutlich ab, wobei jedoch die Gefäßdichte (Gefäßfläche / Xylemfläche) durch die Kaliumernährung kaum beeinflusst wurde. Dementsprechend nahm die Größe von Gefäßen bei abnehmender Kaliumversorgung zu. Während die Faserquerschnittsflächen keine Beeinflussung durch die Kaliumernährung zeigten, war ein deutlicher Anstieg der Faserlänge bei Pflanzen mit reduzierter Kaliumernährung zu beobachten. Mit abnehmender Kaliumversorgung verringerte sich zudem deutlich die Anzahl der cambialen Zellen und der Zellexpansionszone.
- Elementanalysen ergaben eine zellspezifische Verteilung von Kalium in der Holzbildungszone, welche ebenfalls einer Beeinflussung durch die Kaliumernährung unterlag. Cambiale Zellen und die sich aus ihnen differenzierenden großlumigen Gefäße zeigten sehr hohe Kaliumwerte im Gegensatz zu den kleinumigen Fasern, die während ihrer Differenzierung vergleichsweise niedrige Kaliumwerte aufwiesen. Dies deutet auf eine wesentliche Einbindung von Kalium in die Größen- und Formentwicklung der sich differenzierenden Xylemzellen hin.
- Unter Kaliummangelbedingungen konnte eine Akkumulation von Natrium im Cambium festgestellt werden, die einen K^+ / Na^+ -Ionenantagonismus anzeigt. Zudem konnte gezeigt werden, dass Natrium unter Kaliummangelbedingungen die Kaliumaufnahme fördert, was auf die Existenz eines hochaffinen K^+ / Na^+ Cotransportsystem hindeutet.

- Saisonale Untersuchungen über den Verlauf der Vegetationsperiode zeigten für die Holzbildungszone einen deutlichen Zusammenhang zwischen Kaliumhaushalt, osmotischem Potential und cambialer Aktivität. So konnte eine auffällige Übereinstimmung im saisonalen Verlauf dieser Parameter beobachtet werden. Veränderungen der Kaliumernährung beeinflussten den saisonalen Verlauf dieser Parameter im gleichen Maße.
- Abnehmende Kaliumernährung verursachte eine zunehmende Lignifizierung des Holzgewebes, einhergehend mit einem verringerten Gehalt an Cellulose.

Um Informationen über die molekularen Regulationsmechanismen des Kaliumhaushalts zu gewinnen, wurde das Auftreten von Kaliumkanälen sowie der H⁺-ATPase der Plasmamembran (PM H⁺-ATPase) im Stammgewebe untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmalig pflanzliche Kaliumkanäle *in situ* lokalisiert und ein zellspezifisches Auftreten gezeigt werden.

- Der Kaliumkanal PTORK (*Populus tremula* outward rectifying $\underline{\text{K}}^+$ channel), der im pflanzlichen Gewebe auswärtsgerichtete Kaliumströme vermittelt, wurde in Siebröhren, in sich differenzierenden Fasern und in Kontaktzellen des Holzstrahlparenchyms lokalisiert. Für PTORK ergab sich somit eine auffällige Übereinstimmung zwischen dem Auftreten dieses Kaliumkanals in sich differenzierenden Fasern und den sich in diesen Zellen verringerten Gehalten an Kalium. Diese Übereinstimmung verweist auf eine Regulation des Kaliumhaushalts differenzierender Fasern durch PTORK und deutet hierdurch auf eine funktionelle Einbindung dieses Kaliumkanals in die Größen- und Formentwicklung dieser Zellen hin.
- Der Kaliumkanal PTK2 (*Populus tremula* $\underline{\text{K}}^+$ channel 2), der im pflanzlichen Gewebe einwärtsgerichtete Kaliumströme vermittelt, wurde in parenchymatischen Zellen des Phloems und im Strahlparenchym lokalisiert. Aus dieser Lokalisation ergibt sich eine wichtige Rolle dieses Kaliumkanals für die Kaliumbeladung des Strahlparenchyms. Für PTK2 gelang eine zusätzliche Feinlokalisierung im Transmissionselektronenmikroskop (TEM), welche das Auftreten von PTK2 an der Plasmamembran zeigte.

- Erstmalig gelang in dieser Arbeit der Nachweis, dass die PM H⁺-ATPase durch die Kaliumernährung beeinflusst wird. So war unter Kaliummangel ein verstärktes Auftreten dieses Enzyms in Kontaktzellen des Strahlparenchyms beobachtbar, wodurch die Aufnahme von Kalium in das Holzstrahlparenchym unter Kaliummangel gefördert werden kann.

In zusätzlichen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Abscisinsäure (ABA) sowohl die Holzbildung als auch den Kaliumhaushalt der Holzbildungszone beeinflusst. Es ergaben sich übereinstimmende Wirkungen sowohl bei ABA - Applikation als auch bei Kaliummangelernährung auf die Anatomie und auf den Kaliumhaushalt der Holzbildungszone. Hierdurch konnte eine Einbindung von ABA in die kaliumabhängigen Prozesse der Holzbildung belegt werden.

Die vorliegende Arbeit demonstrierte somit die Bedeutung von Kalium für die Prozesse der Holzbildung. Der Wachstumsregulator ABA, der Kaliumkanal PTORK und die PM H⁺-ATPase zeigten sich hierbei durch ihre Einflussnahme auf den Kaliumhaushalt der Holzbildungszone als wichtige Komponenten. Für den Kaliumkanal PTK2 ergaben sich wichtige Funktionen für die Kaliumbeladung des Strahlparenchyms. Zusätzlich ergaben sich Hinweise auf die Existenz eines natriumabhängigen *high affinity* Transportsystems für Kalium.

6 Literatur

Ache, P., Becker, D., Deeken, R., Dreyer, I., Weber, H., Fromm, H. and Hedrich, R. (2001) VFK1, a *Vicia faba* K⁺ channel involved in phloem unloading. *Plant J.* 27: 571-580.

Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, R. M. G. and Hedrich, R. (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *FEBS Lett.* 486: 93-98.

Arend, M. and Fromm, J. H. (2000) Seasonal variation in the K, Ca and P content and distribution of plasma membrane H⁺ ATPase in the cambium of *Populus trichocarpa*. In: Savidge, R. A., Barnett, J. R. and Napier, R. (eds) *Cell and molecular biology of wood formation*. BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford. Pp. 67-70.

Arend, M. (2001) Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zum kaliumabhängigen Holzwachstum bei *Populus trichocarpa* TORR. ET GRAY. Dissertation. Studienfakultät Forstwissenschaft und Ressourcenmanagement der Technischen Universität München. ISBN 3-8265-9461-4. Shaker Verlag, Aachen. 101S.

Arend, M., Weisenseel, M. H., Brummer, M., Osswald, W., Fromm, J. H. (2002) Seasonal changes of Plasma Membrane H⁺-ATPase and endogenous ion current during cambial growth in poplar plants. *Plant Physiol.* 129: 1651-1663.

Arend, M. and Fromm, J. (2003) Ultrastructural changes of cambial cell derivatives during xylem cell differentiation in *poplar*. *Plant Biology* (in press).

Babin, V., (1995) Transport des nutriments dans le tissu xylémien de *Populus x euramericana* I214. Etude à l'échelle tissulaire et membranaire, thèse, université de Pitiers.

Bailey, I. W. (1920) The cambium and its derivative tissues. II. Size variations of cambial initials in gymnosperms and angiosperms. *American Journal of Botany* 7: 355:367.

Bailey, I. W. (1930) The cambium and its derivative tissues. V. A reconnaissance of the vacuome of living cells. *Z. Zellforsch. Mikros. Anat.* 10: 651- 682.

Barnett, J. R. (1981) Secondary xylem cell development. In: Barnett, J. R. (ed.) *Xylem cell development*. Castle House. Turnbridge Wells. 47-95.

Barnett, J. R. (1992) Reactivation of the cambium in *Aesculus hippocastanum* L.: A transmission electron microscope study. *Ann. Bot.* 70: 169-177.

Baur, M., Meyer, A. L., Heumann, H. G., Lützelschwab, M. and Michalke, W. (1996) Distribution of Plasma Membrane H^+ -ATPase and polar current patterns in leaves and stems of *Elodea Canadensis*. Bot. Acta 109: 382-387.

Becker, D., Dreyer, I., Hoth, S., Reid, J. D., Busch, H., Lehnen, M., Palme, K. and Hedrich, R., (1996) Changes in voltage activation, Cs^+ sensitivity, and ion permeability in H5 mutants of the plant K^+ channel KAT1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 8123-8128.

Bisset, J. W. and Dadswell, H. E. (1950) The variation in cell length within one growth ring of certain angiosperms and gymnosperms. Division of Forest Products Reprint No.132, Australian Forestry Vol. XIV, No I.

Bradshaw, H. D. Jr. and Stetter, R. (1993) Molecular genetics of growth and development in *Populus*. I. Triploidy in hybrid poplars. Theor. Appl. Genet. 89: 167-178.

Bradshaw, H. D. Jr., Ceulemans, R., Davis, J. and Stettler, R. (2000) Emerging model systems in plant biology: Poplar (*Populus*) as a model forest tree. J. Plant Growth Regul. 19 (3): 306-313.

Braun, H. J. (1967) Development and structure of wood rays in view of contact-isolation-differentiation to hydrosystem. Holzforschung 21: 33-37.

Braun, H. J. (1982) Lehrbuch der Forstbotanik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. 256 S.

Briskin, D. P. and Gawienowski, M. C. (1996) Role of the Plasma Membrane H^+ -ATPase in K^+ Transport. *Plant Physiology*, 111 (4): 1199-1207.

Brüggemann, L., Dietrich, P., Becker, D., Dreyer, I., Palme, K. and Hedrich, R. (1999) Channel-mediated high affinity K^+ uptake into guard cells from *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 3298-3302.

Bussler, W. (1981) Physiological functions and utilization of copper. In: Copper in Soils and Plants. Loneragan, J. F., Robson, A. D. and Graham, R. D. (eds) pp: 213-234. Academic Press London.

Buvat, R. (1956a) Variations saisonnières du chronodiome dans le cambium de *Robinia pseudoaccacia*. VCR. Acad. Sci. 243: 1908-1911.

Buvat, R. (1956b) Variations saisonnières du chronodiome dans les cellules parenchymateuses du phloème de *Robinia pseudoaccacia*. VCR. Acad. Sci. 243: 2127-2130.

Catesson, A.-M. (1964) Origine, fonctionnement et variations cytologiques saisonnières du cambium de l'Àcer pseudoplatanus L. (Acéracées). *Ann. Sci. Nat. Bot. Ser.* 12 (5): 229-456.

Catesson, A.-M. (1974) Cambial cells. *In*: Robards A. W. (ed) *Dynamic aspects of plant ultrastructure*. McGraw Hill. New York, 358-390.

Catesson, A.-M. (1984) La dynamique cambiale. *Ann. Sci. Nat. Bot. Ser.* 13, 6: 23-43.

Catesson, A.-M. (1994) Cambial ultrastructure and biochemistry: changes in relation to vascular tissue differentiation and the seasonal cycle. *Int. J. Plant. Sci.* 155: 251-261.

Catesson, A.-M. (2000) Preface *In*: Savidge, R. A., Barnett, J. R. and Napier, R. (eds) *Cell and molecular biology of wood formation*. BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford.

Chaffey, N. J., Barnett, J. and Barlow, P. (1997) Endomembranes, Cytoskeleton and cell walls: aspects of the ultrastructure of the vascular cambium of taproots of *Aesculus hippocastanum* L. (Hippocastaneacées). *Int. J. Plant. Sci.* 158: 97-109.

Chaffey, N. (1999a) Cambium: old challenges – new opportunities. *Trees* 13: 138-151.

Chaffey, N (1999b) Wood formation in forest trees: from *Arabidopsis* to *Zinnia*. *Trends in plant science* 4 (6): 203-204.

Chaffey, N. (2002) Why is there so little research into the cell biology of the secondary vascular system of trees? *New Phytologists* 153: 213-223.

DeBoer, A. H., Katou, K., Mizunu, A., Kojima, H. and Okamoto, H. (1985) The role of electrogenic xylem pumps in K⁺ absorption from the xylem of *Vigna unguiculata*: the effects of auxin and fusaric acid. *Plant, Cell and Environment* 8: 579-586.

Deeken, R., Sanders, C., Ache, P. and Hedrich, R. (2000) Development and light dependent regulation of a phloem localised K⁺ channel of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 23: 285-290.

Deeken, R., Fromm, J., Koroleva, O., Ache, P., Langenfeld-Heyser, R., Geiger, D., Sauer, N., May, S. T. and Hedrich, R. (2002) Loss of AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of *Arabidopsis*. *Planta* 216: 334-344.

Deeken, R. Ivashikina, N., Czirjak, T., Philippar, K., Becker, D., Ache, P. and Hedrich, R. (2003) Tumor development in *Arabidopsis thaliana* involves the Shaker-like K⁺ channel AKT1 and AKT2/3. *The Plant Journal* 34: 778-787.

Dennison, K. L., Robertson, W. R., Lewis, B. D., Hirsch, R. E., Sussman, M. R. and Spalding, E. P. (2001) Functions of AKT1 and AKT2 potassium channels determined by studies of single and double mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127: 1012-1019.

Doley, D. and Leyton, L. (1968) Effects of growth regulating substances and water potential on the development of secondary xylem in *Fraxinus*. *New Phytol.* 67: 579-594.

Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. and MacKinnon, R. (1998) The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science* 280: 69-77.

Dreyer, I., Horeau, C., Lemaillet, G., Zimmermann, S., Bush, D., Rodriguez-Navarro, A., Schachtman, D., Spalding, E., Sentenac, H. and Gaber, R. (1999) Identification and Characterization of plant transporters using heterologous expression systems. *J. Exp. Bot.* 50: 1073-1087.

Dünisch, O. and Bauch, J. (1994 a) Influence of Mineral Elements on Wood Formation of Old Growth Spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Holzforschung* 48 Suppl.: 5-14.

Dünisch, O. and Bauch, J. (1994 b) Influence of soil substrate and drought on wood formation of spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) *Holzforschung* 48: 5-14.

Dünisch, O., Bauch, J., Müller, M. and Greis, O. (1998) Subcellular Quantitative Determination of K and Ca in Phloem, Cambium, and Xylem Cells of Spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) During Earlywood and Latewood Formation. *Holzforschung* 52: 582-588.

Erhardt, T., Zimmermann, S. and Müller-Rober, B. (1997) Association of plant K⁺_{in} channels is mediated by conserved C-termini and does not affect subunit assembly. *FEBS Lett.* 409: 166-170.

Eschrich, W., Fromm, J. and Essiamah, S. (1988) Mineral partitioning in phloem during autumn senescence of beech leaves. *Trees* 2: 73-83.

Farrar J. J. and Evert, R. F. (1997a) Seasonal changes in the ultrastructure of the vascular cambium of *Robinia pseudoacacia*. *Trees* 11 (4): 191-202.

Farrar J. J. and Evert, R. F. (1997b) Ultrastructure of cell division in the fusiform cells of the vascular cambium of *Robinia pseudoacacia*. *Trees* 11 (4): 203-215.

Fengel, D. and Wegener, G. (1979) Hydrolysis of polysaccharides with trifluoroacetic acid and its application to rapid wood and pulp analysis. In: *Hydrolysis of Cellulose: Mechanism of enzymatic and acid catalysis*. R. D. Brown and L. Jurasek (Eds.) *Advances in Chemistry Series No. 181*. American Chemical Society, Washington. Pp. 145-158.

Fengel, D. and Wegener, G. (1989) *Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter, Berlin New York. 613 S.

Fladung, M., Grossmann, K, and Ahuja, M. R. (1997) Alterations in hormonal and developmental characteristics in transgenic *Populus* conditioned by the rolC gene from *Agrobacterium rhizogenes*. *J Plant Physiol* 150: 420-427.

Fromm, J. and Bauer, T. (1994) Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation. *J. Exp. Bot.* 45: 463-469.

Fromm, J. (1997) Hormonal physiology of wood in willow (*Salix viminalis*): effects of spermine and abscisic acid. *Wood Science Technol.* 31 (2): 119-130.

Gaymard, F., Cerutti, M., Horeau, C., Lemaillet, G., Urabach, S., Ravallec, M., Devauchelle, G., Sentenac, H. and Thibaud, J-B. (1996) The Baculovirus/insect cell system as an alternative to *Xenopus Oocytes*. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (37): 22863-22870.

Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferrière, N., Thibaud, J.-B. and Sentenac, H. (1998) Identification and distribution of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell* 94, Sep. : 647-655.

Gerlach, D. (1969) *Botanische Mikrotechnik. Eine Einführung*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 298 S.

Greil, P., Lifka, T. and Kaindl, A. (1998 a) Biomorphic Silicone Carbide Ceramics from Wood: I. Processing and Microstructure. *J. Europ. Ceram. Soc.* 18: 1961-1973.

Greil, P., Lifka, T. and Kaindl, A. (1998 b) Biomorphic Silicone Carbide Ceramics from Wood: II. Mechanical Properties. *J. Europ. Ceram. Soc.* 18: 1975-1983.

Guardia, M. D. de la and Benlloch, M. (1980) Effects of potassium and gibberellic acid on stem growth of whole sunflower plants. *Physiol. Plant.* 49: 443-448.

Haeder, H.E. and Behringer, H. (1981) Influence of potassium nutrition and water stress on the abscisic acid content in grains and flag leaves during grain development. *J. Sci. Food Agric.* 32: 552-556.

Hager, A., Debus, G., Edel, H. G., Stransky, H. and Serrano, R. (1991) Auxin-induced exocytosis and the rapid synthesis of a high turnover pool of plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* 185: (4) 527-537.

Han, K.-H., Gordon M. P., Strauss, S. H. (1996) Cellular and molecular biology of *Agrobacterium*-mediated transformation of plants and its application to genetic transformation of *Populus*. In: Stetter, R., Bradshaw, H., Heilman, J. P., Hinckley, T. M., (eds.), *Biology of Populus and Its Implication for Management and Conservation*. National Research Council, Ottawa, Canada, pp. 201-222.

Han, K.-H., Meilan, R., Ma, C. and Strauss, S. H. (2000) An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cotton hybrids (genus *Populus*). *Plant Cell Rep.* 19: 315-320.

Hawkesford, M.J., Davidian, J. C. and Grignon, C. (1993). Sulphate / proton cotransport in plasma membrane vesicle isolated from roots of *Brassica napus* L.: increased transport in membrane isolated from sulfur-stressed plants. *Planta* 190: 297-304.

Hawkins, S., Samaj J., Lauvergeat, V., Boudet, A. and Grima-Pettenati, J. (1997) Cinnamyl alcohol dehydrogenase: Identification of new sites of promoter activity in transgenic poplar. *Plant Physiol.* 113: 321-325.

Hedrich, R. and Schroeder, J.I. (1989) The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 40: 539-569.

Hedrich, R. and Roelfsma, M.-R. G. (1999) Plant ion transport. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Available: <http://www.els.net> : Macmillan Reference Ltd.

Herman, M., Dutilleul, P. and Avella-Shaw, T. (1998) Intra-ring and inter-ring variations of tracheid length in fast grown versus slow-grown Norway spruces (*Picea abies*). *IAWA J.* 19: 3-23.

Himpkamp, J. (1988) Nachweis und Charakterisierung eines H⁺ / Glucose-Cotransport-systems in den Holzstrahlzellen von *Populus balsamifera* (Saliaceae) und seine jahreszeitliche Veränderung. Dissertation, Christian Albrecht Universität, Kiel.

Hirsch, R., Lewis, B. D., Spalding, E. P. and Sussmann, M. R. (1998) A role of AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* 280: 918-921.

Hoagland, D. R., Arnon, D. I. (1950) The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn. Bull.* 347: 1-32.

Hoth, S., Dreyer, I., Becker, D., Müller-Röber, D. and Hedrich, R. (1997) Molecular basis of plant specific acid activation of K^+ uptake channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4806-4810.

Hsiao, T. C. and Läuchli, A. (1986) Role of potassium in plant water relations. *In: Tinker, B.; Läuchli, A. (eds.) Advances in Plant Nutrition. Vol. 2: 281-312. Praeger Scientific, New York.*

Hu, W.J., Harding, S. A., Lung, J., Popko, J. L., Ralph, J., Stokke, D., Tsai, C.J. and Chiang, V. L., (1999) Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature Biotechnology* 17: 808-812.

Iqbal, M. (1995) Structure and behavior of vascular cambium and the mechanism and control of cambial growth. *In: Iqbal, M. (ed.) The Cambial Derivatives. Gebrüder Borntraeger, Berlin, pp. 1-67.*

Ivashikina, N., Becker, D., Ache, P., Meyerhoff, O., Felle, H. H. and Hedrich, R. (2001) K^+ channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. *FEBS Lett.* 508: 463-469.

Junghans, U. Langenfeld-Heyser, R., Polle, A. and Teichmann, T. (2003) Effect of auxin transport inhibitors on the wood anatomy of poplar. *Plant Biology (Eingereicht).*

Kim, E. J., Kwak, J. M., Uozumi, N. and Schroeder, J. I. (1998) AtKUP1: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell* 10: 51-62.

Kleinig, H. und Sitte, P. (1992) *Zellbiologie: ein Lehrbuch. (3. neuberab. Aufl.) Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, Jena, New York. 591 S.*

Kochian, L. V. (2000) Molecular physiology of mineral nutrient acquisition, transport, and utilization. *In: Biochemistry & molecular biology of plants. Buchanan, B. B., Gruissem, W. and Jones, R. (eds.) American Society of Plant Physiologists; Rockville, Maryland. Pp. 1204 – 1249.*

Koltzenburg, C. (1966) Die Abhängigkeit der Holzeigenschaft der Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.) von Lichtgenuss, soziologischer Stellung und anderen Wuchsbedingungen. Dissertation an der Forstlichen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen.

Krabel, D. (2000) Influence of sucrose on cambial activity. *In*: Savidge, R. A., Barnett, J. R. and Napier, R. Cell and Molecular Biology of Wood Formation. BIOS Scientific Publishers LTD, Oxford. Pp. 113-122.

Kuhn, A. J., Schröder, W. H. and Bauch, J. (1997) On the distribution and transport of mineral elements in xylem, cambium and phloem of spruce (*Picea abies* L. Karst.) *Holzforschung* 51: 487-496.

Kutschera, U. (2001) Stem elongation and cell wall proteins in flowering plants. *Plant Biol.* 3: 466-480.

Lachaud, S. (1989) Participation of auxin and abscisic acid in the regulation of seasonal variations in cambial activity and xylogenesis. *Trees* 3: 125-137.

Lachaud, S., Catesson, A.-M. and Bonnemain, J.-L. (1999) Structure and functions of the vascular cambium. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences – Series III, Life Science.* Vol. 322: 633-650.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H. and Thibaud, J.-B. (2000a) A shaker-like K⁺ channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 837-851.

Lacombe, B., Pilot, G., Gaymard, F., Sentenac, H. and Thibaud, J.-B. (2000b) pH control of the plant outwardly-rectifying potassium channel SKOR. *FEBS Lett.* 466: 351-354.

Langer, K., Ache, P., Geiger, D., Stinzinger, A., Arend, M., Wind, C., Regan, S., Fromm, J. and Hedrich, R. (2002) Poplar potassium transporters capable of controlling K⁺ homeostasis and K⁺-dependent xylogenesis. *The Plant Journal* 32: 997-1009.

Langer, K. (2003) Kaliumhomöostase und kaliumabhängige Xylogenese in *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx. Dissertation am Julius-von-Sachs Institut für Biowissenschaften, Würzburg.

Larson, P. R. (1994) The vascular cambium: development and structure. Springer-Verlag. Series in Wood Science 725p.

Legarde, D., Basset, M., Lepetit M., Conejero, G., Gaymard, F., Astruc S. and Grignon C. (1996) Tissue-specific expression of Arabidopsis AKT1 gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. The Plant Journal 9 (2): 195-203.

Leigh, R. A. and Wyn Jones, R. G. (1984) A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of the ion in the plant cell. New Phytol. 97: 1-13.

Liese, W. und Ammer, U. (1957) Untersuchungen über die Länge der Holzfaser bei der Pappel. Holzforschung 11 (5/6): 169–174.

Little, C. H. A. and Savidge, R. A. (1987) The role of plant growth regulators in forest tree cambial growth. Plant Growth Regul. 6: 137-169.

Lockhardt, J. A. (1965) An analysis of irreversible plant cell elongation. J. Theor. Biol. 8: 264-275.

Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P. and Darnell J. (1996) Molekulare Zellbiologie. 2. Auflage. Walter de Gruyter. Berlin, New York. 1448S.

Lüttge, U. and Higinbotham, N. (1979) Transport in plants. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin. 468p.

Lützelshwab, M. (1990) Biochemische und immunologische Charakterisierung von Funktionen der Plasmamembran von *Curcubita pepo* L.: Evidenz für Heterogenität der Plasmamembran. Dissertation der Albert Ludwigs Universität Freiburg. 163S.

Maathius F. J. M. and Sanders, D. (1993) Energization of potassium uptake in *Arabidopsis thaliana*. Planta 191: 302-307.

Maathius, F. J. M., Ichida, A. M., Sanders, D. and Schroeder J. I. (1997) Roles of higher plant K⁺ channels. Plant Physiol. 114: 1141-1149.

MARSCHNER, H. and ÇAKMAK, I. (1989) High light intensity enhances chlorosis and necrosis in leaves of zinc, potassium, and magnesium deficient bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. J. Plant Physiol. 134:308-315.

Marschner, H. (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Edition. Academic Press. San Diego. 889pp.

Mäkinen, H., Saranpää, P. and Linder, S. (2002) Effect of Growth Rate on Fibre Characteristics in Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Holzforschung* 56: 449-460.

Mäser, P., Gierth, M. and Schroeder, J. (2002) Molecular mechanism of potassium and sodium uptake in plants. *Plant and Soil* 247: 43-54.

Mellerowicz, E. J., Baucher, M., Sundberg, B. and Boerjan, W. (2001) Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant Molecular Biology* 47: 239-274.

Meyer, R. F. and Boyer, J. S. (1972) Sensitivity of cell division and cell elongation to low water potentials in soybean hypocotyls. *Planta* 108: 77-87.

Meyer-Uhlenried, H. K. (1957) Holzanatomische Untersuchungen an der Pappel. *Holzforschung* 11 (5/6): 150-157.

Michelet, B. and Boutry, M. (1995) The Plasma Membrane H^+ ATP-ase. A highly regulated Enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol.* 108: 1-6.

Mouline, K., Véry, A.-A., Gaymard, F., Boucherez, J., Pilot, G., Devic, M., Bouchez, D., Thibaud, J.-B. and Sentenac, H. (2002) Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K^+ channel in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 16: 339-350.

Murakami, Y., Funada, R., Sano, Y. And Ohtani, J. (1999) The Differentiation of Contact Cells and Isolation Cells in the Xylem Ray Parenchyma of *Populus maximowiczii*. *Annals of Bot.* 84: 429-435.

Nultsch, W. (2000) Allgemeine Botanik. 11. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 663S.

Önnerud, H. and Gellerstedt, G. (2003) Inhomogeneities in the chemical structure of hardwood lignins. *Holzforschung* 57: 255-265.

Palmgren, M. G. (2001) Plant plasma membrane H^+ ATP-ases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 817-845.

Peuke, A. D., Jeschke, W. D. and Hartung, W. (2002) Flows of elements, ions and abscisic in *Rhizinus communis* and site of nitrate reduction under potassium limitation. *J. Exp. Bot.* 53 (367): 241-250.

Philippar, K., Fuchs, I., Lüthen, H., Hoth, S., Bauer, C. S., Haga, K., Thiel, G., Ljung, K., Sandberg, G., Böttger, M., Becker, D. and Hedrich, R. (1999) Auxin-induced K^+ channel expression represents an essential step in coleoptil growth and gravitropism. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96 (21): 12186-12191.

Pissarek, H.-P. (1973) Zur Entwicklung der Kalium-Mangelsymptome von Sommeraps. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde.* 136 (1): 1-19.

Pissarek, H.-P. (1974) Untersuchungen der durch Kupfermangel bedingten anatomischen Veränderungen bei Hafer und Sonnenblumen. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 137:224-234.

Pitman, M. G., Mowat, J. and Nair, H. (1971) Interactions of processes for accumulation of salt and sugar in barley plants. *Aust. J. Biol.* 24: 619-631.

Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Chérel, I., Boucherez, J., Thibaud, J.-B. and Sentenac, H. (2001) Guard Cell inward K^+ channel activity in *Arabidopsis* involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. *J. Biol. Chem.* 276: 3215-3221.

Plomion, C., Leprovost, G. and Stokes, A. (2001) Wood Formation in Trees. *Plant Physiol.* 127: 1513-1523.

Pottosin, I. I., Martinez-Estévez, M., Dobrovinskaya, O. R. and Muñoz J. (2003) Potassium-selective channel in red beet vacuolar membrane. *J. of Exp. Bot.* 54 (383): 663-667.

Puech L., Türk, S., Hodson, J. and Fink, S. (2000) Wood formation in hybrid aspen (*Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.) grown under different nitrogen regimes. *In: Savidge, R. A., Barnett, J. R. and Napier, R. (eds.) Cell and molecular biology of wood formation.* BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford. Pp. 141-153.

Rahimi, A. and Bussler, W. (1974) Kupfermangel an höheren Pflanzen und sein histochemischer Nachweis. *Landwirtsch. Forsch. Sonderh.* 30 (II): 101-111.

Raven, J. A. (1987) The Role of vacuoles. *New Phytol.* 106: 357-422.

Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K. and Hedrich, R. (2002) AtKc1, a silent Arabidopsis potassium channel α -subunit modulates root hair K^+ influx. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 4079-4084.

Reynolds, E. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208 - 212.

Ridoutt, B. G. and Sands, R. (1994) Quantification of processes of secondary xylem fibre development in *Eucalyptus globulus* at two height levels. IAWA J. 15: 417-424.

Rigas, S., Debrosses, G., Haralampidis, K., Vicente-Agullo, F., Feldmann, K., A., Grabov, A., Dolan, L. and Hatzopoulos, P. (2001) *TRHI* Encodes a potassium transporter required for tip growth in Arabidopsis root hairs. Plant Cell, 13 (1) : 139-151.

Rober-Kleber, N., Albrechtová J. T. P., Fleig, S., Huck, N., Michalke, W., Wagner, E., Speth, V., Neuhaus, G. and Fischer-Iglesias, C. (2003) Plasma Membrane H^+ ATP-ase is involved in Auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development. Plant Phys. 131 (3): 1302-1312.

Roberts, L. W., Gahan, P. B. and Aloni, R. (1988) Vascular differentiation and plant growth regulators. Springer Series in Wood Science, Springer-Verlag.

Roberts, S. K. and Snowman, B. (2000) The effects of ABA on channel-mediated K^+ transport across higher plant roots. J. of Exp. Botany 51 (350): 1585-1594.

Rodriguez-Navarro, A. (2000) Potassium transport in fungi and plants. Biochi. Biophys. Acta 1469: 1-30.

Roffael, E., Dix, B. and Okum, J. (2000) Use of spruce tannin as a binder in particleboards and medium density fiberboards (MDF). Holz als Roh- und Werkstoff 58: 301-305.

Rubio, F., Gassmann, W. and Schroeder, J. I. (1995) Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. Science 270 (5242): 1660–1663.

Runkel, R. O. H. und Wilke, K.-D. (1951) Zur Kenntnis des thermoplastischen Verhaltens von Holz. Holz als Roh- und Werkstoff, Jahrgang 9, Nr. 7, S. 260 - 270.

Ryden, P., Sugimoto-Shirasu, K., Smith, A. C., Findlay, K., Reiter, W.-D. and McCann, M. C. (2003) Tensile Properties of *Arabidopsis* Cell Walls Depend on Both a Xyloglu-

can Cross-Linked Mikrofibrillar Network and Rhamnogalacturonan II-Borate Complexes. *Plant Physiol.* 132 (2): 1033-1040.

Samuels, A. L., Fernando, M. and Glass, D. M. (1992) Immunofluorescence localisation of plasma membrane H⁺-ATPase in barley roots and effects of K⁺ nutrition. *Plant Physiol.* 99: 1509-1514.

Sanders, D. and Bethke, P. (2000) Membran Transport. *In: Buchanan, B. B., Gruissem, W. and Jones, R. L. (eds.) Biochemistry and molecular biology of plants.* American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. Pp 110-159. Zu beziehen unter: <http://aspp.org/biotext>

Sauter, J. J. and Kloth, S. (1986) Plasmodesmatal frequency and radial translocation rates in ray cells of poplar (*Populus x Canadensis* Moench "robusta"). *Planta* 168:377-380.

Sauter, J. J. (2000) Photosynthate allocation to the vascular cambium: facts and problems. *In: Savidge, R. A., Barnett, J. R. and Napier, R. (eds) Cell and molecular biology of wood formation.* BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford. Pp. 71-83.

Savidge, R. A. (2000) Biochemistry of seasonal cambial growth and wood formation – an overview of the challenges. *In: Savidge, R. A., Barnett, J. R. and Napier, R. Cell and Molecular Biology of Wood Formation.* BIOS Scientific Publishers LTD, Oxford. Pp. 1-28.

Savidge, R. A. (1996) Xylogenesis, genetic and enviromental regulation. *IAWA Journal* 17 (3): 269-310.

Schachtman, D. P. and Schroeder, J. I. (1994) Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* 370: 655-658.

Sen Gupta, A., Berkowitz, G. A. and Pier, P. A. (1989) Maintenance of photosynthesis of low leaf water potential in wheat. *Plant Physiol.* 89: 1358-1365.

Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J. M., Gaymard, F. and Grignon C. (1992) Cloning and expression in yeast of plant potassium ion transport system. *Science* 256: 663-665.

Smart, L. B., Vojdani, F., Maeshima, M. and Wilkins, T. A. (1998) Genes involved in osmoregulation during turgor-driven cell expansion of developing cotton fibers are differentially regulated. *Plant Physiol.* 116: 1539-1549.

Spurr, A. E. (1969) A low - viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26: 31 - 41.

Sterky, F., Regan, S., Karlsson, J., Hertzberg, M., Rohde, A., Holmberg, A., Amini, B., Bhalerao, R., Larsson, M., Villarroel, R., Van Montagu, M., Sandberg, G., Olsson, O., Teeri, T., Boerjan, W., Gustafsson, P., Uhlén, M., Sundberg, B. , & Lundeberg, J. (1998) Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: Analysis of 5692 expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13330-13335.

Suelter, C. H. (1970) Enzymes activated by monovalent cations. *Science* 168, 789-795.

Sussman, M. R. and Harper, J. F. (1989) Molecular biology of the plasma membrane of higher plants. *Plant Cell* 1: 953-960.

Sze, H., Li, H. and Palmgren, M. G. (1999) Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: Regulation and Biosynthesis. *Plant Cell* 11: 677-690.

Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, R. G., Ache, P., Reintanz, B., Deeken, R., Godde, M., Felle, H., Steinmeyer, R., Palme, K. and Hedrich, R. (2001) KAT1 is not essential for stomata opening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2917-2921.

Taiz, L. und Zeiger, E. (2000) *Physiologie der Pflanze*. Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, 773 S.

Taylor, G. (2002) *Populus*: Arabidopsis for Forestry. Do we need a model tree? *Annals of Botany* 90: 681-689.

Tode, K. and Lüthen, H. (2001) Fusicoccin- and IAA- induced elongation growth share the same pattern of K⁺ dependence. *Journal of Experimental Botany* 52 (355): 251-255.

Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic Transfer of Proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350 - 4354.

Tuominen, H., Puech, L., Fink, S. and Sundberg, B. (1997) A radial concentration gradient of indole-3-acetic acid is related to secondary xylem development in hybrid aspen. *Plant Physiol.* 115: 577-585.

Tuominen, H., Puech, L., Regan, S., Fink, S., Olsson, O. and Sundberg, B. (2000) Cambial-region-specific expression of the *Agrobacterium iaa* genes in transgenic aspen visualized by a linked *uidA* reporter gene. *Plant Physiol* 123: 531-541.

Uggla, C., Mellerowicz, E. J. and Sundberg, B. (1998) Indole-3-Acetic Acid controls cambial growth in Scots Pine by positional signalling. *Plant Physiol.* 117: 113-121.

Urbach, S., Chérel, I., Sentenac, H. and Gaymard, F. (2000). Biochemical characterization of the *Arabidopsis* K⁺ channels KAT1 and AKT1 expressed or coexpressed in insect cells. *The Plant Journal*, 23 (4): 527-236.

v. Aufseß, H. (1973) Mikroskopische Darstellung des Verholungsgrades durch Färbemethoden. *Holz als Roh- und Werkstoff* 31: 24-33.

Van Bel, A. J. E. (1990) Xylem-Phloem exchange via the rays: the undervalued route of transport. *J. Exp. Bot.* 41 (227): 631-644.

Véry, A-A. and Sentenac, H. (2002) Cation channels in *Arabidopsis* plasma membrane. *Trend in Plant Sci.* 7 (4): 168-175.

Walker, D. J., Leigh, R. A. and Miller, A. J. (1996) Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., Plant Biology* 93: 10510-10514.

Wenham, M. W. and Cusick, F. (1975) The growth of secondary fibers. *New Phytol.* 74: 247-261.

Whiteman, A. and Brown, C. (1999) The potential role of forest plantations in meeting future demands for industrial wood products. *International Forestry Review – Vol 1 (3)*, September:143-152.

Willert, D. J., Matyssek, R. und Herppich, W. (1995) *Experimentelle Pflanzenökologie: Grundlagen und Anwendungen.* – Stuttgart; New York: Thieme. 344 S.

Wullschleger, S. D., Jansson, S. and Taylor, G. (2002) Genomics and forest biology: *Populus* emerges as the perennial favorite. *Plant Cell* (14): 2651-2655.

Wyn Jones, R. G., Brady, C. J. and Speirs J. (1979) Ionic and osmotic relations in plant cells. *In: Laidman, D. L. and Wyn Jones, R. G. (eds.) Recent Advances in the Biochemistry of Cereals.* Pp. 63-103. Academic Press, London.

Zaman, Z. and Verwilghan, R. L. (1979) *Anal. Biochem.* 100: 64-69.

Zei, P. C. and Aldrich, R. W. (1998) Voltage-dependent gating of single wild-type and S4 mutant KAT1 inward rectifier potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 112: 679-713.

Zimmermann, S. and Sentenac, H. (1999) Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 477-482.

Zimmermann, S., Erhardt, T, Plesch, G. and Müller-Röber, B. (1999) Ion channels in plant signalling. *Cell Mol Life Sci* 55: 183-203.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1.1: Schematische Querschnittsbilder des Procambiums und des vaskulären Cambiums (a,b). | 3 |
| Abb. 1.2: Querschnitt der cambialen Zone und Xylemdifferenzierungszone von <i>Populus tremula x tremuloides</i> | 5 |
| Abb. 1.3: Transportproteine der Plasmamembran: Kanäle, Transporter (Carrier) und Pumpen. | 9 |
| Abb. 1.4: Proteinstruktur der Kanäle der <i>Shaker</i> Familie (a, b). | 12 |
| Abb. 1.5: Phylogenetischer Baum pflanzlicher <i>Shaker</i> -Kanäle mit hervorgehobenen Pappel-Kanälen PKT2, PTORK und KPT1. | 15 |
| Abb. 2.1: Für die anatomischen Untersuchungen angezogene Hybridpappeln (<i>Populus tremula x Populus tremuloides</i>). | 17 |
| Abb. 2.2: EDXA-Spektren von Quarzsand und Toresa (a, b). | 18 |
| Abb. 2.3: Für die Faserlängenmessung mazerierte Holzfasern. | 21 |
| Abb. 2.4: Auswertung der energiedispersiven Röntgenspektren durch Bestimmung der Peak : Background (Hintergrund) Verhältnisse. | 25 |
| Abb. 3.1: Im Freiland angezogene Pflanzen nach einer Wachstumsphase von fünf Monaten (a, b). | 33 |
| Abb. 3.2: Blattnekrosen bei reduzierter Kaliumernährung (a, b). | 33 |
| Abb. 3.3: Typische EDXA-Spektren der relativen Elementzusammensetzung des Cambiums der drei gebildeten Versuchsvarianten. | 35 |
| Abb. 3.4: Kaliumgehalte der Holzbildungszone der Versuchsvarianten. | 36 |
| Abb. 3.5: Relative Kaliumwerte in cambialen Zellen, sich differenzierenden Xylemzellen und Gefäßzellen bei unterschiedlicher Kaliumernährung. | 37 |
| Abb. 3.6: EDXA-Linienscan der relativen Kaliumverteilung im aktiven Stammgewebe. | 38 |
| Abb. 3.7: Saisonale Veränderungen der Kaliumwerte im Cambium. | 39 |
| Abb. 3.8: Einfluss der Kaliumernährung auf die radiale Ausdehnung der cambialen Zone sowie der Zellexpansionszone. | 40 |

| | |
|---|-----|
| Anhang | 118 |
| Abb. 3.9 : Häufigkeitsverteilung der Gefäßquerschnittsfläche bei unterschiedlicher Kaliumernährung. | 41 |
| Abb. 3.10 : Gegenüberstellung von Gefäßhäufigkeit und Gefäßquerschnittsfläche. | 42 |
| Abb. 3.11 : Einfluss der Kaliumernährung auf die Anzahl und die Verteilung von Gefäßen (a-c). | 43 |
| Abb. 3.12 : Häufigkeitsverteilungen der Faserlänge bei unterschiedlicher Kaliumernährung. | 44 |
| Abb. 3.13 : Einfluss der Kaliumernährung auf die Ultrastruktur der cambialen Zellen. | 46 |
| Abb. 3.14 : Acridinorange-Malachitgrünfärbung. Grüne Färbung zeigt hohen Ligningehalt an, gelborangefärbung schwächere Lignineinlagerung. | 47 |
| Abb. 3.15 : Gegenüberstellung von Kaliumgehalten und relativem osmotischen Potential im Bereich der Holzbildungszone in Abhängigkeit von der Kaliumernährung. | 50 |
| Abb. 3.16 : Gehalte an Fructose, Glucose, Saccharose und Malat im Bereich der Holzbildungszone in Abhängigkeit von der Kaliumernährung. | 51 |
| Abb. 3.17 : Gegenüberstellung von Kaliumgehalt, relativem osmotischem Potential und cambialer Aktivität bei unterschiedlicher Kaliumernährung. | 53 |
| Abb. 3.18 : Natriumgehalte der Holzbildungszone bei unterschiedlicher Kaliumernährung. | 54 |
| Abb. 3.19 : Relative Kaliumwerte des Cambiums in Abhängigkeit von der Natriumversorgung. | 55 |
| Abb. 3.20 : Relative Kaliumgehalte im Stammgewebe von <i>P. tremula x tremuloides</i> nach externer Applikation von ABA bzw. Wasser (Kontrolle). | 56 |
| Abb. 3.21 : Einfluss von Abscisinsäure auf die radiale Ausdehnung der cambialen Zone sowie der Zellexpansionszone (a, b). | 57 |
| Abb. 3.22 : Westernblot der Membranfraktionen von Oocyten mit PTORK c-RNA sowie PTK2 c-RNA. | 59 |
| Abb. 3.23 : Lokalisierung des Kaliumkanalproteins PTK2 im Stammgewebe von <i>P. tremula x tremuloides</i> (a-i). | 61 |
| Abb. 3.24 : Lokalisierung des Kaliumkanalproteins PTORK im Stammgewebe von <i>P. tremula x tremuloides</i> (a-m). | 67 |
| Abb. 3.25 : Feinlokalisierung von PTK2 im TEM (a-e). | 74 |

| | |
|---|-----|
| Anhang | 119 |
| Abb. 3.26: A) Westernblot von Stammgewebehomogenaten mit monoklonalem Antikörper gegen die PM H ⁺ -ATPase (a, b). | 77 |
| Abb. 3.27: Einfluss der Kaliumernährung auf das Auftreten der PM H ⁺ -ATPase im Stammgewebe der Versuchspflanzen (a-e). | 78 |
| Abb. 4.1: Expressionsanalyse von Kaliumtransportproteinen mittels Realtime-Quantitativer-PCR. | 89 |

7.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 1.1: Übersicht der bisher aus <i>Arabidopsis</i> isolierten neun <i>Shaker</i> Kanäle. | 14 |
| Tabelle 2.1: Zusammensetzung der für die Anzucht der Versuchspflanzen verwendeten Nährlösungen. | 19 |
| Tabelle 2.2: Zusammensetzung der Nährlösungen zur Anzucht von Pflanzen unter Kaliummangel und bei unterschiedlicher Natriumversorgung. | 20 |
| Tab. 3.1: Gegenüberstellung von anatomischen Parametern der Holzbildung bei unterschiedlicher Versorgung der Versuchspflanzen mit Kalium. | 45 |
| Tab. 3.2: Extraktstoff-, Lignin- und Cellulosegehalte bei unterschiedlicher Kaliumernährung. | 49 |

7.3 Veröffentlichungen

Langer, K., Ache P., Geiger, D., Stinzinger, A., Arend, M., Wind, C., Regan, S., Fromm, J., Hedrich, R. (2002) Poplar potassium transporters capable of controlling K⁺ homeostasis and K⁺-dependent xylogenesis. *The Plant Journal*, **32**, 997-1009.

Wind, C., Arend, M., Langer, K., Ache, P., Fromm, J., Hedrich, R. (2002) Potassium dependent wood formation in poplar trees. Botanikertagung - Freiburg im Breisgau 2002 (Poster).