

**Aufnahme und Verlagerung von Aluminium
bei Hortensie (*Hydrangea macrophylla*)
in Beziehung zur Aluminiumtoleranz
und zur Blaufärbung der Sepalen**

Von dem Fachbereich Biologie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Annette Naumann
geboren am 13. August 1969 in Hannover

2001

Referent:	Prof. Dr. W. J. Horst
Korreferent:	Prof. Dr. H. Lehmann
Tag der Promotion:	14. Dezember 2001



ABSTRACT

Uptake and transport of aluminium in Hortensia (*Hydrangea macrophylla*) in relation to aluminium tolerance and blueing of the sepals

The difficulty in producing blue Hortensia (*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.) lies in decreasing the pH value of the substrate by aluminium (Al) sulphate supply precisely enough to guarantee sufficient Al translocation into the inflorescence for blueing, while avoiding plant damages because of Al and proton toxicity. Better understanding of the relations between Al uptake, translocation and blueing as well as of the reasons for the remarkable Al tolerance should allow more precise control of Al supply, decrease the risk of Al and proton toxicity and provide new possibilities in breeding Al resistant crops.

Applied experiments in substrate culture showed that the amount of Al sulphate necessary for the pH decrease in the substrate can be estimated by an Al buffer curve before the beginning of culture. Control of pH in a mixed substrate sample of all cultivars at the beginning of forcing and adjustment of Al supply guaranteed at least a satisfying blue of all cultivars. As reasons for cultivar differences in their capability for blueing cultivar specific influences on substrate pH and Al availability, differences in Al translocation or the blue of the petallike sepals at identical Al concentration were identified.

As demonstrated by light and electron microscopic investigations cells at the edge of the root apex were enlarged and showed enhanced vacuolation after Al treatment. The element analytical proof of Al by electron spectroscopic imaging (ESI) indicated that Al transport into the vacuoles contributes decisively to Al tolerance of *Hydrangea*. The complexing of Al in the nutrient solution by organic acids did not influence the Al uptake of the root and the Al translocations into the shoot. Induction of Al resistance after pretreatment at low Al concentrations could be proved after 24 h. The exudation of organic acid anions might play a part in Al resistance, but is not considered to be the only cause.

Al is predominantly translocated from the root into the shoot in the xylem sap, probably complexed with organic acids, especially citrate. The results indicate transpiration to be an important factor for Al distribution in the plant.

Al transport into the vacuoles of sepal subepidermis cells was demonstrated by energy dispersive X-ray analysis of extracted vacuole sap. This is responsible for the blueing of the sepals, as the sepal dye delphinidine is located in the vacuoles of the subepidermis. Compartmentation of Al in the vacuole might be the reason for the remarkable Al tolerance of *Hydrangea* not only in the root, but also in the shoot.

Because of its high Al concentrations in root and shoot *Hydrangea* represents a promising system for further investigations of Al uptake and transport, especially for distinction between apoplastic and symplastic transport.

Keywords: Aluminium transport, blueing, *Hydrangea macrophylla*

KURZZUSAMMENFASSUNG

Die Schwierigkeit bei der Produktion blauer Hortensien (*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.) besteht darin, durch Aluminium(Al)-Sulfatangebot den pH-Wert des Substrats präzise genug abzusenken, um eine für die Blaufärbung ausreichende Al-Verlagerung in die Blütenstände zu gewährleisten, aber Pflanzenschäden durch Al- und Protonentoxizität zu vermeiden. Ein besseres Verständnis der Zusammenhänge zwischen Al-Aufnahme, -Verlagerung und Blaufärbung sowie der Ursachen für die außergewöhnliche Al-Toleranz sollte eine präzisere Steuerung des Al-Angebots ermöglichen, so das Risiko von Al- und Protonentoxizität vermindern und neue Möglichkeiten bei der Züchtung Al-resistenter Nutzpflanzen eröffnen.

In praxisnahen Substratkulturversuchen konnte gezeigt werden, daß sich die zur Absenkung des pH-Werts im Substrat benötigte Al-Sulfatmenge durch eine Al-Pufferkurve vor Kulturbeginn abschätzen läßt. Durch eine Kontrolle des pH-Werts in einer Substratmischprobe aller Sorten vor Beginn der Treiberei und Anpassung des Al-Angebots ließ sich bei allen Sorten mindestens eine zufriedenstellende Blaufärbung erreichen. Als Ursache für Sortenunterschiede in der Blaufärbbarkeit wurden die sortenspezifische Beeinflussung des Substrat-pH-Werts bzw. der Al-Verfügbarkeit, Unterschiede in der Al-Verlagerung oder der Blaufärbung bei gleichem Al-Gehalt der kronblattartigen Kelchblätter (Sepalen) festgestellt.

Wie licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, waren nach Al-Behandlung die Zellen im Randbereich der Wurzelspitze vergrößert und stärker vakuolisiert. Der elementanalytische Nachweis durch Elektronen-Spektroskopische Darstellung (ESI) von Al in diesen Vakuolen spricht dafür, daß die Al-Verlagerung in die Vakuolen entscheidend zur Al-Toleranz der Hortensie beiträgt. Die Komplexierung von Al in der Nährlösung durch organische Säuren hatte keinen Einfluß auf die Al-Aufnahme der Wurzel und die Al-Verlagerung in den Sproß. Eine Induktion von Al-Resistenz nach Vorbehandlung bei niedrigen Al-Konzentrationen ließ sich kurzfristig (24 h) nachweisen. Die Exsudation organischer Säureanionen könnte zur Al-Resistenz beitragen, kommt jedoch nicht als alleinige Ursache in Betracht.

Die Al-Verlagerung von der Wurzel in den Sproß erfolgt vorwiegend im Xylemsaft, wahrscheinlich in komplexierter Form mit organischen Säuren, insbesondere Citrat. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die Al-Verteilung in der Pflanze entscheidend durch die Transpiration bestimmt wird.

Eine Al-Verlagerung in die Vakuolen von Subepidermiszellen der Sepalen konnte mittels energiedispersiver Röntgenmikroanalyse (EDXA) des isolierten Vakuolensafts nachgewiesen werden. Sie ist für die Blaufärbung der Sepalen verantwortlich, da der Sepalenfarbstoff Delphinidin in den Vakuolen der Subepidermis lokalisiert ist. Kompartimentierung von Al in der Vakuole kommt also nicht nur in der Wurzel, sondern auch im Sproß als Ursache für die außergewöhnliche Al-Toleranz der Hortensie in Betracht.

Die Hortensie stellt aufgrund der hohen Al-Gehalte in Wurzel und Sproß ein vielversprechendes System zur weitergehenden Untersuchung der Al-Aufnahme und -Verlagerung dar, insbesondere zur Differenzierung zwischen apo- und symplastischem Transport.

Schlagworte: Aluminiumverlagerung, Blaufärbung, *Hydrangea macrophylla*

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	7
2.1	Pflanzenmaterial und Kulturbedingungen	7
2.1.1	Hortensiensorten	7
2.1.2	Substratkultur	7
2.1.3	Nährlosungskultur	9
2.2	Versuchsdurchführungen	10
2.2.1	Einfluß des Al-Angebots auf Al-Verlagerung und Blaufärbung verschiedener Sorten in Substratkultur	10
2.2.2	Einfluß von Al auf Wurzelmorphologie und Al-Lokalisation in der Wurzel	12
2.2.3	Einfluß der Al-Form auf Al-Aufnahme, -Verlagerung und -Toxizität	13
2.2.4	Einfluß eines kurzfristig niedrigen Al-Angebots auf die Induktion von Al-Resistenz	14
2.2.5	Einfluß von Al auf die Exsudation organischer Säureanionen durch die Wurzel	15
2.2.6	Al-Verlagerung in den Blütenstand und Blaufärbung in Nährlosungskultur	15
2.2.7	Einflußfaktoren auf die Al-Verlagerung in die Sepalen	16
2.2.7.1	Blütenstandsgröße	16
2.2.7.2	Unterbrechung des Phloemtransports durch Ringelung	16
2.2.7.3	Transpiration	17
2.2.8	Bestimmung der Al-Konzentration im Vakuolensaft von Sepalen	17
2.3	Durchgeführte Untersuchungen und chemische Analysen	18
2.3.1	pH-Wertbestimmung von Substratextrakten, Nährlösung und Xylemsäften	18
2.3.2	Farbbonitur	18
2.3.3	Farbmessung	19
2.3.4	Gewinnung von Xylemexsudat	22
2.3.5	Bestimmung des Wurzelwachstums	22
2.3.6	Bestimmung des Trockengewichts	23
2.3.7	Mineralstoffbestimmungen	23
2.3.8	Kallosebestimmung	24
2.3.9	Bestimmung organischer Säuren	25

2.3.10	Berechnung der Al-Speziesverteilung mit GEOCHEM-PC	26
2.3.11	Licht- und Elektronenmikroskopie	27
2.3.12	Lokalisation von Al, P, S und Ca mittels Elektronen-Energie-Verlust-Spektroskopie (EELS) und Elektronen-Spektroskopischer-Darstellung (ESI)	28
2.3.13	Ermittlung der Fläche von Blütenständen	29
2.3.14	Ringelung zur Unterbrechung des Phloemtransports	29
2.3.15	Gewinnung von Vakuolensaft aus Subepidermiszellen von Sepalen mittels modifizierter Druckmeßsondentechnik	29
2.3.16	Energiedispersive Röntgenmikroanalyse von Vakuolensaft	30
2.4	Statistik	31
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Einfluß des Al-Angebots auf Al-Verlagerung und Blaufärbung verschiedener Sorten in Substratkultur	32
3.1.1	Substrat-pH-Werte	32
3.1.2	Sepalenfarbe	33
3.1.3	Al- und Nährstoffgehalte der Sepalen	37
3.1.4	Wachstum	41
3.1.5	Al und organische Säuren im Xylemsaft – inklusiv berechneter Al-Speziesverteilung	42
3.2	Einfluß von Al auf Wurzelmorphologie und Al-Lokalisation in der Wurzel	49
3.3	Einfluß der Al-Form auf Al-Aufnahme, -Verlagerung und -Toxizität	55
3.3.1	Al-Speziesverteilung in der Nährlösung	55
3.3.2	Wurzelwachstum	57
3.3.3	Al- und Kallosegehalte der Wurzelspitzen	58
3.3.4	Al-Gehalt der Wurzel und verschiedener Sproßfraktionen	60
3.3.5	Wurzelfrischgewicht und exsudierte Xylemsaftmenge	63
3.3.6	Al und organische Säuren im Xylemsaft	64
3.4	Einfluß eines kurzfristig niedrigen Al-Angebots auf die Induktion von Al-Resistenz	68
3.4.1	Wurzelwachstum	68
3.4.2	Al- und Kallosegehalte in Wurzelspitzen	69
3.4.3	Al-Gehalte von Wurzel und Sproß	71
3.5	Einfluß von Al auf die Exsudation organischer Säureanionen durch die Wurzel	72

3.6	Al-Verlagerung in den Blütenstand und Blaufärbung in Nährlösungskultur	74
3.6.1	Al-Gehalte	74
3.6.2	Beziehung zwischen Al-Gehalt und Farbe der Sepalen	77
3.7	Einflußfaktoren auf die Al-Verlagerung in die Sepalen	78
3.7.1	Blütenstandsgröße	78
3.7.2	Unterbrechung des Phloemtransports durch Ringelung	80
3.7.3	Transpiration	82
3.8	Bestimmung der Al-Konzentration im Vakuolensaft von Sepalen	83
4	DISKUSSION	86
4.1	Einfluß des Al-Angebots auf Al-Verlagerung und Blaufärbung verschiedener Sorten in Substratkultur	86
4.2	Einfluß von Al auf Wurzelmorphologie und Al-Lokalisation in der Wurzel	97
4.3	Einfluß der Al-Form auf Al-Aufnahme, -Verlagerung und -Toxizität	103
4.4	Einfluß eines kurzfristig niedrigen Al-Angebots auf die Induktion von Al-Resistenz	113
4.5	Einfluß von Al auf die Exsudation organischer Säureanionen durch die Wurzel	116
4.6	Al-Verlagerung in den Blütenstand und Blaufärbung in Nährlösungskultur	118
4.7	Einflußfaktoren auf die Al-Verlagerung in die Sepalen	121
4.7.1	Blütenstandsgröße	121
4.7.2	Unterbrechung des Phloemtransports durch Ringelung	122
4.7.3	Transpiration	124
4.8	Bestimmung der Al-Konzentration im Vakuolensaft von Sepalen	125
5	SCHLUSSBETRACHTUNG UND AUSBLICK	130
6	ZUSAMMENFASSUNG	138
7	LITERATURVERZEICHNIS	145
8	ANHANG	155

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Flächeninhalt
AD	Hortensiensorte ‘Adria’
Al	Aluminium
Al^{3+}	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$
Al_{mono}	monomeres Aluminium
BB	Hortensiensorte ‘Blauer Ball’
BL	Hortensiensorte ‘Bläuling’
BM	Hortensiensorte ‘Blaumeise’
BZ	Hortensiensorte ‘Blauer Zwerg’
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
CV	Variationskoeffizient
d	Tag
dm	Durchmesser
dt.	deutsch
EDXA	energy dispersive x-ray analysis (dt.: energiedispersive Röntgenmikroanalyse)
EELS	electron energy loss spectroscopy (dt.: Elektronen-Energie-Verlust-Spektroskopie)
EL	Hortensiensorte ‘Elbtal’
engl.	Englisch
ESI	electron spectroscopic imaging (dt.: Elektronenspektroskopische Darstellung)
FeEDDHA	Eisen-Ethylendiamindihydroxyphenylacetat
g	Gramm
$\text{GD}_T, 5\%$	Grenzdifferenz nach Tukey-Test, Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %
Gew.-%	Gewichtsprozent
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

ICP-OES	Induktiv gekoppeltes Plasma-Optische Emissions-Spektralanalyse
IPE	Institut für Pflanzenernährung
L	Liter
LK	Hortensiensorte 'LK 15'
m	Meter
M	Molarität (mol pro Liter)
min	Minute
mm	Millimeter
mM	millimolar (Millimol pro Liter)
n	Stichprobenanzahl
nm	nanometer
n. n.	nicht nachweisbar
n. s.	nicht signifikant
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PÄ	Pachymanäquivalente
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-2-di-ethansulphonsäure
r^2	Bestimmtheitsmaß
r_s	Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient
RS	Hortensiensorte 'Renate Steiniger'
RWWR	relative Wurzelwachstumsrate
s	Sekunde
TS	Trockensubstanz
vergl.	vergleiche
Vol.	Volumen
Vol.-%	Volumenprozent
xg	multipliziert mit Erdbeschleunigung
μ	micro
π	Zahl π
%	Prozent
+, *, **, ***	statistisch signifikant bei $p < 10, 5, 1, 0,1 \%$
<, >	kleiner, größer

1 EINLEITUNG

Aluminium (Al) ist für die meisten Pflanzenarten bereits in niedriger Konzentration toxisch. Die Hortensie (*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.) gehört als Al-Akkumulator zu den Pflanzenarten mit außerordentlich hoher Al-Resistenz. Ihre Fähigkeit zur Verlagerung großer Al-Mengen in die Blütenstände ist Voraussetzung für den Farbumschlag von rosa zu blau und trägt dadurch entscheidend zum ökonomischen Wert dieser Zierpflanze bei. Wünschenswert wäre ein besseres Verständnis der Physiologie von Al-Aufnahme und -Verlagerung dieses Al-Akkumulators, um in der Praxis immer noch auftretende Schwierigkeiten bei der Kultur von blauen Hortensien durch präzisere Steuerung des Al-Angebots zu verringern. Außerdem kommt der Erforschung der Ursachen für die ausgeprägte Al-Resistenz eine große Bedeutung zu, da Al-Toxizität für erhebliche Einbußen bei der Produktion von Nutzpflanzen auf sauren Böden verantwortlich ist. Durch die Züchtung von Al-resistenten Nutzpflanzen ließe sich der Ertrag auf diesen sauren Böden entscheidend steigern und die ackerbaulich nutzbare Fläche vergrößern. Immerhin bedecken saure Böden mit einem pH-Wert (H₂O) unter 5,5 weltweit 30 % der eisfreien und 12 % der ackerbaulich genutzten Fläche (von Uexküll und Mutert, 1995).

Insbesondere $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ (Al^{3+}) und $\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{+7}$ (Al_{13}) werden für die Al-Toxizität verantwortlich gemacht, während die Wirkung von $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ und $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ umstritten ist (Kinraide, 1991; 1997; Kochian, 1995; Parker *et al.*, 1989). Toxische Konzentrationen an gelöstem Al in der Bodenlösung treten aufgrund der geringen Löslichkeit von Al-Hydroxiden bei höheren pH-Werten erst bei pH-Werten unter 5,5 auf (Foy *et al.*, 1978; Lydersen *et al.*, 1991). Das auffälligste Symptom von Al-Toxizität ist die schnelle Hemmung des Wurzelwachstums (Horst *et al.*, 1992), die bei Mais bereits nach weniger als einer Stunde meßbar ist (Llugany *et al.*, 1995). Noch empfindlicher läßt sich die toxische Wirkung von Al bei vielen Pflanzenarten durch die Induktion von Kallose nachweisen (Wissemeier *et al.*, 1987; Llugany *et al.*, 1994; Wissemeier und Horst, 1995). Langfristig beeinträchtigt Al auch das Sproßwachstum durch Induktion von Wasser- und Nährstoffmangel (Mg, Ca, P).

Die physiologischen Ursachen von Al-Toxizität und -Resistenz konnten bisher noch nicht zufriedenstellend geklärt werden, obwohl Al-Toxizität bereits vor fast 100 Jahren beschrieben (Fluri, 1909; Hartwell und Pember, 1918) und intensive Forschungsarbeit auf diesem Gebiet geleistet wurde. Die Phytotoxizität von Al wird mit der starken

Affinität von Al zu Zellwandmaterial, Phospholipiden, anorganischem Phosphat, ATP, RNA, DNA, Carbonsäuren und Proteinen in Verbindung gebracht (Martin, 1988 und Referenzen darin). Untersuchungen zeigten Beeinträchtigungen der Zellteilung, Zellstreckung, Cytoskelettorganisation, Membranfunktionen, Ca-Homöostase, Signaltransduktion und des Stoffwechsels (Reviews und Referenzen darin: Kochian, 1995; Delhaize und Ryan, 1995; Horst, 1995; Matsumoto, 2000). Insbesondere die Beurteilung, welches primäre und welches sekundäre Effekte sind, bereitet Schwierigkeiten.

Aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen Al-Resistenz lassen sich Pflanzenarten, Genotypen oder Ökotypen in drei Gruppen einteilen (Foy *et al.*, 1978): Al-Exkluder, die Al a) von der Aufnahme in die Wurzel oder b) in den Sproß ausschließen, und c) Al-Akkumulatoren, die Al in den Sproß verlagern und in den Blättern Gehalte von mehr als 1 mg pro g Trockensubstanz aufweisen. Resistenzmechanismen können entsprechend des Ortes der Al-Detoxifikation oder -Immobilisation in externe und interne unterschieden werden (Taylor, 1988; 1991).

Externe Exklusionsmechanismen beruhen auf dem Ausschluß von Al aus dem Wurzelsymplasten. Als Ursachen werden diskutiert a) eine geringere Bindung von Al im Wurzelapoplasten durch geringere Kationenaustauschkapazität (Blamey *et al.*, 1990; Büscher *et al.*, 1990) und geringere Oberflächennegativität der Plasmamembran (Wagatsuma und Akiba, 1989; Wagatsuma *et al.*, 1997), b) eine Erhöhung des pH-Werts in der Rhizosphäre oder im Apoplasten (Taylor und Foy, 1985; Degenhardt *et al.*, 1998) und c) Komplexierung von Al durch Wurzelausscheidungen wie organische Säureanionen (Miyasaka *et al.*, 1991; Delhaize *et al.*, 1993; Basu *et al.*, 1994a; Pellet *et al.*, 1995; Ma, 2000), Mucigel (Horst *et al.*, 1982), Polypeptide (Basu *et al.* 1994b; 1999) oder Phosphat (Millard *et al.*, 1990; Pellet *et al.*, 1995).

Interne Toleranzmechanismen basieren auf der Detoxifizierung oder Immobilisierung von Al im Symplasten durch Komplexierung oder Bindung im Cytosol (Lee und Foy, 1986; Snowdon *et al.*, 1995), der Evolution Al-resistenter cytosolischer Enzyme und Erhöhung der Enzymaktivität (Slaski, 1989; 1990; Slaski *et al.*, 1996) und Kompartimentierung in der Vakuole (Jensen *et al.*, 1989; Vázquez *et al.*, 1999).

Die Vielzahl der diskutierten Al-Resistenzmechanismen spricht dafür, daß die Al-Resistenz unterschiedlicher Pflanzenarten auf unterschiedlichen Resistenzmechanismen beruht. Auch die Al-Resistenz einer Art könnte auf die Kombination verschiedener Mechanismen zurückzuführen sein (Pellet *et al.*, 1997). Übereinstimmend hiermit

wurden Hinweise für eine multigenische Basis der Al-Resistenz gefunden, zumindest bei Weizen und Roggen (Aniol und Gustafson, 1984; Snowdon *et al.*, 1995). Für die herausragende Al-Resistenz der Al-Akkumulatoren sind vermutlich neben Al-Exklusionsmechanismen besonders wirksame interne Toleranzmechanismen erforderlich. Obwohl theoretisch ein apoplastischer Transport in den Zellwänden der Wurzel bis zu den Xylemgefäßen und in die Blätter vorstellbar wäre, erscheint eine Al-Aufnahme in den Symplasten aufgrund der hohen tolerierten Al-Gehalte in Wurzel und Sproß und des entsprechend hohen Konzentrationsgradienten zwischen Apoplast und Symplast wahrscheinlich. Bei Al-Exkludern ist die Al-Aufnahme in den Symplasten insbesondere als Voraussetzung für primäre Toxizitätssymptome trotz zahlreicher Untersuchungen umstritten (Marienfeld und Stelzer, 1993; Tice *et al.*, 1992; Lazof *et al.*, 1994; 1996; Blamey *et al.*, 1993a; Horst, 1995; Rengel, 1996; Horst *et al.*, 1999). Zurückzuführen ist dies vor allem auf die ungenügende Sensitivität der verfügbaren Meßmethoden für cytosolisches Al. Bei Al-Akkumulatoren sprechen einige Untersuchungen für die Al-Aufnahme in den Symplasten und in die Vakuole (Haridasan *et al.*, 1986; Cuenca *et al.*, 1990; 1991; Guérin, 1998). Ob die hohen Al-Gewebegehalte tatsächlich mit einer erhöhten Al-Konzentration im Cytoplasma verbunden sind, ist fraglich. Obwohl die Konzentration an freiem Al^{3+} bei einem pH-Wert über 7,0 im Cytoplasma 10^{-10} M nicht übersteigen sollte, sind auch solche geringen Konzentrationen als phytotoxisch einzustufen (Martin, 1988). Hinsichtlich des Toleranzmechanismus von Al-Akkumulatoren deuten die NMR-Untersuchungen von Ma *et al.* (1997) in Hortensienblättern auf eine Detoxifizierung von Al durch Komplexbildung mit Citrat hin, während Watanabe *et al.* (1998) bei *Melastoma malabathricum* Oxalat und Nagata *et al.* (1992; 1993) bei Tee (*Camellia sinensis*) vor allem Catechine und Fluoride für die Entgiftung von Al verantwortlich machten.

Bezüglich des evolutionären Status von Al-Akkumulatoren fanden Chenery und Sporne (1976) einen positiven Zusammenhang zwischen der Al-Akkumulation und phylogenetisch ursprünglichen Merkmalen wie holzartigem Charakter und Zugehörigkeit zu evolutionär alten Familien. Besonders verbreitet sind Al-akkumulierende Familien in tropischen Regenwäldern (siehe auch Masunaga *et al.*, 1998), in denen weltweit die meisten ursprünglichen Pflanzen zu finden sind, und auf anderen sauren Böden (Haridasan, 1982; Britz *et al.*, 1997). Al-Akkumulatoren wurden in 37 Familien in 16 teilweise wenig miteinander verwandten Ordnungen gefunden (Chenery, 1948; Chenery und Sporne, 1976; Webb, 1954).

Hydrangea wird der Ordnung der *Saxifragales* zugeordnet (Fitschen, 1990). Der Blütenstand ist eine Doldenrispe aus unscheinbaren zentralen Blüten und peripheren Blüten mit kronblattartig vergrößerten, gefärbten Kelchblättern, den Sepalen. Entgegen der weit verbreiteten Meinung, die peripheren Blüten seien steril, wies Götze (1982) nach, daß beide Blütenarten gleichermaßen fertil sind. Beheimatet in Japan und China, wurde die Hortensie bereits 1789 in den Königlichen Botanischen Garten von Kew, London, eingeführt, und 1796 wurden blaue Blüten an einer zuvor rotblühenden Pflanze entdeckt (Curtis, 1799). Die Wirksamkeit von Al in Form von Alaun ($KAl(SO_4)_2$) für die Blaufärbung von Hortensien wurde schon 1821 vom Petersburger Hofgärtner Busch mitgeteilt und 1897 in den grundlegenden physiologischen Versuchen von Molisch bestätigt. Die Blaufärbung der Sepalen beruht auf der Komplexierung des rosafarbenen Anthocyanins Delphinidin-3-Gucosid mit Al (Chenery, 1937; Lawrence *et al.*, 1938; Storck, 1942; Allen, 1943), stabilisiert durch 3-Caffeoylchinasäure (Takeda *et al.*, 1985; 1990).

Trotz der langjährigen Tradition der Blaufärbung von Hortensien ist die Kultur von blauen Hortensien auch heute noch problematisch. Ein deutliches Indiz hierfür sind die schlechte Pflanzenqualität und die unzulängliche Blaufärbung der Sepalen der in vielen Gärtnereien und vor allem in Supermärkten zum Verkauf angebotenen Hortensien. Die Schwierigkeiten beruhen darauf, daß sich blaue Hortensien von guter Qualität nur innerhalb eines sehr engen pH-Wertbereichs zwischen 4,7 und 4,0 produzieren lassen. Bei höheren pH-Werten begrenzt die geringe Konzentration an löslichem Al in der Bodenlösung die Al-Aufnahme und -Verlagerung in die Blüten und führt zu mangelhafter Blaufärbung. Wird der pH-Wert des Substrats durch Al-Sulfatbehandlung unter 4,0 abgesenkt, erreichen Protonen- und Al-Konzentrationen in der Bodenlösung toxische Werte und führen aufgrund von Wurzelschäden zu schlechter Pflanzenqualität und unbefriedigender Blaufärbung (Horst *et al.*, 1993; Weithmann *et al.*, 1994). Für die Absenkung auf einen definierten pH-Wert sind bei verschiedenen Substraten sehr unterschiedliche Mengen an Al-Sulfat erforderlich. Am Institut für Pflanzenernährung (IPE) der Universität Hannover wurde eine Strategie entwickelt, durch die der Bedarf an Al-Sulfat zur Absenkung des pH-Werts von Substraten bereits vor Kulturbeginn abgeschätzt werden kann (Weithmann *et al.*, 1995; Horst und Weithmann, 1997; Weithmann und Horst, 1997).

Um Al-Aufnahme und -Verlagerung der Hortensie und den Zusammenhang mit Blaufärbung und Al-Toleranz näher zu charakterisieren, wurde folgende Vorgehensweise gewählt.

In praxisnahen Versuchen in Substratkultur sollte die Blaufärbbarkeit verschiedener Hortensiensorten und die Eignung der Strategie IPE zur Blaufärbung dieser Sorten überprüft werden (2.2.1, 3.1, 4.1). Die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Al-Angebot, pH-Wert des Substrats, Al-Verlagerung in die Sepalen und deren Blaufärbung sollte zum besseren Verständnis der die Blaufärbung bestimmenden Faktoren beitragen. Unterschiedlich leicht blau zu färbende Sorten wurden ausgewählt, um den Al-Transport und mögliche Al-detoxifizierende organische Säuren im Xylemsaft näher zu untersuchen. Im Rahmen einer Kooperation wurde dieser Xylemsaft zur weiteren Charakterisierung der Al-Spezies mittels Kat- und Anionenchromatographie dem Institut für anorganische Chemie der Universität Hannover zur Verfügung gestellt (Busch, 2001).

Für Al-Aufnahme, -Verlagerung, -Resistenz und Blaufärbung als besonders wichtig betrachtete Aspekte wurden ausgewählt, um sie in weiterführenden Versuchen vertiefend zu betrachten. Diese Versuche wurden in Nährlösungskultur durchgeführt, sofern nichts anderes angegeben ist.

Die bei weniger Al-resistenten Pflanzenarten nach Al-Behandlung beobachteten erheblichen morphologischen Wurzelveränderungen gaben Anlaß, deren Vorkommen und Ausprägung bei der Hortensie mittels Licht- und Elektronenmikroskopie sowie Elektronenspektroskopischer Darstellung zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere ihre Bedeutung für Al-Toxizität, -Resistenz und -Aufnahme erkundet werden (2.2.2, 3.2, 4.2).

Um die Bedeutung der Komplexbildung von Al mit organischen Säuren für Al-Toxizität, -Aufnahme und -Verlagerung zu beurteilen, wurden Al-Malat und -Citrat im Vergleich zu Al-Chlorid in der Nährlösung angeboten (2.2.3, 3.3, 4.3).

Ob es sich bei der Al-Resistenz der Hortensie um ein induzierbares Merkmal handelt, sollte durch eine vorangehende Behandlung der Stecklinge bei niedriger und folgender Behandlung bei höherer Al-Konzentration geklärt werden (2.2.4, 3.4, 4.4).

Da die Ausscheidung organischer Säureanionen als mögliche Ursache für die große Al-Resistenz in Betracht zu ziehen ist, wurde überprüft, ob die ausgeschiedenen Mengen

für eine Entgiftung des Al in der Rhizosphäre verantwortlich sein können (2.2.5, 3.5, 4.5).

Sortenunterschiede bei der Ausscheidung organischer Säureanionen könnten pH-Werte und somit die Al-Verfügbarkeit im Substrat beeinflussen und für unterschiedliche Al-Verlagerung in die Sepalen und Blaufärbbarkeit der Sorten verantwortlich sein. Deshalb wurde untersucht, ob derartige Sortenunterschiede auch in Nährlösung bei kontrolliertem pH-Wert und identischer Al-Verfügbarkeit nachzuweisen sind (2.2.6, 3.6, 4.6).

Da die Verlagerung von Al in die Blütenstände vom Entwicklungsstadium des Blütenstands abhängt und sowohl mittels Phloem- als auch mittels Xylemtransport erfolgen könnte, wurde der Einfluß der Blütenstandsgröße, einer Phloemunterbrechung (in Substrat- und Nährlösungskultur) und der Variation der Transpiration auf die Al-Verlagerung in Blütenstände bestimmt (2.2.7, 3.7, 4.7).

Um zu überprüfen, ob die Kompartimentierung von Al für die Al-Toleranz der Hortensie verantwortlich ist, sollte die Al-Konzentration im mittels modifizierter Druckmeßsondenmethode entnommenen Vakuolensaft mit Energiedispersiver Röntgenmikroanalyse bestimmt werden. Zur Abschätzung, inwieweit die Al-Verlagerung in die Vakuole zu Sortenunterschieden bei der Blaufärbbarkeit beiträgt, wurden erste orientierende Untersuchungen an Pflanzen aus Substratkultur durchgeführt (2.2.8, 3.8, 4.8).

Die durchgeführten Versuche lassen sich also acht Versuchskomplexen zuordnen, deren Versuchsdurchführungen jeweils in den Kapiteln 2.2.1-2.2.8, Ergebnisse in 3.1-3.8 und Diskussionen in 4.1-4.8 zu finden sind. Alle unterschiedlichen Versuche hatten das eine Ziel, das bislang lückenhafte Bild von den Zusammenhängen zwischen Al-Aufnahme, -Verlagerung, Blaufärbung und Al-Toleranz bei der Hortensie zu ergänzen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Pflanzenmaterial und Kulturbedingungen

2.1.1 Hortensiensorten

Im Rahmen der durchgeführten Versuche wurden Ballhortensien der Sorten 'LK15' (LK), 'Renate Steiniger' (RS), 'Adria' (AD), 'Blauer Zwerg' (BZ), 'Elbtal' (EL) und 'Blauer Ball' (BB) und Tellerhortensien der Sorten 'Blaumeise' (BM) und 'Bläuling' (BL) verwendet. Ball- und Tellerhortensien sind hier jeweils nach abnehmender Intensität des Blaus ihrer Sepalen aufgeführt. In der Praxis und früheren Versuchen hat sich gezeigt, daß 'Renate Steiniger' sehr leicht, 'Adria' leicht bis mittelleicht und 'Blauer Ball' nur schwer blau zu färben ist.

2.1.2 Substratkultur

Die bewurzelten Stecklinge (Kötterheinrich, Lengerich; Rampp, Pfaffenhausen) wurden in der 22. Woche 1997 in ein Torfsubstrat mit 30 % Ton, 1,5 kg PG-Mix (14:16:18), 50 g Flory 10 und 20 g Optifer (5 % Fe) pro m³ Substrat (Balster, Fröndenberg) in 1,5 L Container (BC 15 Teku, Pöppelmann Kunststoff-Technik GmbH & Co KG, Lohne) getopft und am 25. 06. gestutzt. Die Pflanzen standen zunächst im Gewächshaus bei 20 °C Heiztemperatur, 25 °C Lüftungstemperatur, ab dem 09. 07. in offenen Frühbeetkästen und ab dem 16. 10. 1997 bei 3 °C Heiztemperatur, 5 °C Lüftungstemperatur im Gewächshaus. Zu Beginn der Treiberei, am 07. 01. 1998, betrug die Temperatur tagsüber 18 °C, nachts 22 °C. Durch die negative Differenz zwischen der Tag- und Nachttemperatur sollte das Wachstum der Pflanzen reduziert und eine Behandlung mit Wachstumsregulator überflüssig werden. Ab 10. 03. wurde die Temperatur auf 16 °C tagsüber und 18 °C nachts abgesenkt, um eine intensivere Ausfärbung der Sepalen zu erzielen. Die Bewässerung erfolgte mittels Gießgerät von oben in den Topf mit Leitungswasser (Härtegrad 8 °dH). Gedüngt wurde wöchentlich mit 100 mL einer 0,33 %igen Flory 9 Lösung (15:17:22:6) pro Topf, zehnmal nach dem Topfen und während der gesamten Treiberei, zusätzlich am 17. 06. 1997 mit 100 mL einer 0,01 %igen Fetrilonlösung. Die durchgeführten Pflanzenschutzmaßnahmen sind in Tab. 2.1 aufgelistet.

Tab. 2.1: Pflanzenschutzmaßnahmen im Kulturjahr 1997/98.

Schaderreger	Pflanzenschutzmittel	Konzentration [%]	Datum der Maßnahme
Echter Mehltau	Saprol	0,1	07. 07. 97
Echter Mehltau	Euparen	0,25	22. 07. 97
Echter Mehltau	Saprol	0,1	22. 08. 97
Echter Mehltau	Saprol	0,1	02. 09. 97
Echter Mehltau, Grauschimmel	Euparen	0,5	17. 09. 97
Grauschimmel	Sumisclax	0,075	30. 09. 97
Grauschimmel	Ronilan	0,1	07. 10. 97
Blattläuse	Pirimor	0,05	23. 12. 97
Blattläuse	Metasystox R	0,5	03. 02. 98
Spinnmilben	Vertimec	0,025	11. 02. 98

Zur gezielten pH-Wert-Steuerung im Versuch wurde die Pufferfähigkeit des Substrats ermittelt. Hierzu wurden jeweils 250 mL Substrat mit 50 mL unterschiedlich konzentrierter $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung versetzt und so 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16 g $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O}$ (L Substrat)⁻¹ appliziert. Nach zwei Wochen im Dunkeln wurden Substratextrakte mit deionisiertem Wasser und 0,01 M CaCl_2 hergestellt und die pH-Werte gemessen (2.3.1). Wie in Abb. 2.1 zu sehen ist, wurde der in Wasser gemessene pH-Wert des Substrats durch ein Al-Sulfatangebot von 16 g (L Substrat)⁻¹ von 5,8 auf 3,8 abgesenkt. Der in CaCl_2 gemessene pH-Wert lag ohne Al-Behandlung um 0,4 pH-Werteinheiten tiefer und näherte sich mit abnehmendem pH-Wert an den in Wasser gemessenen pH-Wert an. Bei der höchsten Al-Behandlung war der Unterschied mit 0,1 pH-Werteinheiten vernachlässigbar.

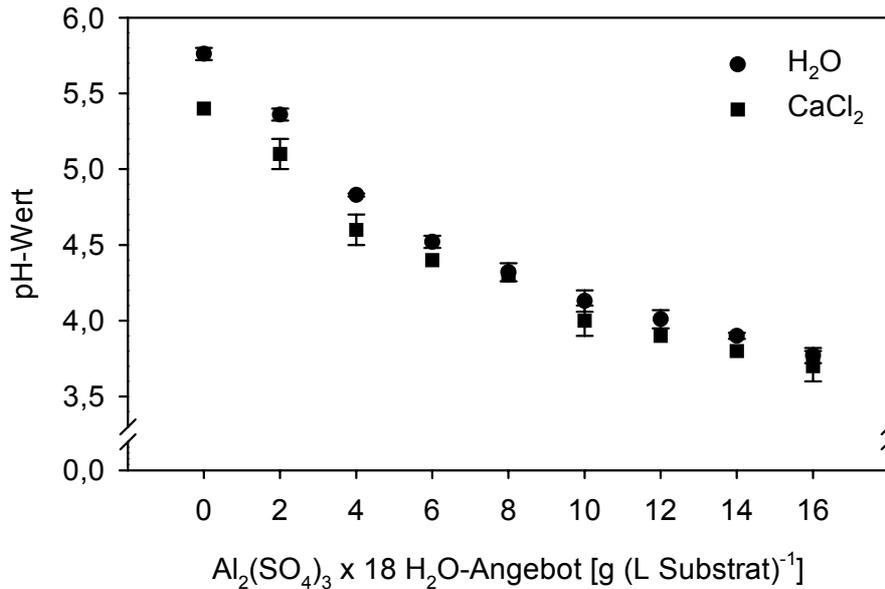


Abb. 2.1: pH-Werte des Substrats nach Applikation steigender Mengen an $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{H}_2\text{O}$ (Al-Sulfat-, Pufferkurve“), Extraktionsmittel: deionisiertes Wasser (H_2O), 0,01 M CaCl_2 .

2.1.3 Nährlösungskultur

Mutterpflanzen der Sorten ‘Renate Steiniger’, ‘Adria’ und ‘Blauer Ball’ wurden aus Stecklingen herangezogen. In Abhängigkeit vom Biomassezuwachs wurden von den Mutterpflanzen ca. alle 2 Monate Kopfstecklinge geschnitten. Zur Aufrechterhaltung der vegetativen Wachstumsphase der Mutterpflanzen wurden eine hohe Temperatur von 25 °C gewählt und bei jedem Stecklingschnitt alle Triebe auf 1-2 Blattpaare zurückgeschnitten. Die Stecklinge bestanden aus einer Blattknospe und einem zweiten, auf 1 cm Länge eingekürzten Blattpaar. Die Bewurzelung erfolgte in 10 x 10 Kreuzschlitzen (Länge: 0,5 x 0,5 cm, Abstand: 2 cm) in schwarzer Plastikfolie, gespannt über belüfteter Nährlösung in 22-L-PVC-Eimern mit 18 L Nährlösung, bei natürlicher Photoperiode im Gewächshaus. Über diese Eimer war eine lichtdurchlässige Folie mit Belüftungsschlitzen gespannt. Die Basisnährlösung wies folgende Zusammensetzung auf (μM): 1000 KNO_3 , 325 MgSO_4 , 250 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 100 KH_2PO_4 , 100 NaCl , 60 FeEDDHA , 8 H_3BO_3 , 5 MnSO_4 , 0,2 ZnSO_4 und 0,2 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$. Nach einem Monat wurden die bewurzelten Stecklinge in PVC-Platten mit 50 Löchern von 2 cm Durchmesser auf Maurerkübeln mit 65 L Nährlösung vereinzelt. In Abb. 2.2 sind die Stecklinge nach dem Schneiden, nach 7wöchiger und 3monatiger Bewurzelung in Nährlösung zu sehen.

Für die Versuche wurde die Basisnährlösung in folgender Weise zur Versuchsnährlösung modifiziert: Da Al nur bei niedrigem pH-Wert in pflanzenverfügbarer, toxischer Form vorliegt, wurde der pH-Wert der Nährlösung zur Adaptation der Pflanzen bereits einige Tage vor Beginn der Al-Behandlung auf 4,3 abgesenkt und mit einer pH-Stat-Anlage konstant gehalten. Außerdem wurde die P-Konzentration von 100 auf 30 μM reduziert, um das Risiko des Ausfallens von Al-Phosphat zu vermindern. Voraussetzung für die Detektion frühzeitig eluierter organischer Säuren im Xylemsaft bei der HPLC-Analyse ist eine niedrige NO_3 -Konzentration. Deshalb wurde KNO_3 durch KCl ersetzt. Alle Versuche wurden in einer Klimakammer bei 25 °C, 80 % Luftfeuchtigkeit und einer Photonenflußdichte von 230 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetisch aktiver Strahlung während der 18stündigen Tagphase durchgeführt, sofern bei der jeweiligen Versuchsdurchführung nichts anderes angegeben ist.



Abb. 2.2: Stecklinge nach dem Schneiden, 5wöchiger und 3monatiger Bewurzelung in Nährlösung.

2.2 Versuchsdurchführungen

2.2.1 Einfluß des Al-Angebots auf Al-Verlagerung und Blaufärbung verschiedener Sorten in Substratkultur

Durch Variation des Al-Sulfatangebots sollten neben einer unbehandelten Kontrolle pH-Werte (2.3.1) von 5,0, 4,5 und 4,0 eingestellt und so die Al-Verfügbarkeit für die Pflanzen modifiziert werden. Ziel des Versuchs war, das Optimum der Al-Sulfat-

Dosierung bezüglich Al-Verlagerung und Blaufärbung für die acht verschiedenen Sorten: 'LK15', 'Blaumeise', 'Renate Steiniger', 'Adria', 'Bläuling', 'Blauer Zwerg', 'Elbtal' und 'Blauer Ball' zu ermitteln. Insbesondere die Bedeutung organischer Säuren im Xylemsaft für Al-Verlagerung und -Detoxifizierung sollte näher untersucht werden. Die zur Einstellung der pH-Werte benötigten Al-Sulfat-Gaben wurden aus der Al-Pufferkurve abgelesen (Abb. 2.1). Mengen und Zeitpunkte der Ausbringung im Kulturverlauf sind aus Tab. 2.2 zu ersehen. Zur Kontrolle der pH-Werte im Substrat während der Kultur wurden mit einem Korkbohrer (\varnothing 1,3 cm) Substratproben in 1 cm Entfernung vom Topfrand entnommen.

Tab. 2.2: Mengen und Termine der Al-Sulfat-Gaben zur Einstellung der Ziel-pH-Werte im Substrat

Ziel-pH-Wert	Al-Angebot	Al-Angebot	Al-Angebot	Al-Angebot:
	zur Vorkultur ^a	vor der Treiberei ^b	zur Treiberei ^c	insgesamt
g $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{H}_2\text{O}$ (L Substrat) ⁻¹				
Kontrolle	-	-	-	-
5,0	-	1	4 x 0,5	3
4,5	1 x 2 [*]	2	4 x 0,5	6
4,0	3 x 2	4	4 x 0,5	12

a: 11.09.* / 26. 09. / 22. 10. 1997

b: 06.01. 1998

c: 15. 01. / 22. 01 / 29. 01. / 05. 02. 1998

Der Versuch wurde als Split-Plot-Anlage mit Al-Angebot als Großparzellenfaktor und Sorte als Kleinparzellenfaktor in 4 Blöcken angelegt (Abb. 2.3). Die Anzahl der Pflanzen pro Al-Angebotsstufe, Sorte und Block betrug fünf. Vor der Ernte wurde die Blütenfarbe aller Pflanzen visuell von 1 = rosa bis 6 = blau bonitiert (2.3.2). Für weitere Untersuchungen wurde pro Sorte, Al-Variante und Block jeweils eine repräsentative Pflanze ausgewählt. Die Farbe von fünf für diese Pflanze repräsentativen Sepalen wurde mit einem Farbmeßgerät gemessen (2.3.3), das Frischgewicht der oberirdischen Pflanzenteile gewogen und Sepalen einer repräsentativen Dolde für die Mineralstoffanalyse getrocknet. Bei der Farbmessung wurde darauf geachtet, daß die fünf Sepalen nicht nur repräsentativ für die mittlere Farbe der Pflanze sind, sondern auch die unterschiedliche Ausfärbung der Sepalen an einer Pflanze widerspiegeln. Auf alle abgeschnittenen Sproßreste wurden Pipettenspitzen aufgesetzt und für 1 ½ h Xylemsaft (2.3.4) zur Analyse von organischen Säuren (2.3.9), Mineralstoffen (2.3.7) und pH-

Wertmessung (2.3.1) gesammelt. Zur Spezifikation von Al im Xylemsaft erfolgten Berechnungen mit dem Programm GEOCHEM-PC (2.3.10). Ca. 1/8 Tortenstück aus dem Wurzelballen wurde gesiebt (Maschenweite: 5 mm), mit deionisiertem Wasser extrahiert und der pH-Wert bestimmt (2.3.1). Alle mit Al behandelten Versuchsvarianten wurden fotografiert (RSX 100, Agfa Deutschland, Köln).

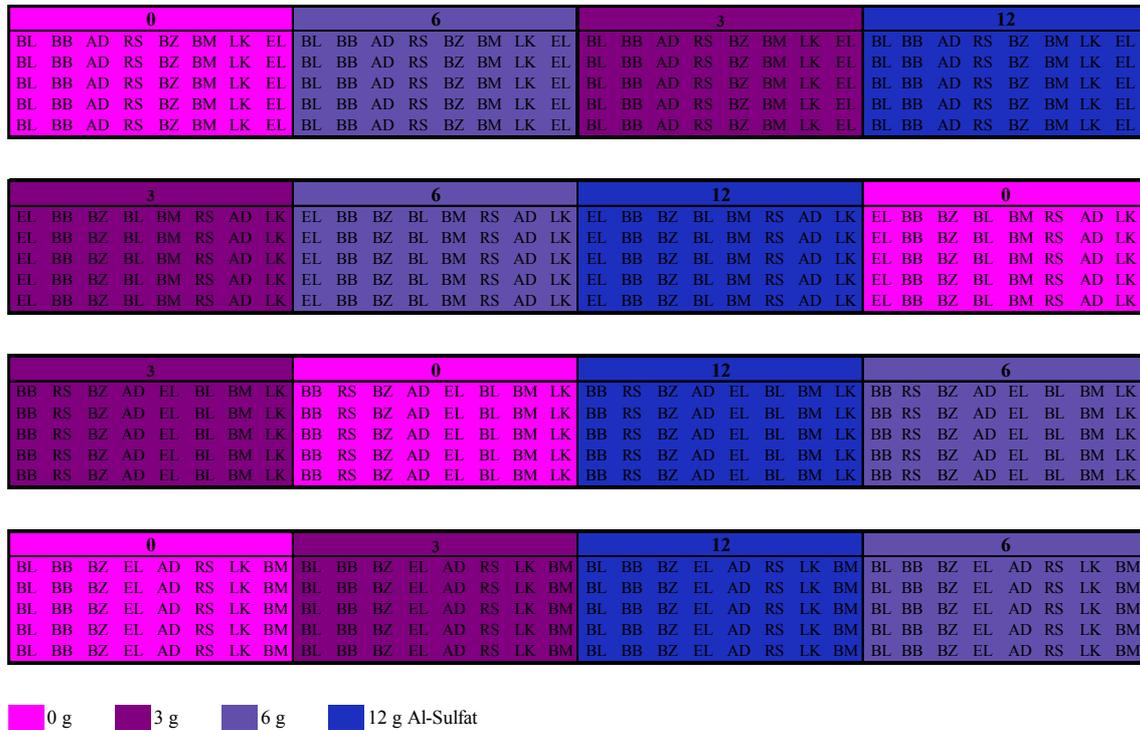


Abb. 2.3: Versuchsplan für den Versuch 2.2.1: Einfluß des Al-Angebots auf Al-Verlagerung und Blaufärbung verschiedener Sorten in Substratkultur. Split-Plot-Anlage mit Al-Angebot (g Al(SO₄)₃ x 18 H₂O (L Substrat)⁻¹) als Großparzellenfaktor und Sorte als Kleinparzellenfaktor in 4 Blöcken. Abkürzungen für die Hortensiensortennamen: LK ‘LK15’, BM ‘Blaumeise’, RS ‘Renate Steiniger’, AD ‘Adria’, BL ‘Bläuling’, BZ ‘Blauer Zwerg’, EL ‘Elbtal’ und BB ‘Blauer Ball’.

2.2.2 Einfluß von Al auf Wurzelmorphologie und Al-Lokalisation in der Wurzel

Stecklinge der Sorte ‘Renate Steiniger’ wurden für 5 bzw. 13 Wochen in der Basisnährlösung bewurzelt. Im folgenden werden die Stecklinge nach 5wöchiger Bewurzelung als jüngere, nach 13wöchiger Bewurzelung als ältere Stecklinge bezeichnet. Nach einer Adaptation an einen pH-Wert von 4,3 für 24 h erfolgte die Inkubation für 3 Tage in der Versuchsnährlösung (2.1.3) mit 0 bzw. 500 µM AlCl₃.

Von je drei der jüngeren Stecklinge ohne bzw. mit Al-Behandlung wurden fünf 1 cm lange Wurzelspitzen abgeschnitten. Je fünf Wurzeln von drei der älteren Stecklinge ohne bzw. mit Al-Behandlung wurden beginnend an der Wurzelspitze jeweils in acht 1 cm lange Abschnitte zerteilt. Von den Wurzelstücken wurden nach Einbettung in Epoxyharz für licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Hilfe eines Mikrotoms Dünnschnitte hergestellt (2.3.11). Mittels Elektronen-Energie-Verlust-Spektroskopie (EELS) und Elektronen-Spektroskopischer-Abbildung (ESI) erfolgte die Lokalisation von Al, P, S und Ca auf ultrastrukturellem Level (2.3.12).

2.2.3 Einfluß der Al-Form auf Al-Aufnahme, -Verlagerung und -Toxizität

Vier Monate alte bewurzelte Stecklinge wurden drei Tage vor Versuchsbeginn aus der Basisnährlösung in Nährlösung mit KCl anstelle von KNO_3 und einer auf 30 μM reduzierten P-Konzentration überführt. Das Wurzelvolumen wurde durch Tauchwägung ermittelt. Die Pflanzen wurden gleichmäßig nach ihrer Größe auf die vier verschiedenen Versuchsvarianten verteilt. Innerhalb eines Tages wurde der pH-Wert auf 4,3 bzw. 6,0 abgesenkt.

Zur Herstellung der vier Nährlösungsvarianten mit 500 μM Al als Chlorid (pH-Wert 4,3), Citrat (pH-Wert 4,3) und Malat (pH-Werte 4,3 und 6,0) wurde eine 500 mM AlCl_3 -Stammlösung (Fluka 06232, Buchs, Schweiz) angesetzt. Citronensäure-Monohydrat (Merck K 16624644, Darmstadt) für 50 mM und L(-)Äpfelsäure (M 1000, Sigma, Steinheim) für 75 mM im Endvolumen wurden zunächst in einem Teil des deionisierten Wassers gelöst, dann mit AlCl_3 -Stammlösung für 50 mM im Endvolumen versetzt und auf das Endvolumen aufgefüllt. Außerdem wurde eine 50 mM AlCl_3 -Lösung hergestellt.

Nährlösung wurde mit diesen AlCl_3 -, Al-Citrat- und Al-Malat-Lösungen versetzt, so daß die Al-Konzentration jeweils 500 μM betrug. Der pH-Wert in allen Lösungen wurde auf 4,3 und in einer Malat-Variante zusätzlich auf 6,0 eingestellt. Zur Unterstützung der Komplexbildung zwischen Al und den organischen Säuren wurden alle Nährlösungen über Nacht gerührt, und zwar bei 1 °C, um die Vermehrung von Mikroorganismen zu vermeiden. Vor Versuchsbeginn wurde die Nährlösung wieder auf Zimmertemperatur temperiert.

Pro Nährlösungsvariante wurden in je zwei 5-L-Töpfen je zwei Stecklinge der Sorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' kultiviert. Vor Beginn der zweitägigen Al-

Behandlung wurde die Tauchwägung wiederholt. Nach 47stündiger Al-Behandlung wurde der Sproß in drei Teilen (apikal, medial, basal) geerntet und für 1 ½ h Xylemsaft gesammelt. Anschließend wurden erneut eine Tauchwägung durchgeführt, Wurzelspitzen zur Bestimmung des Kallose- und Al-Gehalts geerntet und das restliche Wurzelsystem für die Mineralstoffanalyse getrocknet.

Zur Ermittlung der Al-Spezies in den Nährlösungen wurden vor und nach der Al-Behandlung aus allen Töpfen Proben genommen. Die Nährlösung wurde zur Entfernung von ausgefallenem, partikulärem Al durch Cellulose-Acetatfilter filtriert und die Konzentration an gelöstem Al mittels ICP gemessen. Die Bestimmung des monomeren Al erfolgte mit Aluminon (2.3.7). Zusätzlich wurden Berechnungen zur Spezifizierung von Al mit dem Programm GEOCHEM-PC durchgeführt.

2.2.4 Einfluß eines kurzfristig niedrigen Al-Angebots auf die Induktion von Al-Resistenz

Drei Monate alte bewurzelte Stecklinge der Sorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' wurden nach 2tägiger Adaptation an den niedrigen pH-Wert von 4,3 zunächst für eine Woche mit 0, 25 und 50 µM AlCl₃ vorbehandelt. Anschließend wurde das Angebot auf 500 µM erhöht. Die Stecklinge wurden ihrer Größe nach gleichmäßig auf die vier Varianten verteilt: 0/0, 0/500, 25/500 und 50/500 µM Al in der 1. Woche / 2. Woche. Pro Variante wurden in jedes der drei 22 L fassenden Nährlösungsgefäße vier Stecklinge der Sorte 'Renate Steiniger' und drei der Sorte 'Blauer Ball' eingesetzt. Zur Ermittlung des Wurzelwachstums wurde das Wurzelvolumen der Sorte 'Renate Steiniger' vor Beginn der Vorbehandlung mit 0, 25, 50 µM Al, vor Beginn der Behandlung mit 500 µM Al und nach 4 bzw. 7 Tagen bei 500 µM Al durch Tauchwägung erfaßt (2.3.5). Vor Beginn des hohen Al-Angebots und 24 h danach wurden Wurzelspitzen der Sorten 'Renate Steiniger' (nur von einer Pflanze pro Nährlösungsgefäß, um bei den drei übrigen eine mögliche Beeinflussung der Al-Aufnahme durch Entfernung der Wurzelspitzen zu vermeiden) und 'Blauer Ball' (von allen Pflanzen) zur Bestimmung der Al- und Kallosegehalte geerntet (2.3.7, 2.3.8). Wurzel und Sproß der Sorte 'Blauer Ball' wurden nach 24 h hohem Al-Angebot für die Al-Bestimmung (2.3.7) getrocknet. Nach einer Woche hohem Al-Angebot wurden für die Bestimmung von Al- und Kallosegehalten Wurzelspitzen von den neun Stecklingen der Sorte 'Renate Steiniger' verwendet, die zuvor noch nicht beerntet worden waren.

2.2.5 Einfluß von Al auf die Exsudation organischer Säureanionen durch die Wurzel

Nach dreimonatiger Bewurzelung im Gewächshaus wurden die Stecklinge in eine Klimakammer umgesetzt. Der pH-Wert der Nährlösung wurde innerhalb von 24 h von 5,0 auf 4,3 abgesenkt. Die drei folgenden Tage sollten eine Adaptation der Pflanzen an diesen niedrigen pH-Wert ermöglichen. Die Inkubation von je 6 Pflanzen erfolgte in Nährlösung mit 0 bzw. 500 μM AlCl_3 . 0, 4, 24 und 48 h nach Beginn der Al-Behandlung wurden die Stecklinge zur Entfernung von anhaftendem Al und Verunreinigungen zweimal in 100 μM CaCl_2 gespült und jeweils für 2 h in 500 mL 100 μM CaCl_2 überführt. Die CaCl_2 -Lösung wurde belüftet und der pH-Wert durch eine pH-Stat-Anlage konstant auf 4,3 gehalten. Bis zur Bestimmung der durch die Wurzeln exsudierten organischen Säuren wurde diese Lösung bei -20°C gelagert. Nach dem Sammeln der Wurzelexsudate wurden die Stecklinge in die Nährlösung mit bzw. ohne Al zurückgesetzt. Die tatsächliche Al-Behandlungsdauer betrug somit 0, 4, 22 und 44 h.

2.2.6 Al-Verlagerung in den Blütenstand und Blaufärbung in Nährlösungskultur

Circa 20 cm lange Stecklinge mit induzierten Blütenknospen wurden zur Bewurzelung im Gewächshaus bei 18°C in Basisnährlösung kultiviert. Nach 4 Monaten wurden die nun blühenden bewurzelten Stecklinge in eine Klimakammer in die Versuchsnährlösung umgesetzt und der pH-Wert im Verlauf eines Tages auf 4,2 abgesenkt. Jeweils 4 Stecklinge der Sorten 'Renate Steiniger', 'Adria' und 'Blauer Ball' wurden für 0, 2, 5, 10 und 15 Tage mit 500 μM AlCl_3 behandelt. Die Al-Behandlung erfolgte in acht 22 L Nährlösung fassenden Gefäßen mit je zwei Stecklingen der drei Sorten. Bei jeder Ernte wurde aus vier Nährlösungsgefäßen jeweils ein Steckling der drei Sorten entnommen. Die Stecklinge wurden bei Versuchsbeginn so sortiert, daß die Stecklingsblüten der drei Sorten in einem Nährlösungsgefäß zum jeweiligen Erntetermin möglichst ähnlich weit aufgeblüht waren. Vor der Ernte erfolgte eine visuelle Bonitur der Sepalenfarbe (2.3.2). Für die Mineralstoffanalyse wurden jedes Blattpaar und jedes Internodium, die Rispenäste erster und zweiter Ordnung und die Sepalen getrennt getrocknet. Die Zählung der Blattpaare und Internodien begann basal mit 1.

2.2.7 Einflußfaktoren auf die Al-Verlagerung in die Sepalen

2.2.7.1 Blütenstandsgröße

Die Pflanzen der Sorte 'Renate Steiniger' wurden im Kulturjahr 1999/2000 entsprechend der für das Kulturjahr 1997/1998 in den Kapiteln 2.1.2 und 2.2.1 gegebenen Beschreibung kultiviert. Der pH-Wert des Substrats wurde durch Al-Behandlung mit insgesamt $10 \text{ g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O (L Substrat)}^{-1}$ auf 3,8 abgesenkt, davon wurden je 2 g am 09. und 22. 09. 1999 während der Vorkultur und 6 g am 11. 01. 2000 vor Beginn der Treiberei appliziert. Am 20. 03. erfolgte die Ernte von 20 möglichst unterschiedlich großen Blütenständen für die Mineralstoffanalyse.

2.2.7.2 Unterbrechung des Phloemtransports durch Ringelung

Der Einfluß einer Phloemunterbrechung durch Ringelung auf die Al-Verlagerung in die Sepalen wurde an Pflanzen in Substratkultur und in Nährlösungskultur untersucht.

Substratkultur:

Die Pflanzen der Sorte 'Renate Steiniger' wurden im Kulturjahr 1999/2000 entsprechend der für das Kulturjahr 1997/1998 in den Kapiteln 2.1.2 und 2.2.1 gegebenen Beschreibung kultiviert. Der pH-Wert des Substrats wurde durch Al-Behandlung mit insgesamt $4 \text{ g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O (L Substrat)}^{-1}$ auf 4,7 abgesenkt, davon wurden 2 g am 22. 09. 1999 während der Vorkultur und 2 g am 11. 01. 2000 vor Beginn der Treiberei appliziert. Für den Versuch wurden 6 Pflanzen ausgewählt, die 2 Blütenstände in ähnlichem Entwicklungsstadium mit einem maximalen Durchmesser zwischen 5 und 12 cm aufwiesen. Unter jeweils einer dieser Blüten wurde der Stengel durch Behandlung mit heißem Wasserdampf geringelt, um den Phloemtransport zu unterbrechen (2.3.14). Anschließend erfolgte die Behandlung aller Töpfe mit $1 \text{ g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O (L Substrat)}^{-1}$ gelöst in 80 mL deionisiertem Wasser zur Maximierung der Al-Aufnahme während des 7tägigen Versuchszeitraums.

Nährlösungskultur:

Stecklinge wurden für 4 Monate in Nährlösung bewurzelt (2.1.3), anschließend 4 Monate zur Blüteninduktion einer niedrigeren Temperatur von 16 °C Heiztemperatur bzw. 18 °C Lüftungstemperatur im Gewächshaus ausgesetzt und dann 6 Monate bei 4 °C in einer Klimakammer bei 75 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert, davon die ersten 2 Monate mit 12stündiger Tag- und Nachtphase und die letzten 4 Monate ohne Licht. Um die Pflanzen in ein möglichst ähnliches Vegetationsstadium zu bringen,

wurden sie 28 bis 6 Tage vor Versuchsbeginn in eine wärmere Klimakammer mit einer Tages- bzw. Nachttemperatur von 23 bzw. 21 °C umgesetzt. Alle Seitentriebe wurden entfernt, so daß alle Pflanzen einen Trieb mit einem terminalen Blütenstand aufwiesen. Für den Versuch wurden 12 Pflanzen der Sorte 'Renate Steiniger', 8 der Sorte 'Adria' und 10 der Sorte 'Blauer Ball' verwendet. Je zwei Pflanzen mit ähnlich weit aufgeblühten Blütenständen von jeder der drei Sorten wurden in vier 22 L fassende Nährlösungsgefäße gesetzt, in ein fünftes Nährlösungsgefäß 4 Pflanzen der Sorte 'Renate Steiniger' und 2 der Sorte 'Blauer Ball'. Nach 2tägiger Adaptation an den niedrigen pH-Wert von 4,3 wurden pro Sorte und Gefäß die Hälfte der Pflanzen unter dem Blütenstand geringelt. Anschließend folgte eine 5tägige Behandlung mit 500 µM AlCl₃.

Sowohl in Substrat- als auch in Nährlösungskultur wurde die Farbe aller Blütenstände vor dem Ringeln und vor der Ernte bonitiert (2.3.2), fotografisch mit einer Digitalkamera (Olympus, Tokyo, Japan) dokumentiert und der Durchmesser der Blütenstände an der breitesten Stelle und senkrecht dazu gemessen. Für die Mineralstoffanalyse wurden die Sepalen, die Doldenstiele und ein 2,5 cm langes Stück Stengel unter der Ringelstelle geerntet.

2.2.7.3 Transpiration

Jeweils eine dreijährige Hortensienpflanze der Sorte 'Renate Steiniger' und 'Adria' erhielten eine Al-Behandlung mit je 2 g am 09. und 22. 09. 1999 während der Vorkultur und 4 g am 11. 01. 2000 vor Beginn der Treiberei. An jeder Pflanze wurden viermal drei ähnlich weit aufgeblühte Blütenstände ausgewählt. Jeweils einer der drei Blütenstände wurde in eine durchsichtige Plastiktüte mit einigen Schlitzen gesteckt, um die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen und dadurch die Transpiration zu vermindern. Jeweils ein weiterer Blütenstand wurde ebenso eingetütet. Zusätzlich wurden 15 g Silikagel in einem Teefilterbeutel hineingegeben und jeden Tag durch getrocknetes ausgetauscht, um die Luftfeuchtigkeit zu vermindern und dadurch die Transpiration zu erhöhen. Der dritte Blütenstand blieb jeweils ohne Tüte und Silikagel. Nach drei Wochen wurden die Blütenstände für die Mineralstoffanalyse geerntet.

2.2.8 Bestimmung der Al-Konzentration im Vakuolensaft von Sepalen

Pflanzen der Sorte 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' wurden im Kulturjahr 1998/1999 entsprechend der für das Kulturjahr 1997/1998 in den Kapiteln 2.1.2 und 2.2.1 gegebenen Beschreibung kultiviert. Der pH-Wert des unbehandelten Substrats betrug zur Blütezeit 4,8, die während Vorkultur und Treiberei mit 2 bzw. 6 g Al₂(SO₄)₃ x 18 H₂O

(L Substrat)⁻¹ behandelten Varianten wiesen einen Substrat-pH-Wert von 4,2 bzw. 3,8 auf. Für die Bestimmung der Al-Konzentration im Vakuolensaft wurden von 1-2 Pflanzen pro Sorte und Al-Variante aus 2-4 Sepalen 1-3 Vakuolensaftproben mittels modifizierter Druckmeßsondentechnik gewonnen (2.3.15).

2.3 Durchgeführte Untersuchungen und chemische Analysen

2.3.1 pH-Wertbestimmung von Substratextrakten, Nährlösung und Xylemsäften

Zur Bestimmung des pH-Werts von Substrat wurden ein Volumenteil Substrat und drei Volumenteile deionisiertes Wasser oder 0,01 M CaCl₂ gut verrührt und nach 12 Stunden der pH-Wert mit einem pH-Meter (Wissenschaftlich-technische Werkstätten Weilheim i. OB) gemessen. Mit demselben Gerät wurde der pH-Wert von Nährlösungen bestimmt. Die pH-Wertmessung im Xylemsaft erfolgte mit einer Mikro-pH-Elektrode (Blue Line 16 pH, Schott, Mainz).

2.3.2 Farbbonitur

Für die Farbbonitur wurde folgendes 6stufiges Boniturschema aufgestellt:

- | | |
|---|---|
| 1 | 0 % blau: rosa |
| 2 | < 10 % blau: erste Blaufärbung sichtbar |
| 3 | 10 - <60 % blau |
| 4 | 60 - <90 % blau |
| 5 | 90 % - <100 % blau |
| 6 | 100 % blau: maximale Blaufärbung der jeweiligen Sorte |

Bei heterogener Ausfärbung der Sepalen sind die Prozentangaben als räumliche Verteilung von rosa und blau zu verstehen. Bei homogener Ausfärbung beziehen sie sich auf das Mischungsverhältnis von rosa und blau. Die Mischung von rosa und blau führt zu Lilatönen. In Substratkultur waren die Hortensensepalen bei unvollständiger Blaufärbung in der Regel an der Basis blau und zum Rand hin lila.

Da die maximal erreichbare Blaufärbung = Boniturnote 6 sortentypisch ist, wurde getrennt nach Sorten für jede Boniturnote ein Beispielblütenstand herausgesucht. Auf Abb. 2.4 sind exemplarisch die den Boniturnoten zugeordneten Blütenstände der Sorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' zu sehen. Für einige Boniturnoten ließen sich bei manchen Sorten im Versuch keine entsprechenden Beispielblütenstände finden.

Eine Blaufärbung der Boniturnote 4 ist nach Maßstäben von Hortensienproduzenten noch als zufriedenstellend zu bewerten.

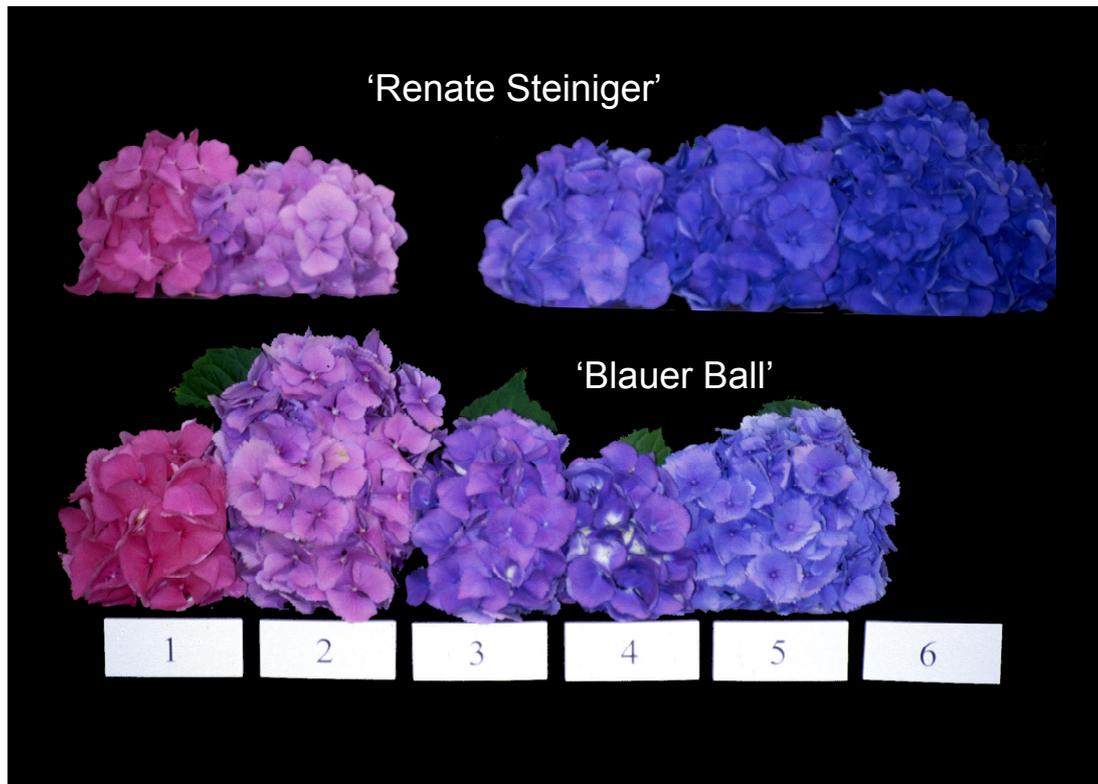


Abb. 2.4: Farbboniturskala für Blütenstände der Sorten ‘Renate Steiniger’ und ‘Blauer Ball’.

2.3.3 Farbmessung

Die Messung der Blütenfarbe erfolgte mit dem Chroma Meter CR-300 (Minolta, Osaka, Japan) im gleichabständigen Farbsystem $L^*a^*b^*$ (auch CIELAB, CIE: Commission Internationale de l’Eclairage, 1976). In diesem Farbsystem entsprechen gleiche Farbabstände ungefähr gleichen visuell-empfindungsmäßigen Abständen des Menschen. Der Farbraum ist durch die Helligkeit L^* und die Farbkoordinaten a^* und b^* gekennzeichnet. $+a^*$ zeigt in Richtung rot, $-b^*$ steht für blau. Farbunterschiede, zum Beispiel zwischen den Farben A und B (Abb. 2.5), können mit Hilfe des Farbabstands ΔE_{ab}^* angegeben werden:

$$\Delta E_{ab}^* = ((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2)^{1/2}.$$

Farbabweichungen können auch im L^*C^*h -Farbsystem bestimmt werden, dem dasselbe Diagramm wie dem $L^*a^*b^*$ -System zugrunde liegt. Hier werden jedoch Polarkoordinaten anstelle von rechtwinkligen Koordinaten benutzt. Der Helligkeitswert L^* ist bei

beiden Farbsystemen identisch. Die Buntheit C^* und der Bunttonwinkel h ergeben sich aus folgenden Formeln:

$$C^* = ((a^*)^2 + (b^*)^2)^{1/2}$$

$$h = \text{tg}^{-1}(b^*/a^*) \text{ [in Grad]}$$

Die Farbtondifferenz ΔH wird folgendermaßen berechnet (Abb. 2.6):

$$\Delta H = ((\Delta a^*)^2 - (\Delta b^*)^2 - (\Delta C^*)^2)^{1/2}$$

Um die Eignung der verschiedenen Parameter der Farbmessung zur Messung der Sepalenfarbe im Vergleich zur Farbbonitur zu beurteilen, wurden die Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten (2.4) berechnet (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Beziehung zwischen der Farbbonitur und verschiedenen Parametern der Farbmessung (Spearmansche Rangkorrelationskoeffizienten: $n = 128$).

Parameter der Farbmessung	Spearmanscher Rangkorrelationskoeffizient
ΔE^*	0,90
ΔH^*	-0,90
Δb^*	-0,87
h	-0,86
Δa^*	-0,81
ΔL^*	-0,61

Alle untersuchten Parameter der Farbmessung waren signifikant mit der Farbbonitur korreliert ($\alpha < 0,001$). Farbabstand ΔE^* und Farbtondifferenz ΔH^* waren am engsten mit der Farbbonitur korreliert. Beide Parameter eignen sich gleichermaßen zur Beurteilung der Sepalenfarbe. Im folgenden wurden Vergleiche zwischen Farbbonitur und Farbmessung auf das $L^* a^* b^*$ -Farbsystem und insbesondere den Parameter Farbabstand ΔE^* beschränkt.

Zur Auswertung der Farbmessung wurde das Programm ChromaControl C Version 2.0 verwendet.

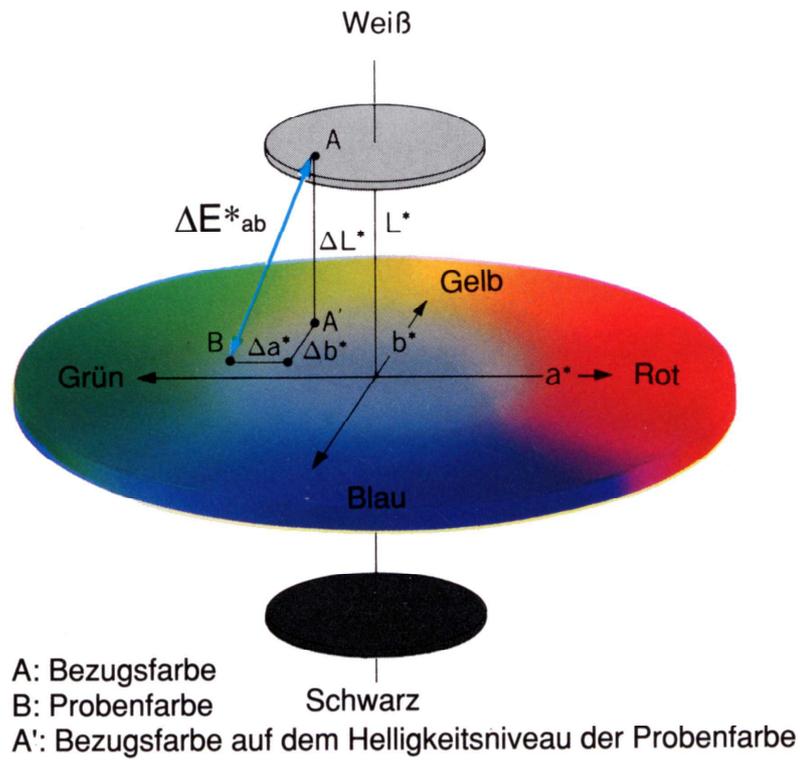


Abb. 2.5: Grafische Darstellung der Berechnung des Farbabstands ΔE_{ab}^* zwischen den Farben A und B im $L^* a^* b^*$ -Farbraum (Minolta, 1996).

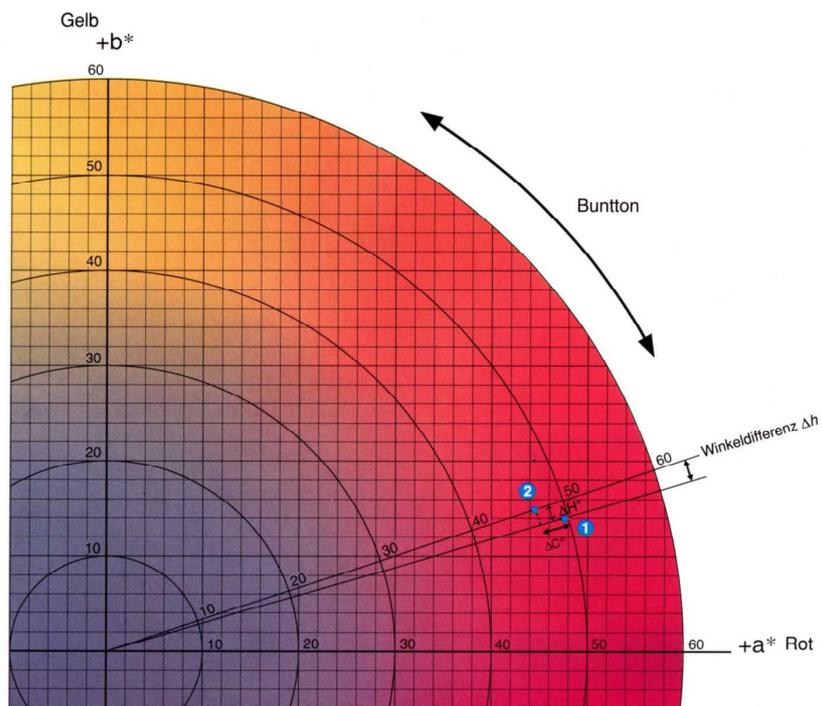


Abb. 2.6: Ausschnitt aus der Farbtabelle $a^* b^*$ zur Veranschaulichung der Berechnung der Farbtondifferenz ΔH (Minolta, 1996).

2.3.4 Gewinnung von Xylemexsudat

Nach Abschneiden des Sprosses ca. 4 cm über der Wurzel mit einer Rasierklinge und Reinigung der Schnittstelle mit deionisiertem Wasser, pH-Wert 4,2, wurden auf den Sproßrest entsprechend dem Holzdurchmesser zugeschnittene 1000- μ L-Pipettenspitzen zwischen Holz- und Bastteil des Sprosses eingeführt und zum Abdichten mit Parafilm umwickelt (Abb. 2.7). Der sich in den Pipettenspitzen sammelnde Xylemsaft wurde mindestens alle 15 Minuten in Reaktionsgefäße auf Eis überführt, um den Abbau organischer Säuren durch Mikroorganismen zu minimieren, und anschließend bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren.



Abb. 2.7: Sammeln von Xylemexsudaten nach Abschneiden des Sprosses mit Hilfe von auf den Sproßrest aufgesetzten Pipettenspitzen.

2.3.5 Bestimmung des Wurzelwachstums

Zur Bestimmung des Wurzelvolumens durch Tauchwägung wurden die Wurzelsysteme von anhaftendem Wasser befreit und in ein wassergefülltes, auf einer Waage stehendes Gefäß getaucht, ohne dessen Wand zu berühren. Die Fixierung der Stecklinge erfolgte mittels Stativ. Die Gewichtszunahme wurde ausgewogen (Young und Werner, 1984).

Das absolute Wurzelwachstum ergab sich als Differenz aus dem Ergebnis der Tauchwägung (w_2) zum Zeitpunkt des Endes (t_2) und dem Ergebnis der Tauchwägung (w_1) zum Zeitpunkt des Beginns (t_1) der Al-Behandlung in der Einheit g. Um die unterschiedliche Ausgangsgröße der Stecklinge zu relativieren wurden zusätzlich das prozentuale Wurzelwachstum (Tauchgewicht zu Beginn der Al-Behandlung gleich 100 %) und die relative Wurzelwachstumsrate ($RWWR = (\ln w_2 - \ln w_1) / (t_2 - t_1)$ nach Hunt (1981)) ermittelt. Außerdem wurde beim Versuch zum Einfluß der Al-Form auf Al-Aufnahme, -Verlagerung und -Toxizität das theoretisch zu erwartende Wachstum

ohne Al-Behandlung während des Zeitraums der Al-Behandlung aufgrund des Wachstums in den zwei Tagen vor der Al-Behandlung errechnet.

2.3.6 Bestimmung des Trockengewichts

Zur Bestimmung des Trockengewichts wurde die Pflanzensubstanz bei 70 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

2.3.7 Mineralstoffbestimmungen

Bei 50 °C getrocknete Pflanzensubstanz wurde fein vermahlen (Analysenmühle A 10, Mikro-Feinmühle Culatti, Ika-Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen i. Br.), eine Teilprobe von 0,05, 0,1 oder 0,2 g 6 h bei 450 °C verascht, in 1 mL 4,7 M HNO₃ aufgenommen und nach 20 min 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Xylemsaft wurde nach Zentrifugationsfiltration (Micro-Spin-Zentrifugationsfilter, 0,2 µm Porengröße, Nylon 66, Alltech GmbH, Unterhaching) 1:100 in 0,47 M HNO₃ verdünnt und eine Unterprobe zur Bestimmung organischer Säuren verwendet (2.3.9). Nährlösung wurde vor der Mineralstoffanalyse durch Cellulose-Acetatfilter (OE 66, 0,2 µm Porengröße, Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert. Eine Filtration durch Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm wird in der Regel zur Entfernung von partikulärem, nicht toxischem Al aus Nährlösungen durchgeführt. Da partikuläres Al im Xylemsaft nicht zu erwarten ist, diente die Filtration hier vor allem der Entfernung von Mikroorganismen für die HPLC-Analyse.

Die Mineralstoffgehalte wurden mittels ICP-OES-Analysetechnik (Spectroflame EOP, Spectro Analytical Instr. GmbH, Kleve) oder Al in 1 cm langen Wurzelspitzen durch Atomabsorptions-Spektrometrie mit Grafitrohrtechnik (Unicam, 939 QZ, Analytical Technologies Inc., Cambridge, UK) gemessen. Alle Glaswaren wurden vor der Al-Bestimmung mit 1 M HCl und deionisiertem oder doppelt deionisiertem Wasser (18,3 MΩ, E-Pure, Barnstead, Dubuque, Iowa, USA) vorgespült.

Zur Bestimmung von monomerem Al (Al_{mono}) wurde ein Aluminon-Acetatpuffer nach Kerven *et al.* (1989) verwendet. Eisen sollte durch die Zugabe von 10 µL Ascorbinsäure zu 1,5 mL Probenlösung (Nährlösung oder verdünnter Xylemsaft) maskiert werden. 30 s nach Zugabe von 0,5 mL Aluminon-Acetatpuffer wurde die Extinktion bei 530 nm Wellenlänge am Spektralphotometer (Lambda 15, Perkin Elmer, Überlingen) gemessen.

Die anorganischen Anionen NO₃⁻, P_i (H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻), SO₄²⁻ und Cl⁻ wurden im Xylemsaft mit dem Dionex DX-100 Ionenchromatograph (Dionex GmbH, Idstein)

quantifiziert (Institut für Bodenkunde, Universität Hannover). Als Eluenten wurden 1,7 mM NaHCO₃ und 1,8 mM Na₂CO₃, für die chemische Suppression 50 mM H₂SO₄ benutzt. Für die Kalibration wurde ein Standard folgender Zusammensetzung verwendet (mM): NaNO₃ 0,19, KH₂PO₄ 0,06, Na₂SO₄ 0,12 und NaCl 0,17 in 1-, 2-, 10- und 20facher Verdünnung.

2.3.8 Kallosebestimmung

Die Kallosebestimmung erfolgte in Anlehnung an eine von Kauss (1989) entwickelte Methode. Hierbei wird die Bildung eines fluoreszierenden Komplexes zwischen Kallose und Sirofluor, einem Bestandteil von Anilinblau, ausgenutzt. Zur Extraktion der Kallose wurden sieben 1 cm lange Wurzelspitzen in 1 mL 1 M NaOH für 0,5 min mit gepulstem Ultraschall (Titanmikrospitze M73, 45 % Leistung, Sonoplus HD 70, Bandelin, Berlin) und 1 min mit dem Potter (RW20, Janke & Kunkel, Staufen i. Br.) homogenisiert und für 30 min bei 80 °C im Wasserbad inkubiert. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 12000 U min⁻¹ (Sorvall MC 12V, Du Pont de Nemours Co. Inc., Newton CONN., USA) dienten zur Bestimmung der **Gesamtfluoreszenz** 120 µL Kallose-NaOH-Extrakt, versetzt mit 750 µL Anilinblau-Glycin-NaOH-Pufferlösung (Anilinblau-Pufferlösung), pH-Wert 9,5. Mit Hilfe einer Kontrollösung, bei der Anilinblau durch deionisiertes Wasser ersetzt war, wurde die **Autofluoreszenz** der Proben ermittelt. Durch Zugabe von Anilinblau-Pufferlösung zu 1 M NaOH ergab sich eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität. In der Annahme, daß diese Intensitätsverstärkung gleichermaßen in den Proben stattfindet, wurde die Differenz als **Blindwert** bezeichnet und subtrahiert. Kallosebildung (=Kallosegehalt) und Kalloseinduktion wurden folgendermaßen berechnet:

$$\text{Kallosebildung} = (\text{Gesamtfluoreszenz} - \text{Autofluoreszenz}) - \text{Blindwert}$$

$$\begin{aligned} \text{Kalloseinduktion} = & (\text{Kallosebildung der Al-inkubierten Wurzeln}) \\ & - (\text{Kallosebildung der Kontrollwurzeln}) \end{aligned}$$

20 min im Wasserbad bei 50 °C bewirkten die Entfärbung des Anilinblaus. Die Intensität der Fluoreszenz wurde am Spektralfluorometer (F-2000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) bei 393 nm Anregungswellenlänge, 484 nm Emissionswellenlänge, 5 nm Spaltbreite und 700 V Spannung gemessen.

Zur Kalibration wurde Pachyman von *Poria cocos* (Calbiochem, Bad Soden) mit einem Polymerisationsgrad von 250-690 eingesetzt (Kauss, 1989), ein langkettiges 1,3-β-

Glukan. Kallosegehalte und -induktion werden deshalb in der Einheit Pachymanäquivalent (PÄ) pro Wurzelspitze angegeben.

2.3.9 Bestimmung organischer Säuren

Organische Säuren wurden in Wurzelexsudaten und in Xylemsäften bestimmt. Die Bestimmung von organischen Säuren in Wurzelexsudaten erfolgte in Anlehnung an eine von Maier (1997) entwickelte Methode. Partikuläre Verunreinigungen wurden durch eine Filtration der Wurzelexsudatlösung durch Blaubandfilter (Schleicher & Schüll) entfernt. Eine Elimination von Kationen erfolgte durch Perkolation von 70 mL Wurzelexsudatlösung durch 1 g Kationenaustauscher (50W-X8, 100-200 mesh, Hydrogenform, BioRad Lab., Richmond CA, USA) in einer 6 mL Säule mit einem 75 mL fassenden Aufsatz (Baker Spe 12 System, Baker Inc., Phillipsburg NJ, USA). Durch Spülen mit 10 mL doppelt deionisiertem Wasser sollten noch im Kationenaustauscher befindliche organische Säuren und Zucker herausgespült werden. Das Eluat wurde danach durch eine Säule mit 1 g Anionenaustauscher perkoliert. Durch Spülen mit 10 mL doppelt deionisiertem Wasser sollten Zucker eluiert werden. Organische Säuren wurden dann durch 15 mL 8 M Ameisensäure von den Anionenaustauscherplätzen verdrängt. Durch Vakuum-Zentrifugationsverdampfung (RC 10.22, Jouan GmbH, Unterhaching: Heizstufe 1 für 320 min, mit Luftpulsation, Rest ohne Heizung, Kältefalle: RCT 90, Jouan GmbH, Drehschieber-Vakuumpumpe: RZ 5, Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim) wurde die Ameisensäure bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 0,5 mL 10 mM ClHO_4 resuspendiert. Vor der Analyse erfolgte eine Zentrifugation durch Zentrifugationsfilter (Ultrafree MC, 0,45 μm Porengröße, Millipore Corp., Bedford, Mass, USA) bei 1000 xg für 1 min (Sorvall MC 12V, Du Pont de Nemours Co. Inc., Newton CONN., USA). Auch Xylemsaft wurde vor der Analyse durch Zentrifugationsfiltration gereinigt (vergl. 2.3.7).

Die Auftrennung der Säuren erfolgte mit einem isokratischen HPLC-System (HPLC System 300 Kontron Instruments, München) mit einer Aminex HPX 87 H-Säule (300 x 7,8 mm, BioRad Lab., Richmond CA, USA). Vorgelagert war eine Vorsäule (Micro Guard Cation- H^+ , BioRad Lab.). Als Eluent wurde 10 mM ClHO_4 mit einer Fließrate von 0,5 mL min^{-1} bei 35 °C (Oven 480, Kontron Instr.) benutzt. Die Säuren wurden im Eluat mit dem Detektor 332 (Kontron Instr.) bei einer Wellenlänge von 214 nm detektiert. Zur Kalibration wurden Verdünnungen von 1:20, 1:100 und 1:1000 eines Standards folgender Zusammensetzung verwendet (mM): KNO_3 8, Oxalat 2, cis-

Aconitat 0,01, Citrat 8, Glutarat 6, Malat 6, Malonat 20, trans-Aconitat 0,01, Succinat 200, Fumarat 0,3. Aufgrund der für organische Säuren im Standard ermittelten Retentionszeiten konnten organische Säuren in den Proben identifiziert und mit Hilfe des Programms KromaSystem 2000 (Kontron Instruments, München) „Peakflächen“ in Konzentrationen umgerechnet werden. Auch wenn als Bezeichnung für die organischen Säuren der Name des Carboxylat-Anions verwendet wird, ist darunter stets das Gleichgewicht zwischen Carbonsäuren und Carboxylat-Anionen zu verstehen, das mit sinkendem pH-Wert in Richtung der Säuren verschoben wird.

Um die Wiederfindung der organischen Säuren in der Wurzelexsudatlösung nach Perkolation durch die Kat- und Anionenaustauscher und nach der Aufkonzentrierung mittels Vakuum-Zentrifugationsverdampfung zu bestimmen, wurden 0,5 mL des 1:100 verdünnten Standards im Verhältnis von 1:140 mit doppelt deionisiertem Wasser verdünnt. Zwei dieser so verdünnten Standardlösungen wurden jeweils zeitgleich mit acht Proben der Wurzelexsudatlösung derselben Prozedur unterzogen. Die Wiederfindung von Citrat, Glutarat, Malat und Succinat war mit 100, 102, 98 und 100 % ausgezeichnet. Die Malonatkonzentration wurde um 46 % überschätzt und in den Proben korrigiert. Die Fumaratkonzentration wurde um 26 % überschätzt, cis-Aconitat- und trans-Aconitatkonzentrationen des verwendeten Standards lagen unterhalb der Nachweisgrenze. In den Wurzelexsudatlösungen waren Fumarat, cis- und trans-Aconitatkonzentrationen jedoch bedeutungslos. Oxalat konnte nicht mit zufriedenstellender Genauigkeit bestimmt werden.

2.3.10 Berechnung der Al-Speziesverteilung mit GEOCHEM-PC

Zur chemischen Spezifikation von Al in Xylemsäften und Nährlösungen wurden Berechnungen mit dem Computerprogramm GEOCHEM-PC Version 2.0 durchgeführt (Parker *et al.*, 1995). Mit Hilfe dieses Programms lassen sich Ionenspezifikationen von Lösungen im thermodynamischen Gleichgewicht modellieren. Ausfällungen wurden bei der Berechnung der Al-Speziesverteilung in Xylemsaft und Nährlösung nicht erlaubt. Eine Ausnahme stellt die Nährlösungsvariante mit Al-Malat bei einem pH-Wert von 6,0 (2.2.3) dar. Hier wies eine Verminderung der Al-Konzentration durch Membranfiltration auf Ausfällung von Al hin, weshalb in diesem Fall Ausfällungen bei der Berechnung zugelassen wurden. Die Ionenstärke wurde im Xylemsaft aufgrund der gemessenen Ionenkonzentrationen, in der Nährlösung aufgrund der Ionenkonzentra-

tionen zu Versuchsbeginn berechnet und als Schätzwert für die von GEOCHEM-PC zu berechnende Ionenstärke eingegeben.

2.3.11 Licht- und Elektronenmikroskopie

Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, wurden für die Licht- und Elektronenmikroskopie 1 cm lange Hortensienwurzelabschnitte hergestellt. Die Vorfixierung dieser Wurzelstücke erfolgte bei 20 °C für 2 h in 1,5 % Glutardialdehyd in 50 mM PIPES-Puffer (Merck, Darmstadt), pH-Wert 7,0 (Plattner und Zingsheim, 1987). Nach dreimaligem Waschen mit PIPES-Puffer wurde für 75 min mit 1 Gew.-% Osmiumtetroxid in 50 mM PIPES-Puffer (pH-Wert 7,0) nachfixiert und dreimal mit deionisiertem Wasser gespült. Die Objekte wurden über Nacht im Exsikkator mit Aceton über CaCl₂ als Trocknungsmittel stufenlos bis zum Erreichen einer 70%igen Acetonkonzentration entwässert (Sitte, 1962). Die restlichen 30 % Wasser wurden durch Aceton ersetzt, indem in 6 Stufen zweimal 50 % der Lösung tropfenweise gegen die nächsthöhere Konzentration ausgetauscht wurden und eine Adaptationsphase von je 30 min für die Gewebe folgte (modifiziert nach Robinson *et al.*, 1985). Zur Einbettung wurde das Aceton im Verhältnis von 1:1 (Vol.:Vol.) mit Durcupan ACM (Fluka, Buchs, Schweiz), einem Epoxyharz, versetzt und das Aceton über Nacht auf einem Rotor abgedampft. Für die endgültige Einbettung wurden die Präparate in frisches Durcupan überführt und dieses im Wärmeschrank polymerisiert (24 h 40 °C, 48 h 60 °C). Zur Aushärtung lagerten die Präparate mindestens einen Monat bei Zimmertemperatur.

Von den in Durcupan eingebetteten Wurzeln wurden mit einem Pyramitom (LKB, Bromma, Schweden) 2 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt und mit Methylenblau nach Löffler (Romeis, 1948) angefärbt. Lichtmikroskopische Untersuchungen wurden am Fotomikroskop Axiolab (MC80 HB050, Zeiss, Jena) durchgeführt. Für die Schwarz-Weiß-Aufnahmen wurden Agfapan Professional Filme (25 ISO) verwendet. Vergrößerungen entstanden am Laborator 1200 (Durst, Bozen, Italien) auf Brovira Speed Fotopapier (Agfa Deutschland, Köln).

Für die Elektronenmikroskopie wurden mit dem Ultramikrotom OM-U3 (Reichert, Österreich) ultradünne Wurzelquerschnitte (60-80 nm) hergestellt. Die Schnitte wurden auf Langlochobjektträger, beschichtet mit Pioloformfolie, aufgebracht und 20 min mit 2 Gew.-% wäßrigem Uranylacetat und 4 min mit 6 Gew.-% alkalischem Bleicitrat (Reynolds, 1963) nachkontrastiert.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden am Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM 10A (Zeiss, Oberkochen) angefertigt.

2.3.12 Lokalisation von Al, P, S und Ca mittels Elektronen-Energie-Verlust-Spektroskopie (EELS) und Elektronen-Spektroskopischer-Darstellung (ESI)

Die Elektronen-Energie-Verlust-Spektroskopie (engl.: electron energy loss spectroscopy, EELS) ermöglicht den Nachweis von Elementen in Ultradünnschnitten in hoher räumlicher Auflösung. Grundlage dieser Meßtechnik ist der charakteristische Energieverlust eingestrahelter Elektronen durch Interaktion mit den Elementen der Probe.

Ultradünnschnitte von in Durcupan eingebetteten Wurzelspitzen (2.2.2, 2.3.11) wurden auf Kupfernetze (700 mesh hexagonal, Dünnsteg, Plano, Wetzlar) aufgebracht. Die Aufnahme der Al-Spektren erfolgte in einem Zeiss EM 902 (Zeiss, Jena) bei einer Beschleunigungsspannung von 81,50 bis 81,65 kV. Der charakteristische Energieverlust der K-Schale des Al von $\Delta E = 1600$ eV wurde zum Nachweis benutzt. Für den elementspezifischen Nachweis wurde von den Spektren als nicht elementspezifischer Hintergrund der Mittelwert über den Bereich des Energieverlusts von $\Delta E = 1560$ eV subtrahiert. Der elementspezifische Energieverlust von 152, 200 bzw. 346 eV wurde zum Nachweis von P, S bzw. Ca verwendet.

Durch Elektronen-Spektroskopische Darstellung (engl.: electron spectroscopic imaging, ESI) kann die Verteilung eines Elements auf ultrastrukturellem Level bildlich dargestellt werden. Zur Darstellung der Zellstruktur wurde zunächst ein Referenzbild des zu messenden Ausschnitts bei einem Energieverlust von $\Delta E = 240$ eV aufgenommen. Außerdem wurden je ein Verteilungsbild bei elementspezifischem Energieverlust ΔE (Al: 1600, P: 152, S: 200 eV) und des Hintergrunds (Al: 1560, P: 122, S 160 eV) angefertigt. Ein errechnetes Differenzbild aus diesen beiden Bildern zeigte die Verteilung des jeweils gemessenen Elements.

Diese sowie die unter 2.3.11 beschriebenen Arbeiten wurden mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe Herr Prof. Dr. H. Lehmann, Herr Dr. R. Stelzer und Frau U. Kunz im Institut für Tierökologie und Zellbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt.

2.3.13 Ermittlung der Fläche von Blütenständen

Um die Fläche der Blütenstände zu berechnen, wurde ihr Durchmesser von oben betrachtet an der breitesten Stelle (dm_1) und senkrecht dazu an der breitesten Stelle (dm_2) gemessen. Da die Form der Blütenstände nahezu elliptisch ist, wurde die Fläche der Blütenstände nach der Formel für den Flächeninhalt (A) einer Ellipse berechnet: $A = \pi/4 dm_1 dm_2$.

2.3.14 Ringelung zur Unterbrechung des Phloemtransports

Um lebende Zellen abzutöten, wurde ein 1,5 cm langer Sproßabschnitt unterhalb des Blütenstands mit heißem Wasserdampf behandelt. Diese als Ringelung bezeichnete Prozedur diente der Unterbrechung des Phloemtransports, während Xylemsaft in den toten Xylemzellen weiterhin transportiert werden sollte. Bei Pflanzen in Substratkultur (2.2.7.2) führte eine einminütige Ringeldauer zur erkennbaren Abtötung des Gewebes, Pflanzen in Nährlösungskultur (2.2.7.2) benötigten eine fünfminütige Behandlungsdauer (Abb. 2.8). An die Ringelstelle angrenzende Pflanzenteile wurden durch Abdeckung mit Papier vor Verbrühung geschützt. Zwei Zahnstocher, ober- und unterhalb der Ringelstelle mit Parafilm umwickelt, dienen als Stütze für die Ringelstelle.



Abb. 2.8: Ringelstelle von Hortensienpflanzen aus Substrat- (Ringeldauer: 1 min) und Nährlösungskultur (Ringeldauer: 5 min), fotografiert 7 bzw. 4 Tage nach der Ringelung.

2.3.15 Gewinnung von Vakuolensaft aus Subepidermiszellen von Sepalen mittels modifizierter Druckmeßsondentechnik

Vakuoleninhalt wurde mittels modifizierter Druckmeßsondentechnik (Malone *et al.*, 1989) aus der zentralen Sepalenregion zwischen den 5 zentralen Leitbündeln 1. Ordnung entnommen. Da Sepalenfarbstoff vor allem in Subepidermiszellen erkennbar ist

(Allen, 1943 und eigene nicht dargestellte lichtmikroskopische Untersuchungen) und orientierende EDX-Messungen auf einen höheren Al-Gehalt in dieser Zellschicht als in Epidermis- und Mesophyllzellen hinwiesen (nicht dargestellt), sollte Vakuolensaft aus Subepidermiszellen entnommen werden. Um ein Einströmen des Epidermisvakuolensafts zu verhindern, wurde während des Durchstechens der Epidermiszelle ein Gegendruck in der Glaskapillare erzeugt. Zur Entnahme des Vakuolensafts aus der darunterliegenden Zellschicht wurde der Gegendruck aufgehoben und Vakuolensaft strömte aufgrund des Turgors erkennbar in die Kapillare ein. Die Dauer der Vakuolensaftextraktion betrug weniger als 1 Sekunde. Vakuolensaft von jeweils 15 Einzelzellen wurde in der Kapillare zu einer Mischprobe vereinigt und anschließend auf dem Kühltisch eines Nanoliterosmometers (Clifton Technical Physics, Hartford, NY, USA) in wassergesättigtem Silikonöl bei 4 °C zwischengelagert.

2.3.16 Energiedispersive Röntgenmikroanalyse von Vakuolensaft

Tropfen der Standardlösungen mit 2,5, 5 und 10 mM AlCl₃ wurden ebenso wie der Vakuolensaft in wassergesättigtes Silikonöl pipettiert und davon definierte Volumina von 10 pL mit einer Konstriktionspipette in die Maschenfelder von mit Pioloformfolie beschichteten Kupfernetzen (Plano, Wetzlar) übertragen. Von den Vakuolensaftmischproben wurden mit derselben Konstriktionspipette 3 bis 4 Unterproben von 10 pL auf dieselben Kupfernetze übertragen (Hinde *et al.*, 1998). In jeden Vakuolensaft- und Standardlösungstropfen wurden wieder mit derselben Konstriktionspipette 10 pL 200 mM Saccharose mit 50 mM Rubidiumchlorid als internem Standard (Hyatt und Marshall, 1985; Bostrom *et al.*, 1988; Hinde *et al.*, 1998) pipettiert. Zur Entfernung des Silikonöls wurden die Kupfernetze nacheinander zunächst zweimal für 5 s in Hexan und einmal in 2-Methyl-Butan (Isopentan) gewaschen und abschließend im Luftstrom eines Haarföns getrocknet. Die Saccharosematrix sollte eine gleichmäßige Auskristallisation der Tropfen beim Trocknen bewirken. Für die Energiedispersive Röntgenanalytik (engl: energy dispersive X-ray analysis, EDXA) wurden die Kupfernetze mit einer selbstklebenden, elektrisch leitfähigen Folie auf Objekthaltern fixiert und zur Vorbereitung der Messung auf dem Probenstisch des Rasterelektronenmikroskops Philips XL-20 mit Si/Li-Halbleiterdetektor (EDAX) befestigt. Der Neigungswinkel des Kupfernetzes zu Elektronenstrahl und Röntgenstrahldetektor betrug jeweils 45°, der Abstand zwischen Probenoberfläche und Röntgendetektor 11 bis 12 mm. Die Probentropfen wurden bei 1000facher Vergrößerung gemessen, wobei die rechteckige Meßfläche der Tropfengröße angepaßt wurde. Die Beschleunigungsspannung betrug 20 kV, der Strahlstrom

55 μA . Alle Proben wurden für 300 s (Nettomeßzeit) dem gebündelten Elektronenstrahl ausgesetzt. Die Al-Konzentration konnte aufgrund der ermittelten „Peak“/Hintergrund-Verhältnisse der Standardlösungen berechnet werden. Für Al-Bestimmungen eignet sich Rubidium gut als interner Standard, weil sein „Peak“ im Spektrum direkt nach dem Al-„Peak“ folgt. Zur Korrektur von Meßschwankungen, zum Beispiel durch elektrostatische Aufladung, wurde stets der Quotient des „Peak“/Hintergrund-Verhältnisses von Al und Rubidium gebildet.

Diese Arbeiten wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn PD Dr. H.-W. Koyro in der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

2.4 Statistik

Für die varianzanalytische Verrechnung der Versuche wurde das Programm SAS Version 6.12 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA 27513) verwendet. Multiple Mittelwertvergleiche wurden mit dem Tukey-Test durchgeführt. Nicht signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten sind in Abbildungen und Tabellen durch gleiche Buchstaben gekennzeichnet, oder die Signifikanz von Unterschieden läßt sich anhand der Grenzdifferenzen nach Tukey-Test bei vorgegebener Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($\text{GD}_{T, 5\%}$) beurteilen. Zur Beurteilung der Korrelation zwischen Farbbonitur und verschiedenen Parametern der Farbmessung, dem Substrat-pH-Wert sowie dem Al-Gehalt der Sepalen wurde der Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient mit SAS berechnet, da die Boniturnoten nicht metrisch, sondern ordinalskaliert sind. Bei allen anderen Regressionsberechnungen wurden der Pearsonsche Korrelationskoeffizient r bzw. das Bestimmtheitsmaß r^2 mit dem Programm Sigma Plot Version 5.0 berechnet. Bei der Angabe von Korrelationskoeffizienten und Ergebnissen des F-Tests stehen ***, **, * und + für signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1, 1, 5 und 10 % und n. s. für nicht signifikant. Standardabweichungen wurden in Abbildungen als vertikale Balken dargestellt und im Text mit \pm gekennzeichnet. Der Variationskoeffizient (CV) wurde nach der Formel $\text{CV} = \text{Standardabweichung} \times 100 / \text{Mittelwert}$ berechnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einfluß des Al-Angebots auf Al-Verlagerung und Blaufärbung verschiedener Sorten in Substratkultur

Um die Zusammenhänge zwischen Al-Angebot, pH-Wert des Substrats, Al-Verlagerung und Blaufärbung der Sepalen bei acht Hortensiensorten zu untersuchen, sollten durch steigendes Al-Angebot im Substrat neben einer unbehandelten Kontrolle pH-Werte von 5,0, 4,5 und 4,0 eingestellt werden (2.2.1).

3.1.1 Substrat-pH-Werte

Die Einstellung der angestrebten Substrat-pH-Werte von 5,0, 4,5 und 4,0 gelang für die Sorten 'Adria', 'Blauer Zwerg' und 'Elbtal' relativ genau, während die pH-Werte im Mittel über alle acht Sorten um 0,3 bis 0,4 pH-Wert-Einheiten über den Ziel-pH-Werten lagen. Der pH-Wert der Kontrolle betrug im Mittel über alle Sorten 6,1.

Die pH-Mittelwerte der Sorten wiesen bei der Kontrolle einen maximalen Unterschied von 1,3 pH-Wert-Einheiten auf. Bei niedrigem Al-Angebot fiel dieser Unterschied geringfügig und bei hohem Al-Angebot mit 0,6 pH-Werteinheiten deutlich niedriger aus. Der Substrat-pH-Wert der Sorte 'Blauer Ball' war durchschnittlich bei allen Al-Behandlungsstufen höher als der aller anderen Sorten, signifikant war dieser Effekt bei allen Behandlungsstufen nur im Vergleich mit den Sorten 'Adria' und 'Blauer Zwerg'. Bei der höchsten Al-Behandlung lag der pH-Wert von 'Blauer Ball' um 0,4 bis 0,6 pH-Wert-Einheiten höher als bei den anderen Sorten. 'Elbtal' und 'Renate Steiniger' wiesen hier mit 4,1 den niedrigsten pH-Wert auf.

Die Interaktion zwischen Al-Angebot und Sorte beruhte weniger auf dem Einfluß des Al-Angebots als auf dem der Sorte. Während die Reihenfolge der Al-Behandlungsstufen bei allen Sorten gleich war, unterschied sich die Reihenfolge der Sorten bei den verschiedenen Al-Behandlungen. Unterschiede zwischen benachbarten Al-Behandlungsstufen waren jedoch nicht bei allen Sorten signifikant unterschiedlich.

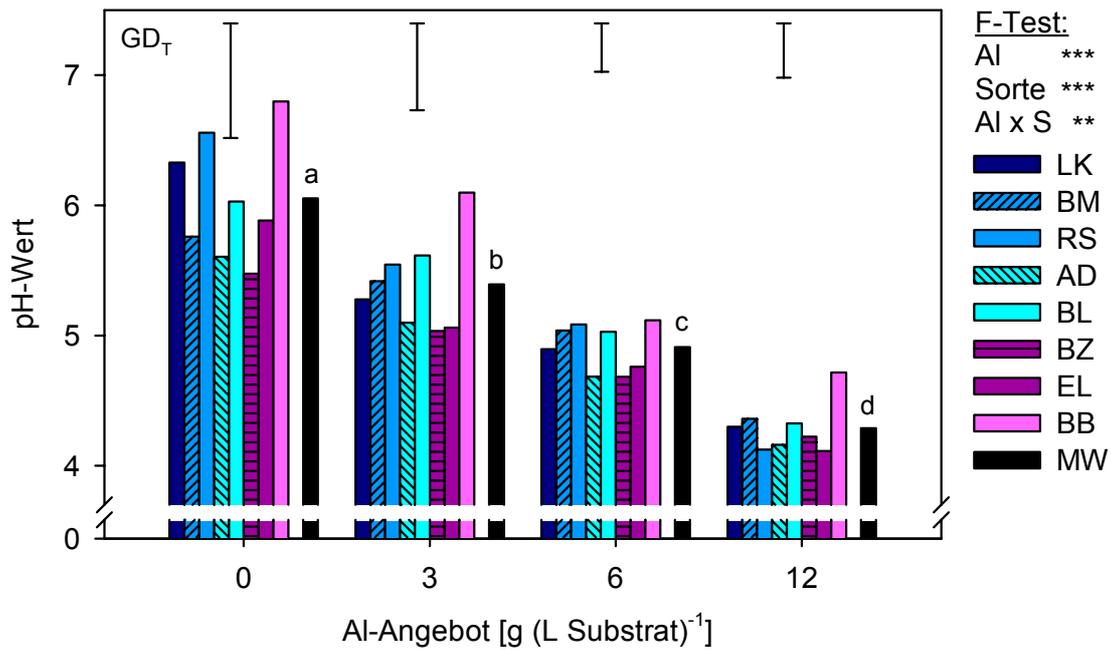


Abb. 3.1: pH-Werte im Substrat von acht Hortensiensorten bei der Blüte im April 1998 in Abhängigkeit vom Al-Angebot ($\text{g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O} (\text{L Substrat})^{-1}$). MW: Mittelwert über acht Sorten. Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden. $\text{GD}_{\text{T}, 5\%}$: für Sortenmittelwerte getrennt nach Al-Angebot. $n = 4$. Sortenreihenfolge entspricht abnehmender Eignung zur Blaufärbung bei hohem Al-Angebot ermittelt durch Farbbonitur (Abb. 3.2).

3.1.2 Sepalenfarbe

Farbbonitur

Die Blaufärbung, bewertet durch Farbbonitur, nahm im Mittel über alle acht Sorten nach Al-Angebot von 3, 6 und 12 g Al-Sulfat zu (Abb. 3.2). Sie verbesserte sich von der Boniturnote 3,0, über 3,9 auf 4,6. Wie ein Mittelwertvergleich getrennt nach Sorten ergab, war die Interaktion zwischen Al-Angebot und Sorte nur auf die Sorten zurückzuführen. Die Reihenfolge der Mittelwerte der Farbbonitur für die vier Al-Behandlungsstufen war bei allen Sorten gleich. Bei jeder Sorte verbesserte sich die Blaufärbung mit jeder Erhöhung des Al-Angebots signifikant. Deshalb wurden die Mittelwerte der Al-Behandlungsstufen über alle Sorten trotz Interaktion verglichen. Ohne Al-Behandlung waren die Blüten aller Sorten in der Regel rosa gefärbt und erhielten somit die Boniturnote 1. Nur bei einzelnen Pflanzen der Sorten ‘Renate Steiniger’, ‘Blauer Zwerg’ und ‘Elbtal’ war eine geringfügige Blaufärbung erkennbar. Dies kann sowohl auf Verunreinigungen mit Al-Lösung als auch auf eine lokal erhöhte Verfügbarkeit von in Ton

gebundenem Al z. B. durch organische Säuren in Wurzelexsudaten zurückzuführen sein.

Die Sorten unterschieden sich zum Teil signifikant in ihrer Blaufärbung. Abb. 3.3 zeigt die unterschiedliche Verbesserung der Blaufärbung nach der Al-Behandlung exemplarisch für die Sorten ‘Blauer Ball’ und ‘Renate Steiniger’. Bei niedriger Al-Behandlung unterschieden sich die Mittelwerte der Sorten um fast zwei Boniturnoten, bei hoher Al-Behandlung verminderten sich diese Unterschiede auf weniger als eine Boniturnote. Bei mittlerem und hohem Al-Angebot nahm die Blaufärbung der Sorten in folgender Reihenfolge ab: ‘LK15’, ‘Blaumeise’, ‘Renate Steiniger’, ‘Adria’, ‘Bläuling’, ‘Blauer Zwerg’, ‘Elbtal’, ‘Blauer Ball’. In allen Säulendiagrammen zu diesem Versuch sind die Sorten in dieser Reihenfolge angeordnet. Bei niedrigem Al-Angebot belegten die Sorten ‘Blaumeise’, ‘Bläuling’, ‘LK15’ und ‘Adria’ die Ränge 1 bis 4. ‘Renate Steiniger’ rangierte hier nur auf dem 5. Rang. Die drei letzten Ränge blieben unverändert.

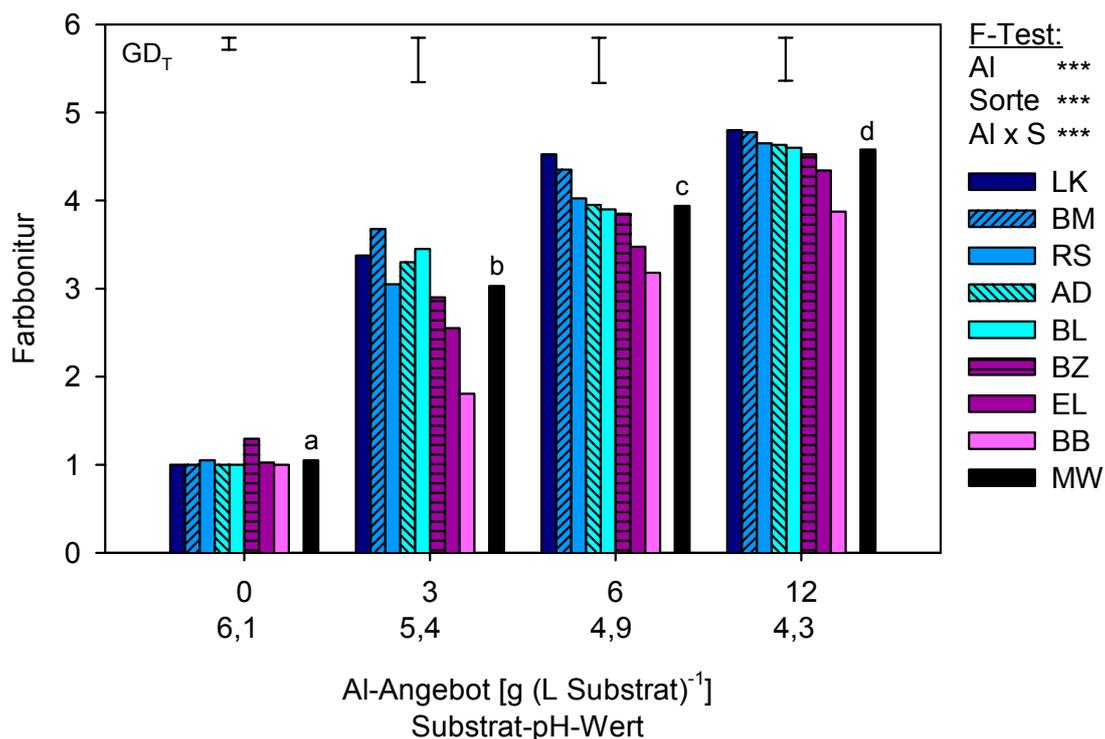


Abb. 3.2: Farbbonitur der Sepalen von acht Hortensiensorten bei der Blüte im April 1998 in Abhängigkeit vom Al-Angebot ($\text{g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O}$ (L Substrat^{-1})). MW: Mittelwert über acht Sorten. Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden. $\text{GD}_{\text{T}, 5\%}$: für Sortenmittelwerte getrennt nach Al-Angebot. $n = 20$.

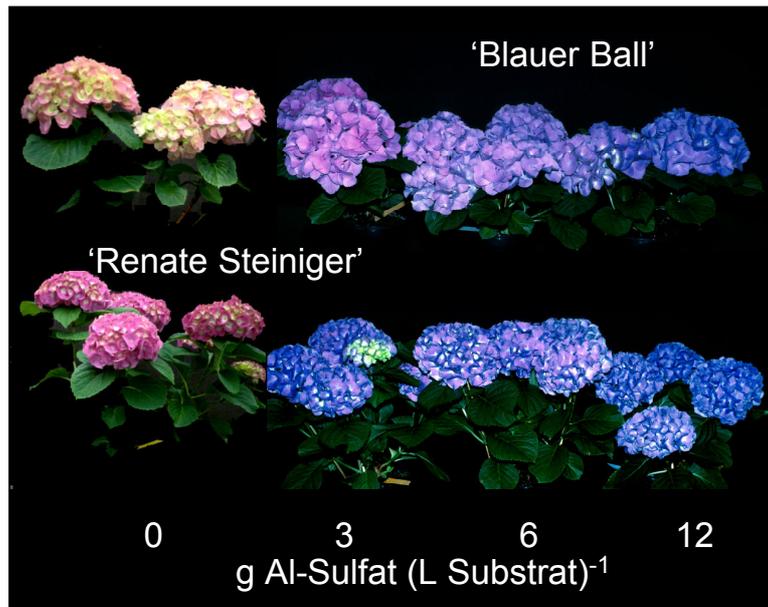


Abb. 3.3: Pflanzen der Sorten 'Blauer Ball' und 'Renate Steiniger' bei der Blüte im April 1998 in Abhängigkeit vom Al-Angebot ($\text{g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{H}_2\text{O} (\text{L Substrat})^{-1}$).

Farbmessung

Zusätzlich zur Farbbonitur wurde zur Bestimmung der Farbe der Sepalen auch eine Farbmessung mit einem Farbmeßgerät durchgeführt. Ein Vergleich von Abb. 3.2 mit Abb. 3.4 zeigt eine weitgehende Übereinstimmung von Farbbonitur und Farbabstand bei der Bewertung der Blaufärbung der Hortensiensepalen. Auch anhand des Parameters Farbabstand wurde mit jeder Steigerung des Al-Angebots eine Verbesserung der Blaufärbung gemittelt über alle Sorten nachgewiesen: von 3 ohne Al-Angebot über 37 und 45 auf 48 bei dem höchsten Al-Angebot. Bei Betrachtung jeder Sorte für sich wurde die Blaufärbung bei dem höchsten Al-Angebot nur bei der Sorte 'Renate Steiniger' noch signifikant verbessert im Vergleich zum mittleren Al-Angebot. Der Farbabstand der Kontrolle war größer als Null. Ursache hierfür ist, daß der Farbabstand nur den Betrag des Farbunterschiedes angibt. Der Farbabstand der Kontrollpflanzen wurde genau wie der Farbabstand nach Al-Behandlung mit einem gemittelten Wert der vier Kontrollpflanzen als Bezugsbasis berechnet. Abweichungen von diesem Mittelwert in unterschiedliche Richtungen erhielten kein unterschiedliches Vorzeichen und summierten sich bei der Mittelwertbildung.

Relativ zu den anderen Sorten wurde die Blaufärbung der Sorte 'Blaumeise' anhand des Farbabstands deutlich besser beurteilt als durch die Farbbonitur. Sie wies bei allen Al-Behandlungen den höchsten Farbabstand auf. Auch die Blaufärbung von 'Blauer Ball'

wurde durch den Farbabstand im Sortenvergleich besser bewertet als durch die Farbbonitur. Dies brachte 'Blauer Ball' bei mittlerem Al-Angebot auf den vorletzten und bei dem höchsten Al-Angebot sogar auf den drittletzten Rang.

Die relative Standardabweichung war beim Farbabstand deutlich kleiner als bei der Farbbonitur. Dies könnte auf einer größeren Meßgenauigkeit beruhen, ist jedoch vermutlich vorwiegend darauf zurückzuführen, daß der Farbabstand nur an der repräsentativen von den fünf Pflanzen aus einer Reihe gemessen wurde.

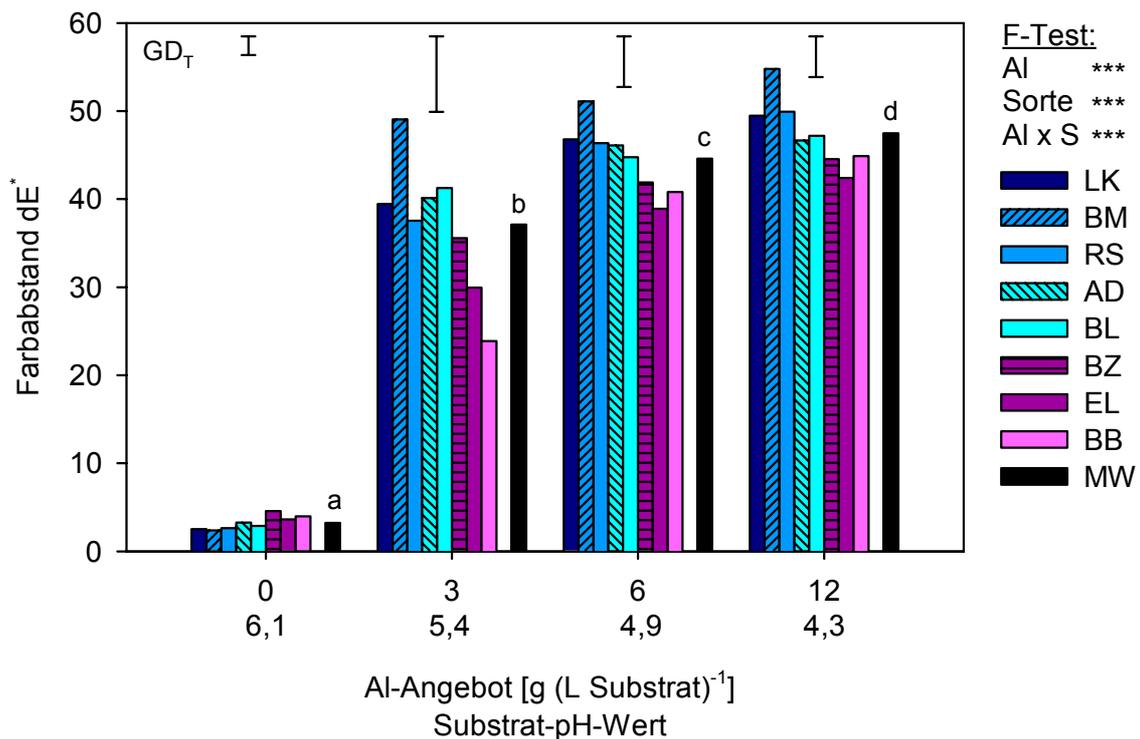


Abb. 3.4: Farbabstand der Sepalen von acht Hortensiensorten bei der Blüte im April 1998 in Abhängigkeit vom Al-Angebot ($\text{g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{H}_2\text{O}$ (L Substrat^{-1})). MW: Mittelwert über acht Sorten. Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden. $\text{GD}_{\text{T}, 5\%}$: für Sortenmittelwerte getrennt nach Al-Angebot. $n = 4$.

Beziehung zwischen Substrat-pH-Wert und Sepalenfarbe

Der gemessene pH-Wert im Substrat und die Sepalenfarbe waren signifikant negativ miteinander korreliert (Abb. 3.5). Dabei bestand zwischen pH-Wert und Farbbonitur ($r^2 = 0,66^{***}$, Spearmanscher Rangkorrelationskoeffizient: $r_s = 0,81^{***}$) eine etwas engere Beziehung als zwischen pH-Wert und Farbabstand ($r^2 = 0,58^{***}$). In Abhängigkeit vom gemessenen Substrat-pH-Wert lag die Blaufärbung der Sorten 'Adria', 'Blauer Zwerg' und 'Elbtal' unter dem Durchschnitt, die der anderen Sorten darüber. Bei definiertem gemessenem Substrat-pH-Wert wiesen die sehr leicht blau zu

färbende Sorte ‘Renate Steiniger’ und die nur schwer blau zu färbende Sorte ‘Blauer Ball’ jeweils eine ähnliche, überdurchschnittliche Blaufärbung auf.

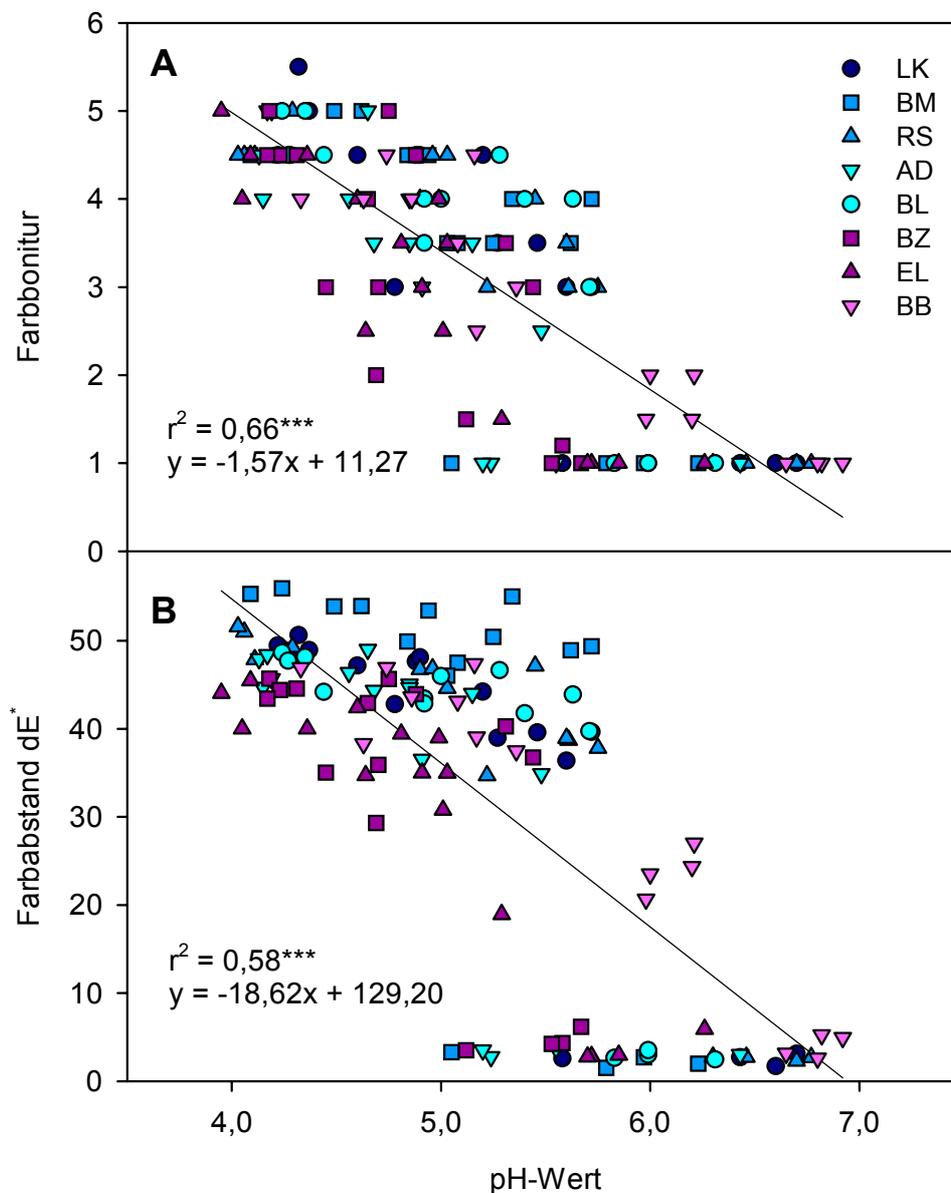


Abb. 3.5: Beziehung zwischen dem gemessenen pH-Wert im Substrat und der Farbbonitur (A) bzw. dem Farbabstand (B) der Sepalen. 8 Sorten mit jeweils 16 Wiederholungen.

3.1.3 Al- und Nährstoffgehalte der Sepalen

Jede Steigerung des Al-Angebots und die damit verbundene Absenkung des Substrat-pH-Werts führte zu einer signifikanten Zunahme des Al-Gehalts der Sepalen gemittelt über alle Sorten. Wie Abb. 3.6 zeigt, verdoppelte er sich von der niedrigen zur hohen Al-Behandlung von 0,5 auf 1,0 mg Al (g TS)⁻¹. Bei Betrachtung jeder Sorte für sich war der Al-Gehalt der Sepalen bei dem höchsten im Vergleich zum mittleren Al-Angebot

jedoch nur bei den Sorten ‘LK15’ und ‘Blaumeise’ signifikant erhöht. In den Kontrollen wurden im Vergleich zu den Al-Varianten nur sehr geringe Al-Gehalte nachgewiesen.

Überdurchschnittlich hohe Al-Gehalte in den Sepalen wiesen bei allen Al-Behandlungen die Sorten ‘Adria’, ‘Bläuling’ und ‘Blaumeise’ auf. Die Al-Gehalte von ‘Blauer Ball’ und ‘Elbtal’ lagen hingegen deutlich, die von ‘Renate Steiniger’ leicht unter dem Durchschnitt.

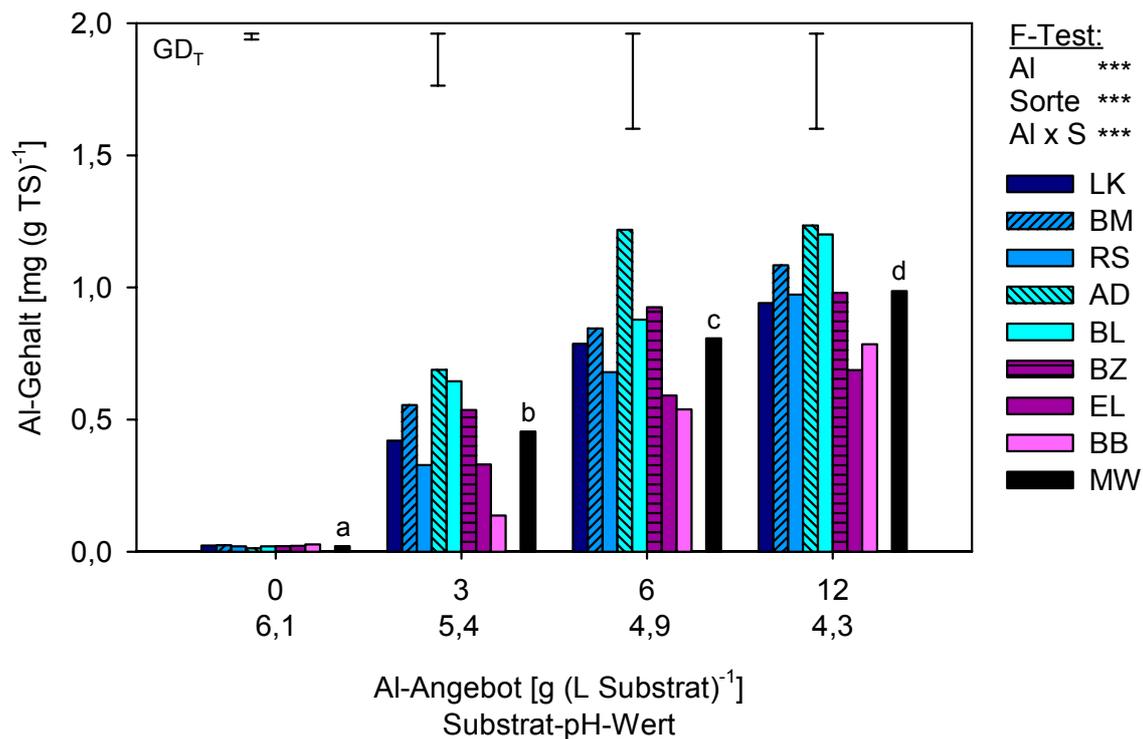


Abb. 3.6: Al-Gehalt der Sepalen von acht Hortensiensorten bei der Blüte im April 1998 in Abhängigkeit vom Al-Angebot ($\text{g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O} (\text{L Substrat})^{-1}$). MW: Mittelwert über acht Sorten. Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden. $\text{GD}_{\text{T}, 5\%}$: für Sortenmittelwerte getrennt nach Al-Angebot. $n = 4$.

Die Abb. 3.7 verdeutlicht den über alle Sorten signifikanten Zusammenhang zwischen der durch die Al-Behandlung erfolgenden Absenkung des Substrat-pH-Werts und dem Al-Gehalt der Sepalen ($r^2 = 0,64^{***}$), aber auch die bestehenden Sortenunterschiede. Auch bei definiertem Substrat-pH-Wert lagen die Al-Gehalte der Sorten ‘Bläuling’, ‘Adria’ und ‘Blaumeise’ über dem Durchschnitt. Die sehr leicht zu bläuenden Sorten ‘LK 15’ und ‘Renate Steiniger’ lagen hier jedoch zusammen mit der schwer zu bläuenden Sorte ‘Blauer Ball’ im Mittelfeld, so daß allein ‘Elbtal’ unter dem Durchschnitt lag.

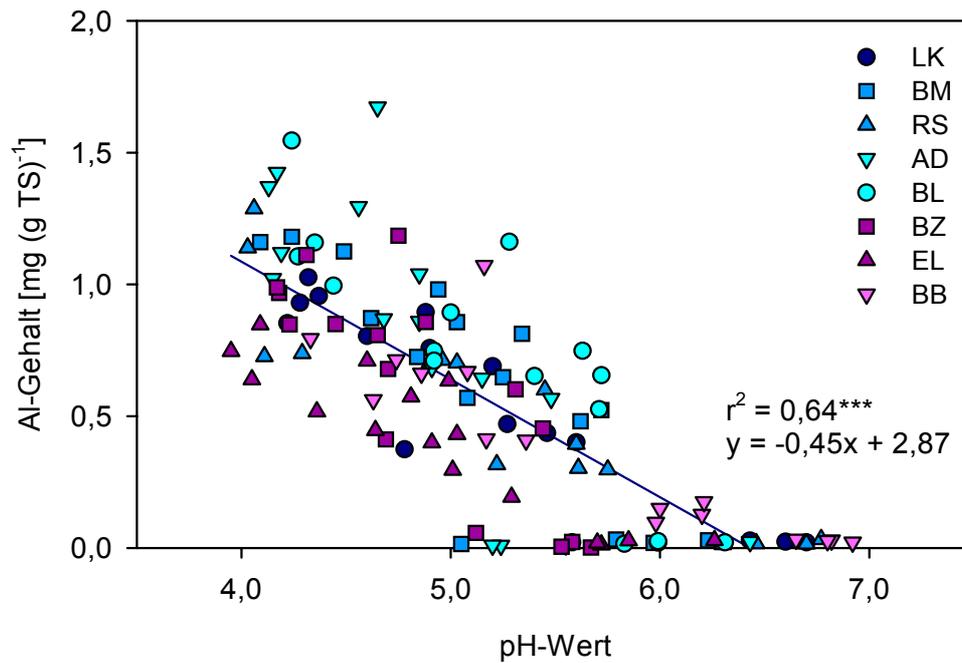


Abb. 3.7: Beziehung zwischen dem gemessenen pH-Wert im Substrat und dem Al-Gehalt der Sepalen. 8 Sorten mit jeweils 16 Wiederholungen.

Wie in Abb. 3.8 zu sehen, korrelierte der Al-Gehalt der Sepalen sowohl mit der Farbbonitur ($r^2 = 0,91^{***}$, Spearmanischer Rangkorrelationskoeffizient: $r_s = 0,91^{***}$) als auch mit dem Farbabstand ($r^2 = 0,96^{***}$) signifikant. Die Farbabstandswerte näherten sich bereits bei niedrigerem Al-Gehalt der Sepalen dem Maximum an als die Farbboniturwerte. Die Steigung der Farbabstandswerte war bei höheren Gehalten als $0,5 \text{ mg Al (g TS)}^{-1}$ weniger steil als bei den Farbboniturwerten. Die Sorten ‘LK15’, ‘Blaumeise’ und ‘Renate Steiniger’ waren bei gegebenem Al-Gehalt überdurchschnittlich blau, unterdurchschnittlich blau waren ‘Adria’, ‘Bläuling’ und ‘Blauer Zwerg’.

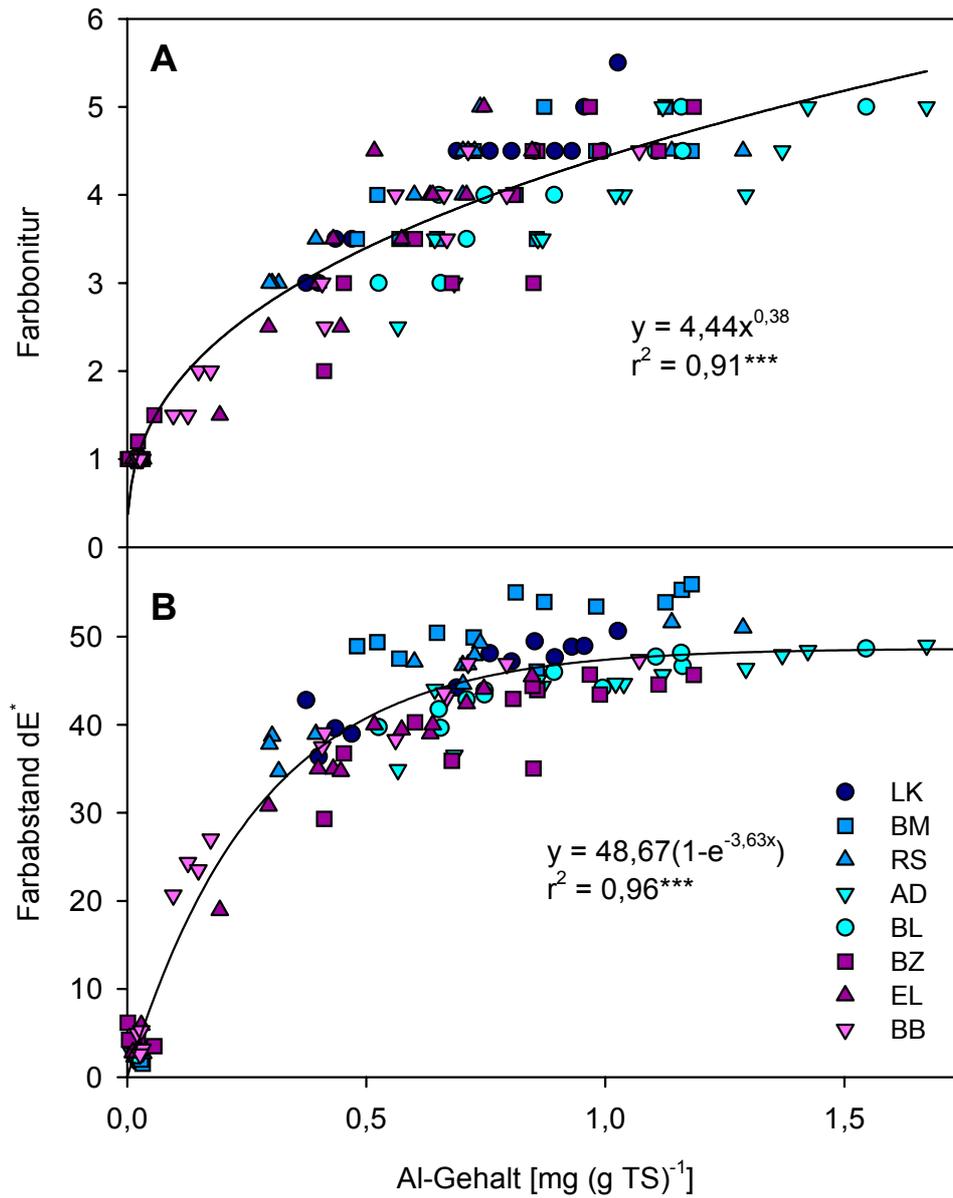


Abb. 3.8: Beziehung zwischen dem Al-Gehalt der Sepalen und der Farbbonitur (A) bzw. dem Farbabstand (B). 8 Sorten mit jeweils 16 Wiederholungen.

Tab. 3.1 zeigt die Gehalte an Kalium (K), Calcium (Ca), Phosphor (P) und Magnesium (Mg) in Sepalen im Mittel über alle Sorten und in Abhängigkeit von der Al-Behandlung. Während die Ca- und P-Gehalte mit steigendem Al-Angebot signifikant abnahmen, waren die K- und Mg-Gehalte nicht vermindert.

Tab. 3.1: Mineralstoffgehalte (Standardabweichung) in den Sepalen bei der Blüte im April 1998 in Abhängigkeit vom Al-Angebot ($\text{g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O}$ (L Substrat^{-1})). Mittelwerte (über acht Sorten) mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden. $n = 32$.

Al-Angebot $\text{g (L Substrat)}^{-1}$	K-Gehalt	Ca-Gehalt	P-Gehalt	Mg-Gehalt
	mg (g TS)^{-1}			
0	12,7 (1,6) a	5,0 (0,9) a	2,9 (0,4) a	1,8 (0,3) a
3	13,2 (2,1) a	4,6 (0,9) a	2,9 (0,6) a	2,1 (0,4) b
6	12,9 (1,9) a	4,0 (0,7) b	2,7 (0,5) b	2,0 (0,4) b
12	13,3 (2,1) a	3,6 (0,7) b	2,4 (0,5) c	2,0 (0,4) ab
Ergebnisse des F-Tests				
Al-Angebot	n.s.	***	***	**
Sorte	***	***	***	***
Al x Sorte	*	***	***	+

3.1.4 Wachstum

Das Frischgewicht der Sprosse wurde durch niedriges und mittleres Al-Angebot nicht negativ beeinflusst (Abb. 3.9). Das niedrige Al-Angebot führte tendenziell sogar zu einer leichten Erhöhung des Frischgewichts. Erst bei hohem Al-Angebot war das Frischgewicht gemittelt über alle Sorten signifikant reduziert, gegenüber der Kontrolle um 14 %.

Bei hohem Al-Angebot entsprach die Reihenfolge der Sorten der für die Farbbonitur: Je schlechter die Farbbonitur, desto geringer war auch das Frischgewicht. Aus dieser Reihenfolge wichen nur die Sorten 'Blauer Zwerg' und 'Elbtal' nach oben ab. 'Elbtal' wies das höchste, 'Blauer Ball' das niedrigste Frischgewicht auf. Dies waren die beiden Sorten, die die zwei letzten Ränge bei der Farbbonitur belegt hatten.

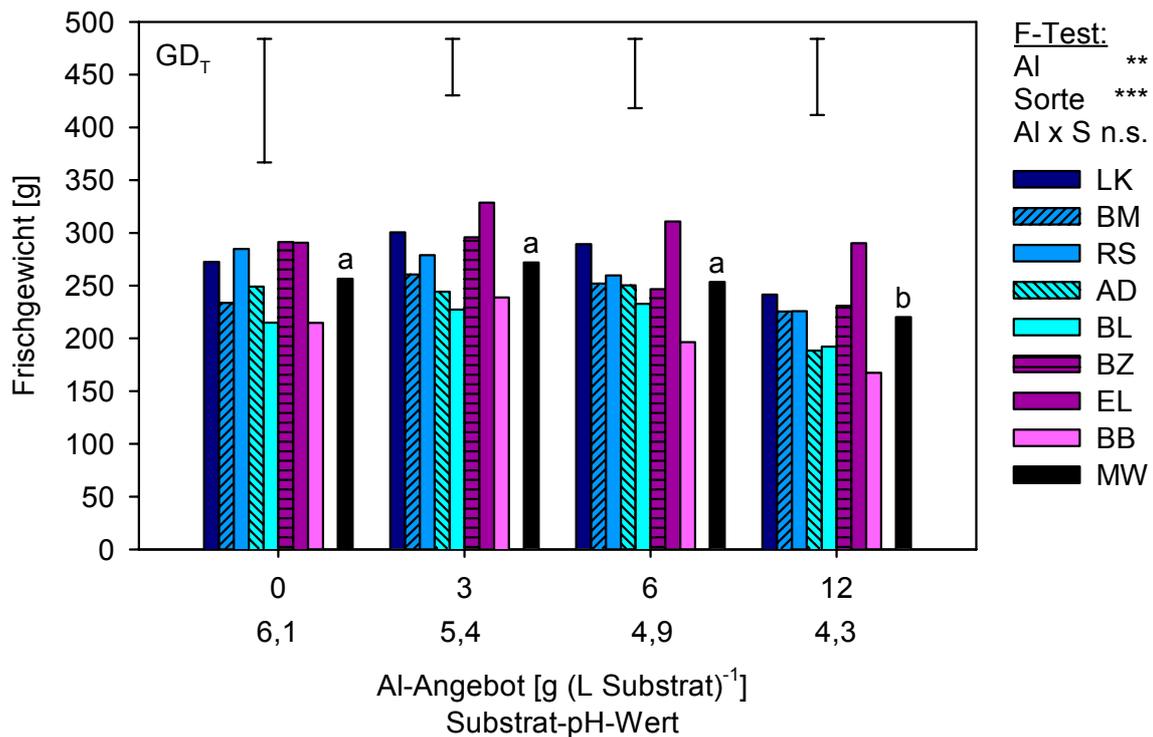


Abb. 3.9: Frischgewicht des Sprosses bei der Blüte im April 1998 in Abhängigkeit vom Al-Angebot ($\text{g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O (L Substrat)}^{-1}$). MW: Mittelwert über acht Sorten. Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden. $\text{GD}_{\text{T}, 5\%}$: für Sortenmittelwerte getrennt nach Al-Angebot. $n = 4$.

3.1.5 Al und organische Säuren im Xylemsaft – inklusiv berechneter Al-Speziesverteilung

Um den Transport von Al in die Sepalen und die Form der Bindung von Al im Xylemsaft zu untersuchen, wurden im Xylemsaft von drei unterschiedlich leicht blau zu färbenden Sorten die Konzentrationen an Al, verschiedenen organischen Säuren und der pH-Wert bestimmt.

Die Al-Konzentration im Xylemsaft wurde bereits durch die niedrige Gabe von 3 g Al-Sulfat $(\text{L Substrat})^{-1}$ bei allen drei Sorten gegenüber der Kontrolle mindestens vervierfacht (Abb. 3.10). Jedoch erst das mittlere Al-Angebot erhöhte die Al-Konzentration im Xylemsaft gegenüber der Kontrolle bei allen Sorten signifikant. Bei den Sorten ‘Renate Steiniger’ und ‘Adria’ war bei mittlerem Al-Angebot mit 0,30 bzw. 0,33 mM bereits das Maximum der Al-Konzentration erreicht. Bei ‘Blauer Ball’ hingegen war die Al-Konzentration mit 0,12 mM weniger als halb so hoch und wurde durch das höchste Al-Angebot signifikant auf 0,24 mM verdoppelt. Die Al-Konzentration von ‘Blauer Ball’ lag bei höchstem Al-Angebot zwischen der der beiden anderen Sorten.

Wie Abb. 3.10 zeigt, stimmte die Citratkonzentration im Xylemsaft quantitativ weitgehend mit der Al-Konzentration überein. Bei den Sorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' nahm die Citratkonzentration mit steigender Al-Behandlung signifikant zu. Da jedoch bei der Kontrolle von 'Adria' nur bei einer Pflanze genügend Xylemsaft für die Bestimmung von organischen Säuren gewonnen werden konnte, war hier keine signifikante Zunahme der Citratkonzentration mit steigendem Al-Angebot nachzuweisen. Wie bei der Al-Konzentration war auch bei der Citratkonzentration bei 'Renate Steiniger' und 'Adria' bereits bei mittlerem Al-Angebot das Maximum erreicht.

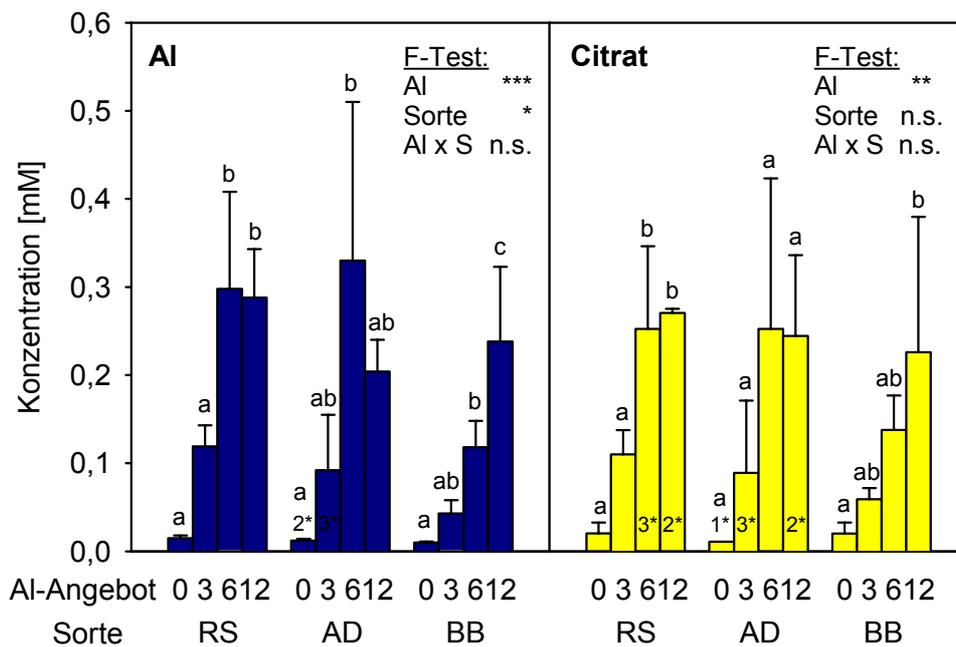


Abb. 3.10: Al- und Citratkonzentration im Xylemsaft von drei Hortensiensorten bei der Blüte im April 1998 in Abhängigkeit vom Al-Angebot ($\text{g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{H}_2\text{O} (\text{L Substrat})^{-1}$). Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (Tukey-Test, $p < 0,05$). $n = 4$ (* kennzeichnet eine von 4 abweichende Anzahl an Wiederholungen).

Im Vergleich zu den anderen organischen Säuren spielte Citrat quantitativ jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Wesentlich höher waren die Konzentrationen an Malat, Malonat und Succinat, sie betragen circa das 8-, 4- und 28fache der Citratkonzentration (Abb. 3.11A, Tab. 3.2). Auch die Malat- und Malonatkonzentrationen nahmen gemittelt über die drei Sorten mit steigendem Al-Angebot signifikant, die Succinatkonzentration tendenziell zu. Gemittelt über alle Sorten und Al-Behandlungsstufen lag der Anteil von Succinat-, Malat-, Malonat- und Citratkonzentrationen bei circa 70, 20, 10 und 2 % an der Gesamtkonzentration aller gemessenen organischen Säuren. Trotzdem war Al nach Berechnungen mit dem Spezifikationsprogramm GEOCHEM PC zu 40 bis 90 % mit

Citrat komplexiert (Abb. 3.11B), zu 5 bis 55% mit Malonat, zu 1 bis 14 % mit Malat und zu weniger als 4 % mit Succinat. Bei 'Blauer Ball' war Al nur zu 5 bis 8 % mit Malonat komplexiert und spielte somit gemäß diesen GEOCHEM-Berechnungen eine deutlich geringere Rolle für die Komplexierung von Al als bei 'Renate Steiniger' und 'Adria', bei denen Al zu 16 bis 55 % mit Malonat komplexiert war. Bei 'Adria' hatte die Komplexierung von Al durch Malat keine Bedeutung, weniger als 1 % Al war hier mit Malat komplexiert.

Die Konzentrationen an Oxoglutarat, Oxalat und Fumarat lagen mindestens um den Faktor 10 niedriger als an Citrat und spielten auch nach der Berechnung mit GEOCHEM keine Rolle bei der Komplexierung von Al.

Bei der Berechnung der Al-Spezies mit GEOCHEM-PC wurden neben den Konzentrationen der Kationen K, Ca, Al, Mg, Mn, Zn, B und der organischen Säureanionen Citrat, Malat, Malonat, Succinat und Oxalat auch die Konzentrationen der anorganischen Anionen NO_3 , PO_4 , SO_4 und Cl berücksichtigt. Die Konzentrationen der anorganischen Anionen sind der Tab. 8.1 im Anhang zu entnehmen.

Da nicht mehr von allen Xylemsäften ein ausreichendes Volumen vorhanden war, um einen für jede der verschiedenen Sorten und Al-Behandlungsstufen repräsentativen pH-Wert zu bestimmen, wurde bei den Berechnungen mit GEOCHEM-PC mit dem Mittelwert über alle Sorten und Behandlungsstufen von 6,1 gerechnet. Tendenziell lag der pH-Wert der Kontrollen bei 5,6 bis 5,7 und war nach Al-Behandlung auf 5,9 bis 6,6 erhöht.

Die Summe der Konzentrationen aller gemessenen organischen Säuren gemittelt über alle drei Sorten war nach Al-Behandlung signifikant höher als ohne Al-Behandlung (Abb. 3.11A). Bei der Sorte 'Renate Steiniger' war die Summe der Konzentrationen organischer Säuren bei niedrigem und mittlerem Al-Angebot mit circa 16 mM ungefähr doppelt so hoch wie bei 'Adria' und 'Blauer Ball', bei hohem Al-Angebot lag sie mit 11 mM nur tendenziell über der der beiden anderen Sorten.

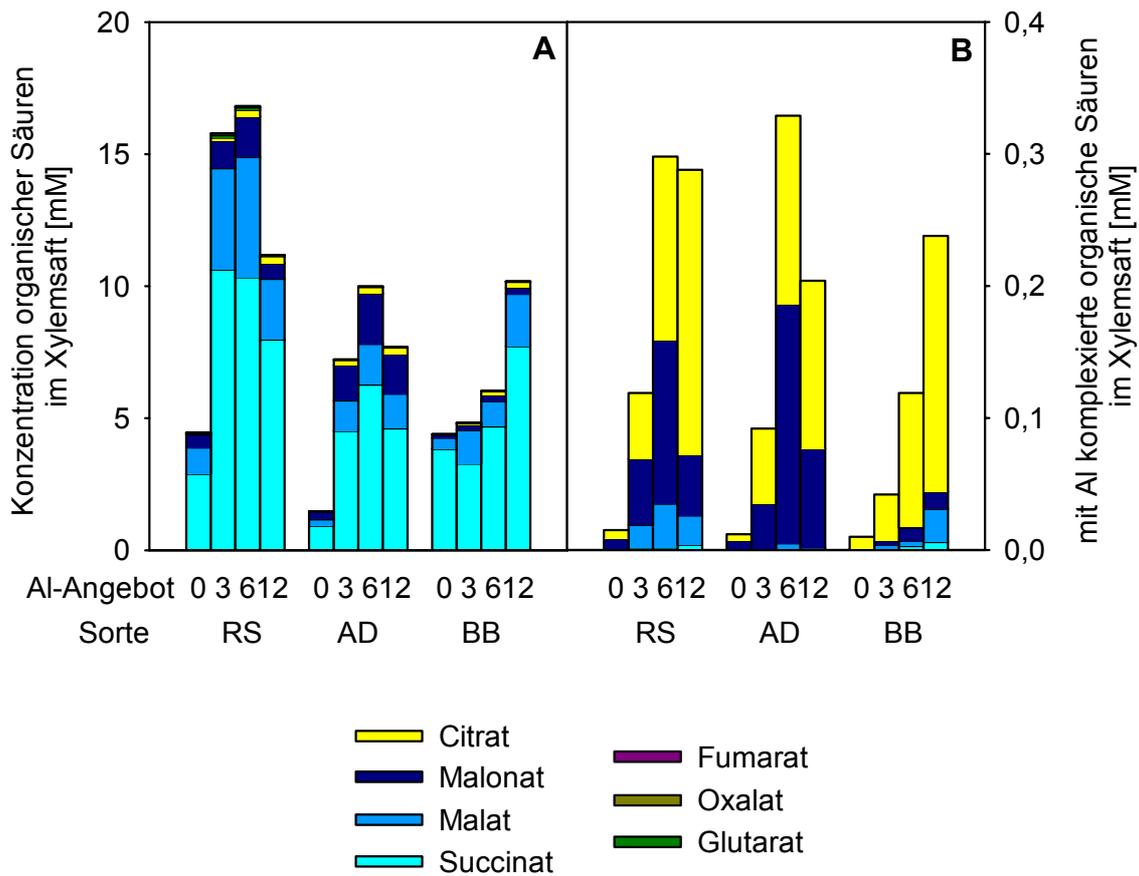


Abb. 3.11: Konzentration organischer Säuren (A) und der nach Berechnung mit GEOCHEM PC mit Al komplexierten organischen Säuren (B) im Xylemsaft von drei Hortensiensorten bei der Blüte im April 1998 in Abhängigkeit vom Al-Angebot ($\text{g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O} (\text{L Substrat})^{-1}$).

Tab. 3.2: Statistik zu Abb. 3.11 A

	Citrat	Malat	Malonat	Succinat	Glutarat	Oxalat	Fumarat
Ergebnisse des F-Tests							
Al-Gabe	**	**	*	+	+	n.s.	n.s.
Sorte	n.s.	***	***	+	***	***	+
Al x Sorte	n.s.	*	n.s.	n.s.	+	+	n.s.
$\text{GD}_{T,5\%}$							
RS	0,12	1,83	1,07	12,67	0,12	0,05	0,05
AD	0,68	3,53	0,93	10,26	0,05	0,05	0,01
BB	0,17	1,4	0,14	6,61	0,03	0,01	0,01
0	0,07	2,33	1,56	16,71	0,05	0,07	0,07
3	0,11	1,39	0,77	11,18	0,05	0,03	0,02
6	0,32	2,65	1,57	5,18	0,09	0,02	0,02
12	0,69	3,39	0,76	14,08	0,05	0,02	0,02

Um den möglichen Beitrag der verschiedenen Säuren zur Komplexierung von Al im Xylemsaft abzuschätzen, wurde die Al-Konzentration mit der Konzentration organischer Säuren korreliert (Abb. 3.12).

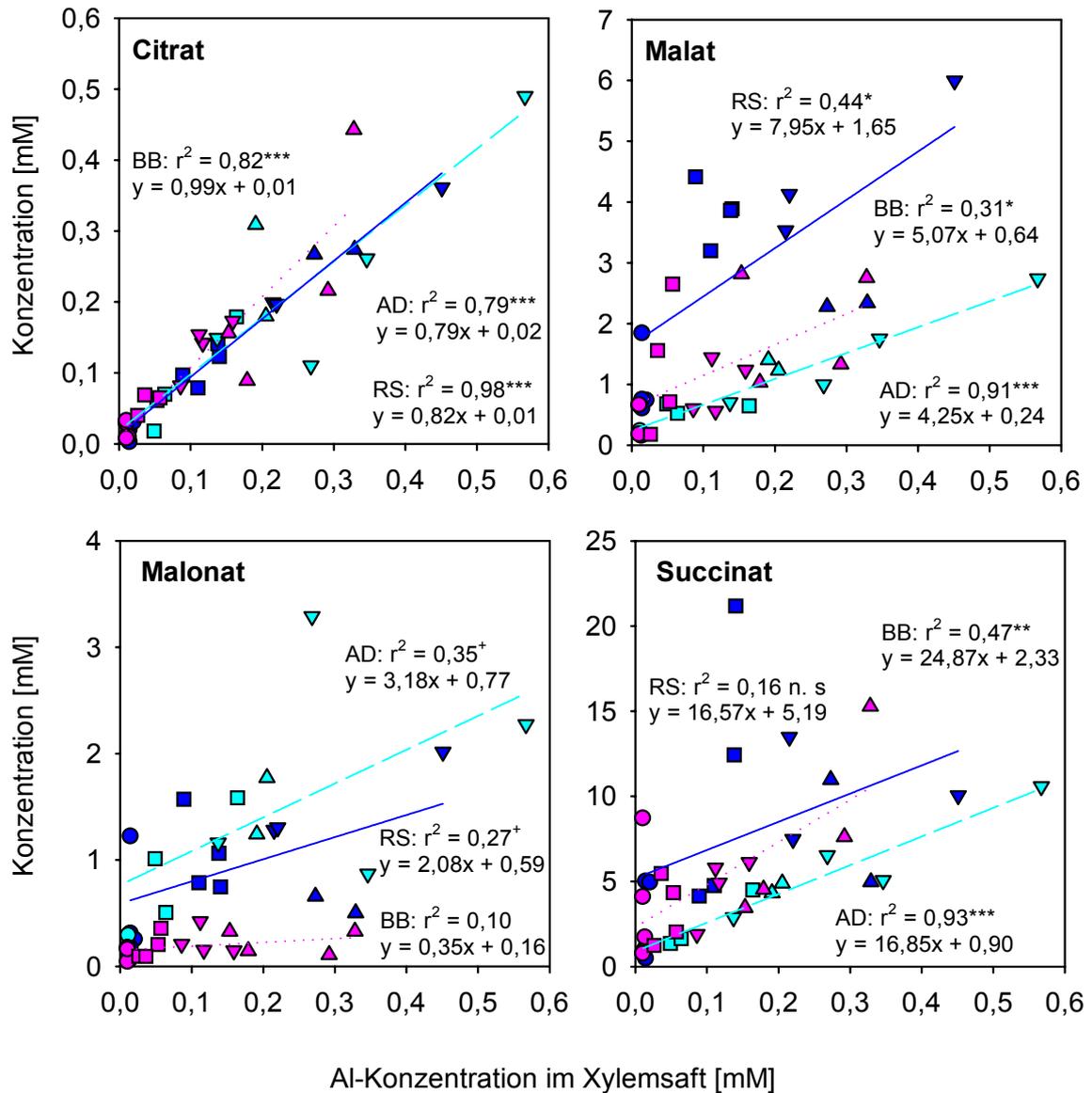
Die Citratkonzentration korrelierte von den bestimmten organischen Säuren am engsten mit der Al-Konzentration. Die Beziehung war mit Bestimmtheitsmaßen für ‘Renate Steiniger’, ‘Adria’ und ‘Blauer Ball’ von 0,98, 0,79 und 0,82 mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 0,1$ % signifikant. Dieses Verhältnis war zudem fast äquimolar. Überraschenderweise war das Verhältnis zwischen Citrat und Al bei ‘Blauer Ball’ nicht kleiner, sondern geringfügig größer als bei ‘Renate Steiniger’ und ‘Adria’.

Auch die Beziehung zwischen der Malat- und Al-Konzentration war bei allen drei Sorten signifikant (r^2 für RS: 0,44*, AD: 0,91***, BB: 0,31*), allerdings mit Ausnahme von ‘Adria’ weniger eng als für Citrat. Die Steigung der Regressionsgerade der Malat- und Al-Konzentration betrug bei den Sorten ‘Renate Steiniger’, ‘Blauer Ball’ bzw. ‘Adria’ 8, 5 bzw. 4.

Zwischen Malonat- und Al-Konzentration bestand bei den Sorten ‘Renate Steiniger’ und ‘Adria’ nur eine sehr lose Beziehung (r^2 : 0,27⁺, 0,35⁺). Bei ‘Blauer Ball’ war die Steigung der Regressionsgerade von Malonat- und Al-Konzentration mit 0,4 deutlich niedriger als für ‘Renate Steiniger’ und ‘Adria’ mit 2, und 3,2.

Für die Succinatkonzentration war die Beziehung zur Al-Konzentration nur für ‘Adria’ und ‘Blauer Ball’ signifikant (r^2 : 0,93***, 0,47**). Die Steigung der Regressionsgerade lag zwischen 17 und 25.

Die Konzentrationen an Glutarat, Oxalat und Fumarat waren bei keiner Sorte signifikant mit der Al-Konzentration im Xylemsaft korreliert (nicht dargestellt). Die einzige Ausnahme hiervon bildete die Beziehung zwischen der Glutarat- und der Al-Konzentration bei ‘Adria’ ($r^2 = 0,89$ ***).



Al-Angebot
 0 3 6 12 Sorte

● ■ ▼ ▲ RS
 ● ■ ▼ ▲ AD
 ● ■ ▼ ▲ BB

Abb. 3.12: Beziehung zwischen der Al-Konzentration und den Konzentrationen an Citrat, Malat, Malonat und Succinat im Xylemsaft von drei Hortensien-sorten bei der Blüte im April 1998 nach unterschiedlichem Al-Angebot ($\text{g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O} (\text{L Substrat})^{-1}$).

Sowohl die Al- als auch die Citratkonzentration im Xylemsaft waren eng mit dem Al-Gehalt der Sepalen korreliert (Abb. 3.13). Bemerkenswerterweise war diese Korrelation für die Citratkonzentration bei den Sorten ‘Renate Steiniger’ und ‘Adria’ ($r^2 = 0,75^{***}$, $0,71^{**}$) sogar enger als für die Al-Konzentration im Xylemsaft ($r^2 = 0,69^{***}$, $0,53^*$). Signifikante Beziehungen zum Al-Gehalt der Sepalen bestanden zusätzlich bei ‘Adria’ für Malat ($r^2 = 0,59^{**}$) und Succinat ($r^2 = 0,53^*$, nicht dargestellt) und bei ‘Blauer Ball’ für Malonat ($r^2 = 0,27^*$, nicht dargestellt) und Succinat ($r^2 = 0,26^*$, nicht dargestellt).

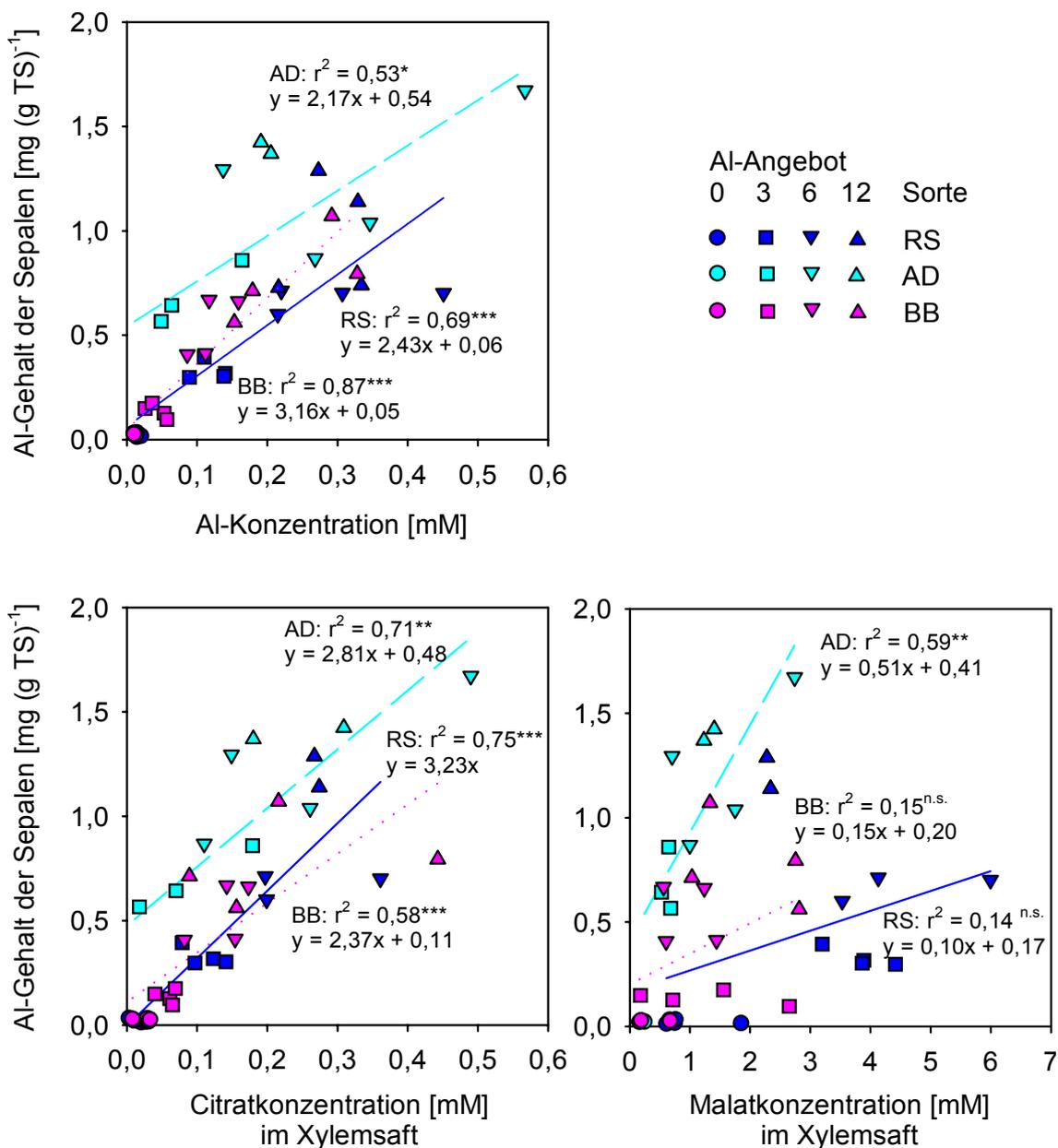


Abb. 3.13: Beziehung zwischen Al-, Citrat- und Malatkonzentration im Xylemsaft und dem Al-Gehalt der Sepalen von drei Hortensiensorten bei der Blüte im April 1998 nach unterschiedlichem Al-Angebot ($\text{g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O (L Substrat)}^{-1}$).

3.2 Einfluß von Al auf Wurzelmorphologie und Al-Lokalisation in der Wurzel

Um den Einfluß von Al auf die Morphologie der Wurzelspitze zu untersuchen, wurden Wurzelspitzen von vier bewurzelten Stecklingen der Sorte ‚Renate Steiniger‘ ohne vorherige Al-Behandlung mit Wurzelspitzen von vier Pflanzen nach dreitägiger Al-Behandlung verglichen (2.2.2). Abb. 3.14 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen von Wurzelspitzen nach dreitägiger Behandlung mit 0 und 500 μM AlCl_3 im Längsschnitt. Nach Al-Behandlung waren im Vergleich zur Kontrolle folgende Veränderungen zu beobachten: a) Die Wurzelspitzen waren stärker abgerundet. Ihr Durchmesser an der dicksten Stelle war jedoch nicht deutlich erhöht. b) Die Zellen der äußeren zwei bis drei Zellagen der Wurzelspitze waren auffällig vergrößert. c) Die Anzahl und Größe von Vesikeln und Vakuolen nahm in diesen Zellen deutlich zu. In der äußersten Zellschicht waren die Vakuolen am größten. d) In diesen Vesikeln und Vakuolen waren zum Teil körnige Ablagerungen zu erkennen. Nach Al-Behandlung wurde eine erhöhte Anzahl und Größe dieser körnigen Ablagerungen beobachtet. e) Die Zellstreckung begann bereits in geringer Entfernung von der Wurzelspitze. Die vergrößerten Zellen im Randbereich der Wurzelspitze, die erhöhte Anzahl und Größe an Vesikeln, Vakuolen und Ablagerungen waren auch in Querschnitten zu erkennen (Abb. 3.15).

Noch deutlicher waren die Vakuolen und Ablagerungen auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu beobachten (Abb. 3.16). In diesen Ablagerungen wurde mittels EELS nur nach Al-Behandlung der Wurzeln Al nachgewiesen. Ohne Al-Behandlung der Wurzel wiesen sechs EELS-Messungen in Ablagerungen in Rhizodermiszellen und in den vier äußeren Cortezellen keinen „Peak“ für Al auf. Nach Al-Behandlung fiel der Al-Nachweis mittels EELS in je vier dieser Ablagerungen in Wurzelspitzen von zwei Pflanzen positiv aus. Abb. 3.17 zeigt jeweils ein typisches EELS-Spektrum dieser Ablagerungen in Wurzeln ohne bzw. mit Al-Behandlung. In Übereinstimmung hiermit wurde Al auch durch ESI nach der Al-Behandlung in diesen Ablagerungen lokalisiert, während auf dem Bild der Kontrollen kein Al nachzuweisen war (Abb. 3.18, Abb. 3.19).

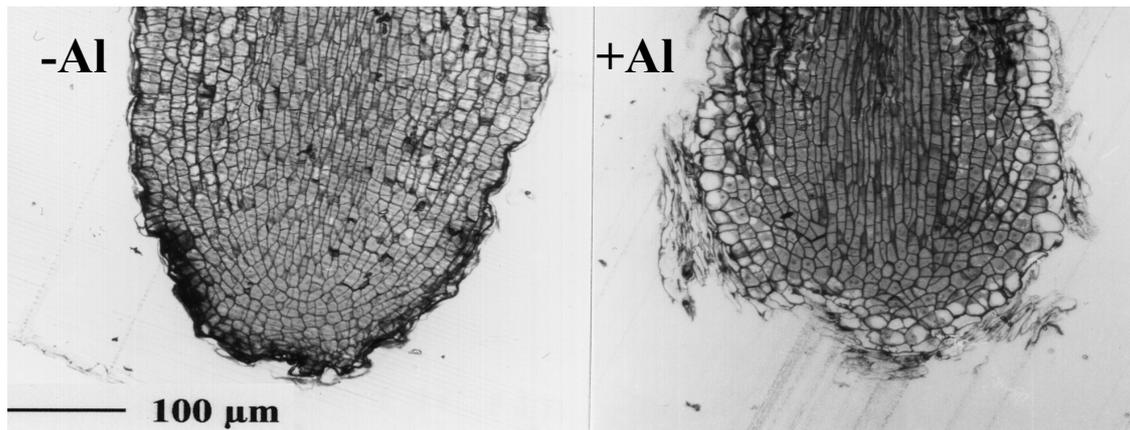


Abb. 3.14: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Wurzelspitzen im Längsschnitt nach dreitägiger Behandlung der fünf Wochen alten Hortensienstecklinge mit 0 (-Al) und 500 µM AlCl₃ (+Al).

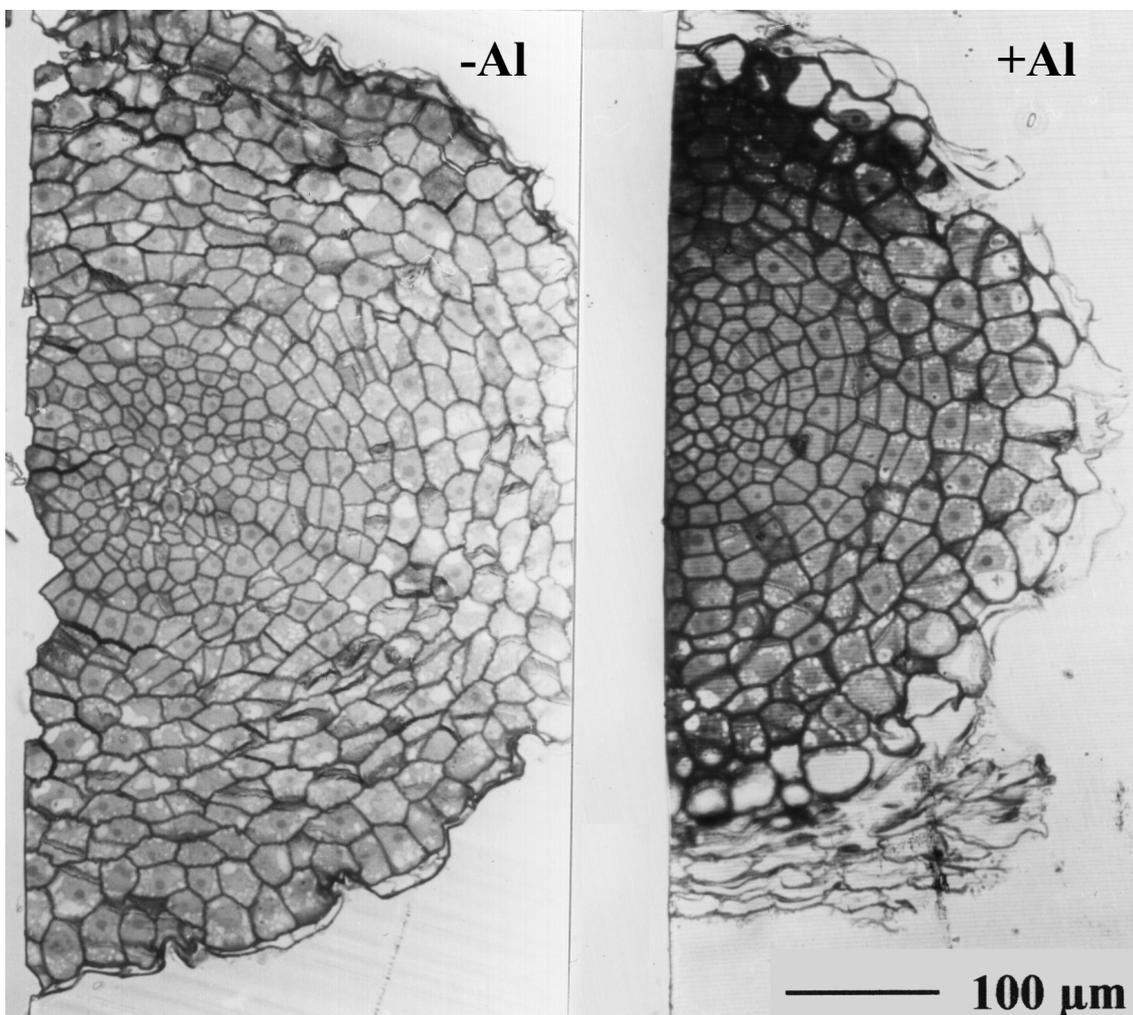


Abb. 3.15: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Wurzelspitzen im Querschnitt nach dreitägiger Behandlung der fünf Wochen alten Hortensienstecklinge mit 0 (-Al) und 500 µM AlCl₃ (+Al).

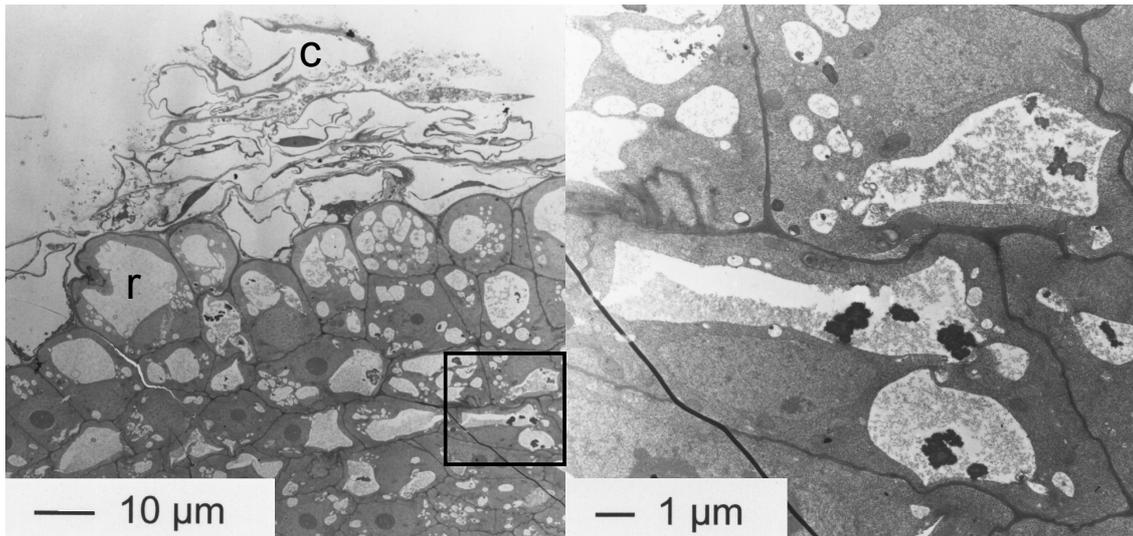


Abb. 3.16: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Wurzelspitzen im Querschnitt nach dreitägiger Behandlung der 5 Wochen alten Hortensienstecklinge mit $500 \mu\text{M AlCl}_3$: Deformierte Kalyptrazellen (c), Rhizodermis (r), und Cortex. Rahmen markiert Ausschnittvergrößerung von vakuolären Ablagerungen in Cortexzellen (rechts).

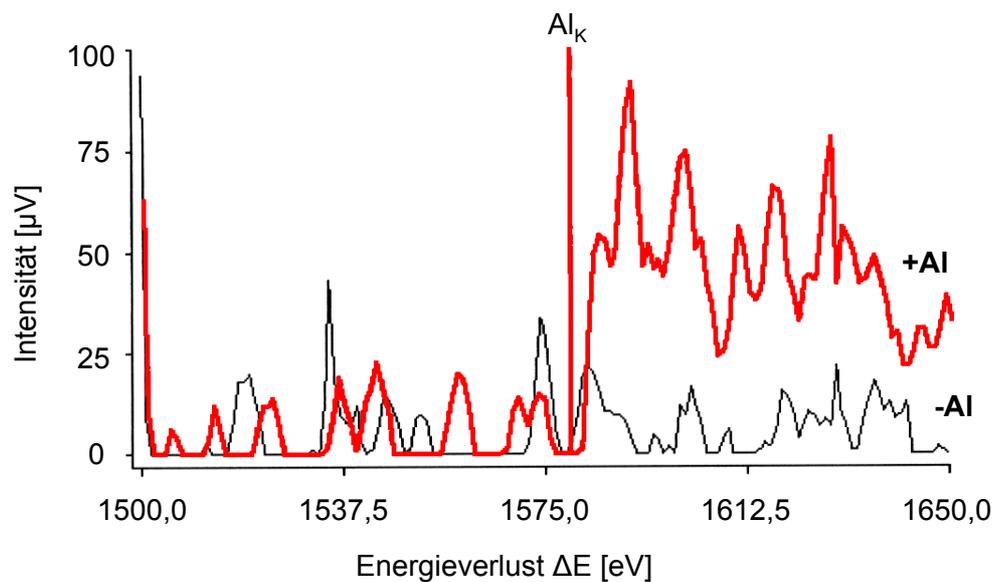


Abb. 3.17: EELS-Spektren von vakuolären Ablagerungen in äußeren Cortexzellen nach dreitägiger Behandlung der 5 Wochen alten Hortensienstecklinge mit (-Al) 0 und (+Al) $500 \mu\text{M AlCl}_3$.

Im Vergleich zur Transmissionselektronenmikroskopie (Abb. 3.16) werden durch ESI schwarz und weiß invertiert, die elektronendichten Ablagerung werden deshalb durch ESI hell dargestellt. In den Wänden der Rhizodermis- und äußeren Cortezzellen fiel der Al-Nachweis grundsätzlich negativ aus, sowohl mittels EELS als auch mittels ESI. Auch im Cytoplasma und in Vesikeln in der Nähe von erkennbaren Ablagerungen war Al nicht nachzuweisen.

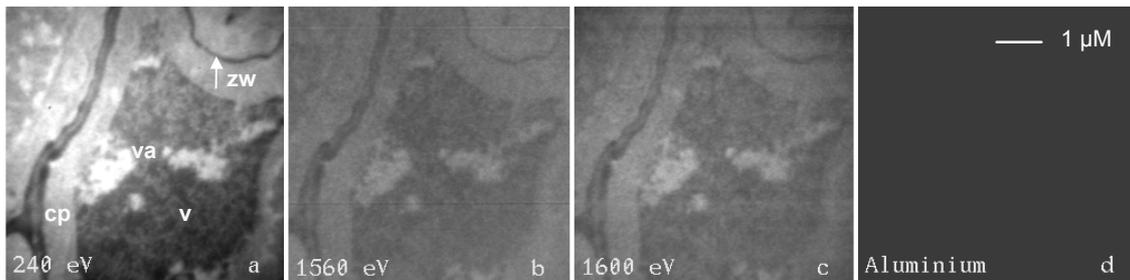


Abb. 3.18: ESI-Aufnahmen von vakuolären Ablagerungen in einer äußeren Cortezelle von einer Wurzelspitze nach dreitägiger Behandlung der 5 Wochen alten Hortensienstecklinge mit $0 \mu\text{M}$ AlCl_3 . (a) Übersicht bei 240 eV mit Zellwand (zw), Cytoplasma (cp) und Vakuole (v) mit Ablagerungen (va), (b) nicht Al-spezifischer Hintergrund bei 1560 eV, (c) Al-spezifische Aufnahme plus nicht Al-spezifischer Hintergrund bei 1600 eV, (d) Al-Verteilung in der gezeigten Cortezelle (a) (errechnetes Differenzbild von (c) - (b)).

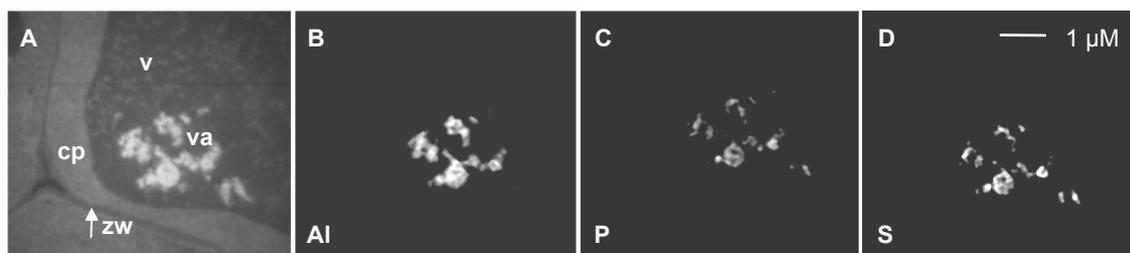


Abb. 3.19: ESI-Aufnahmen von vakuolären Ablagerungen in einer äußeren Cortezelle von einer Wurzelspitze nach dreitägiger Behandlung der 5 Wochen alten Hortensienstecklinge mit $500 \mu\text{M}$ AlCl_3 . (A) Übersicht bei 240 eV mit Zellwand (zw), Cytoplasma (cp) und Vakuole (v) mit Ablagerungen (va). (B), (C) und (D) zeigen die Al-, P- und S-Verteilung in der gezeigten Cortezelle (A).

Aufgrund ihrer hohen Ladungsdichte sind Al-Ionen in der Lage, Ca-Ionen von ihren Bindungsplätzen zu verdrängen. Ob ein Austausch von Ca durch Al in Ablagerungen stattgefunden haben könnte, sollten Untersuchungen mittels EELS klären. In vier verschiedenen Ablagerungen einer Kontrollwurzel war jedoch kein Ca nachweisbar. Zur Untersuchung der Zusammensetzung der Ablagerungen wurden EELS-Spektren und ESI-Bilder für die Elemente P und S aufgenommen. Während der Nachweis für diese Elemente in Kontrollwurzeln negativ ausfiel, wurde nach Al-Behandlung eine Kollokalisierung von Al, P und S festgestellt (Abb. 3.19).

Der Aufbau der Wurzel wurde anhand von Wurzelquerschnitten von der Wurzelspitze bis zu einer Entfernung von 8 cm vom Apex untersucht. Abb. 3.20 zeigt ausgewählte lichtmikroskopische Aufnahmen dieser Wurzelquerschnitte. Bereits in circa 1 mm Entfernung von der Wurzelspitze wurden die ersten Xylemelemente beobachtet (nicht dargestellt). In 1 cm Entfernung war die Unterteilung in Rinde und Zentralzylinder bereits deutlich zu erkennen. Die Zellen der Xylemstränge ließen sich an ihren verdickten Wänden leicht identifizieren. In 2 cm Entfernung war auch das Phloem zwischen den drei Xylemsträngen ausgeprägt. In 4 cm Entfernung waren außerdem die Wände der Zellen in der Mitte des Zentralzylinders verdickt und verholzt. In 7 cm Entfernung war der gesamte zentrale Bereich des Zentralzylinders mit verholzten, dickwandigen Zellen ausgefüllt. Diese werden in ihrer Gesamtheit als Holzteil (Xylem) bezeichnet. Peripher zum Holzteil sind drei halbmondförmig angeordnete Zellverbände des Siebteils (Phloem) zu erkennen, zwischen Xylem und Phloem die in radialer Richtung gestapelt erscheinenden Kambiumzellen. Die Anzahl der Xylemstränge von unterschiedlichen Wurzeln derselben Pflanze variierte zwischen zwei und vier.

Konträr zur Wurzelspitze wurden in mehr als 1 cm Entfernung von der Wurzelspitze keine auffälligen Unterschiede zwischen den Al behandelten und den Kontrollwurzeln beobachtet.

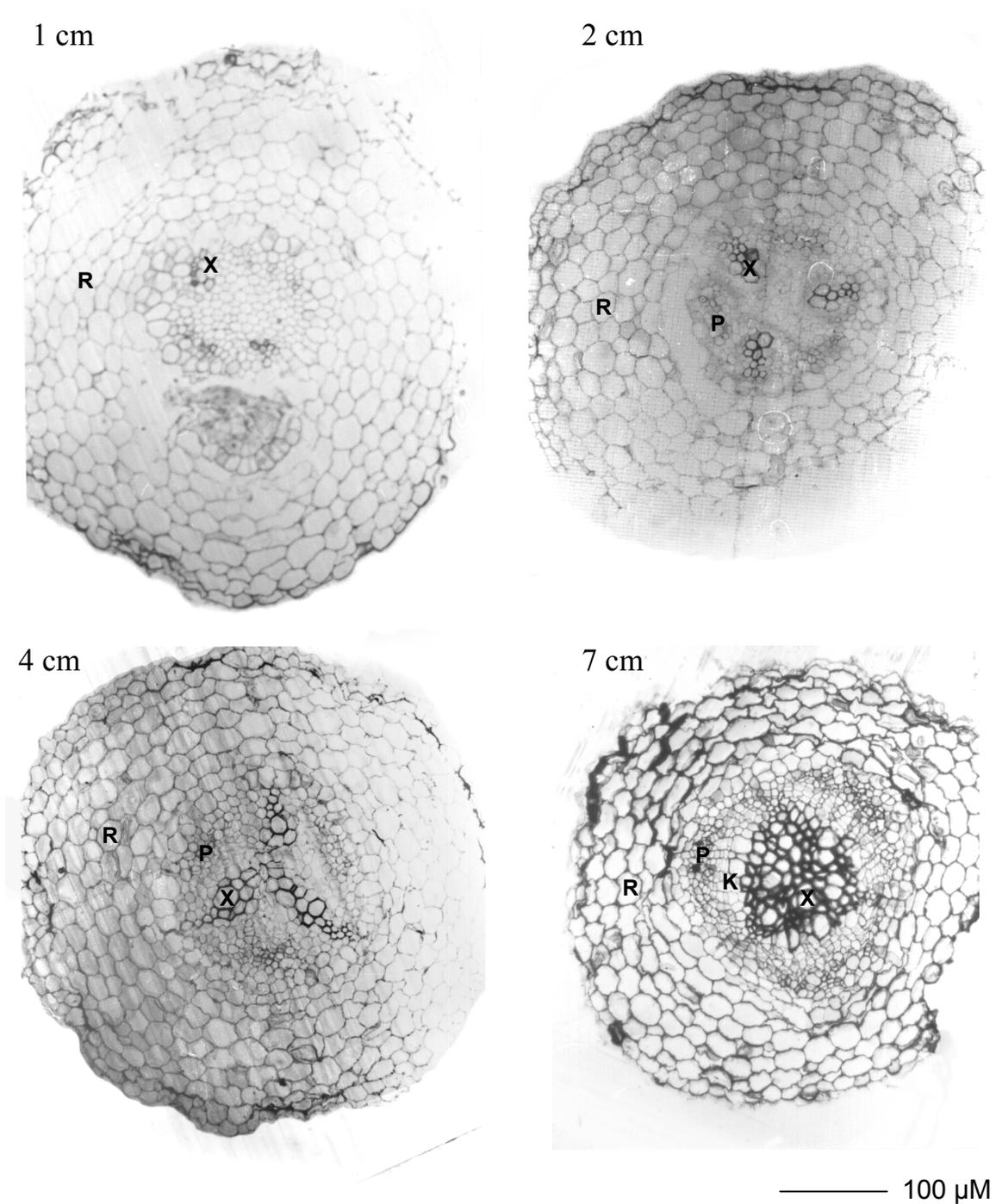


Abb. 3.20: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Wurzelquerschnitten in 1, 2, 4 und 7 cm Entfernung von der Wurzelspitze 13 Wochen alter Hortensienstecklinge. Rinde: R, Xylem: X, Phloem: P, Kambium: K.

3.3 Einfluß der Al-Form auf Al-Aufnahme, -Verlagerung und -Toxizität

Zur Charakterisierung der Al-Aufnahme, -Verlagerung und -Toxizität verschiedener Al-Formen wurden bewurzelte Stecklinge der Sorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' für zwei Tage in Nährlösung mit Al-Chlorid, -Malat und -Citrat bei einem pH-Wert von 4,3 und mit Al-Malat bei einem pH-Wert von 6,0 kultiviert (2.2.3).

3.3.1 Al-Speziesverteilung in der Nährlösung

Die Al-Speziesverteilung der vier Nährlösungsvarianten zu Beginn und Ende der Al-Behandlung ist in Abb. 3.21 dargestellt. In dieser Abb. wurde das mit Aluminon nachgewiesene Al als monomer bezeichnet. Der Anteil an komplexiertem Al wurde berechnet als Differenz aus mit dem ICP gemessenem Al und dem monomeren Al. Da vor der Al-Bestimmung mittels ICP die Nährlösung durch Membranfilter (Porendurchmesser: 0,2 µm) filtriert wurde, um ausgefallenes, partikuläres Al zu entfernen, sollte die Summe aus monomerem und komplexiertem Al das gelöste Al repräsentieren. Aufgrund der von den Pflanzen aufgenommenen Al-Mengen wurde die entsprechende Verminderung der Al-Konzentration der Nährlösung berechnet.

Zu Beginn der Al-Behandlung ließen sich in den Varianten Al-Chlorid, -Malat und -Citrat (pH 4,3) 95 bis 100 % der 500 µM Al in gelöster Form mittels ICP wiederfinden. In der Al-Malat-Variante (pH 6,0) waren hingegen nur 40 % wiederzufinden. In der Al-Chlorid-Variante lag das gesamte gelöste Al in monomerer Form vor. Durch Zugabe von 750 µM Malat sank der Al_{mono}-Anteil auf 50 %. Am niedrigsten war der Al_{mono}-Anteil mit 10 % in der Citrat-Variante, bei der Al-Malat-Variante (pH 6,0) betrug er 60 %.

Im Verlauf der Al-Behandlung nahm die Konzentration an gelöstem Al bei allen drei Varianten mit niedrigem pH-Wert höchstens um 12 % ab, bei der Al-Malat-Variante (pH 6,0) war die Abnahme mit 45 % sowohl prozentual als auch absolut am größten. Die höhere Konzentration an gelöstem Al nach der Behandlung in der Al-Citrat-Variante dürfte auf Meßungenauigkeiten beruhen. Von den 500 µM Al in allen Nährlösungsvarianten wurden zwischen 4 und 20 % von den Pflanzen aufgenommen. Damit kann die Abnahme der Konzentration an gelöstem Al in den Chlorid und Malat-Varianten (pH 4,3) teilweise und in der Malat-Variante (pH 6,0) vollständig erklärt werden.

Der Al_{mono} -Anteil am gelösten Al nahm während der Al-Behandlung bei der Malat- (pH 4,3) und Citrat-Variante mit 19 bzw. 15 % leicht zu. In der Al-Chlorid-Variante sank er hingegen von 100 % auf 73 %. Am niedrigsten war er zu Versuchsende mit 11 % in der Al-Malat-Variante (pH 6,0).

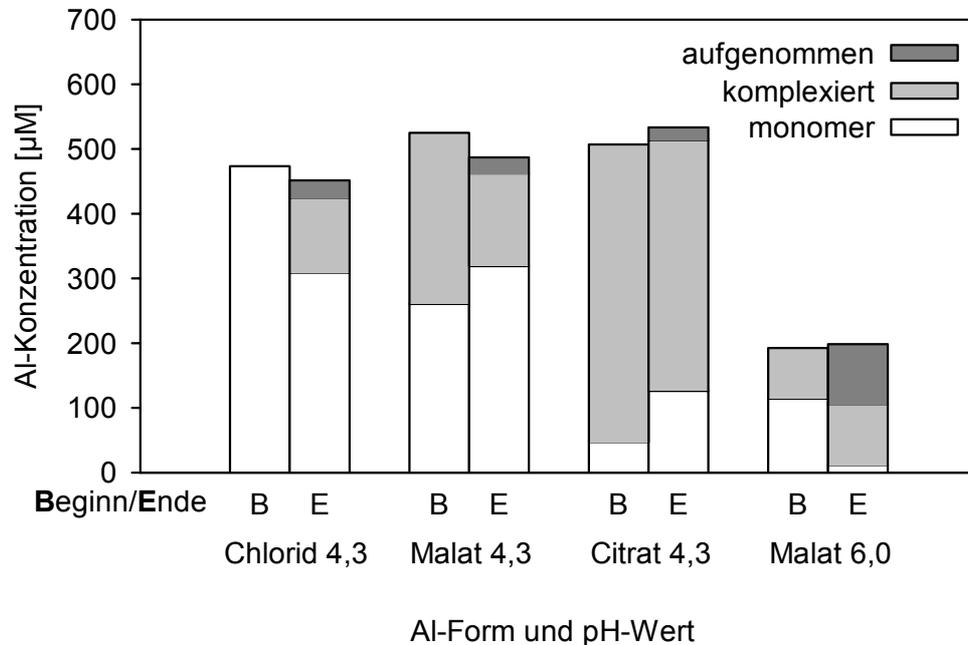


Abb. 3.21: Al-Spezifizierung in den Nährlösungsvarianten mit 500 μM Al-Chlorid, -Malat und -Citrat (pH 4,3) und Malat (pH 6,0) zu Versuchsbeginn (B) und -ende (E). Monomeres Al: mit Aluminon bestimmt, komplexiertes Al: mit ICP gemessenes Al minus monomeres Al, aufgenommenes Al: berechnet aufgrund der von den Pflanzen aufgenommenen Al-Menge.

Nach Berechnungen mit dem Programm GEOCHEM-PC lag Al in der Chlorid-Variante bei Versuchsbeginn zu 100 % in monomerer Form vor, zu 67 % als freies Metall bzw. zu 18 % mit SO_4 , zu 10 % mit OH und zu 5 % mit PO_4 komplexiert (nicht dargestellt). In dieser Nährlösungsvariante stimmten die Al_{mono} -Bestimmung mit Aluminon und die Berechnung überein, allerdings nur wenn bei der Berechnung Ausfällungen nicht erlaubt wurden. Waren Ausfällungen jedoch erlaubt, sollte Al zu 89 % in fester Form mit OH ausfallen.

Bei den Malat- und Citrat-Varianten (pH 4,3) war der berechnete Al_{mono} -Anteil mit 2 bzw. 1 % deutlich niedriger als der gemessene. Das restliche Al sollte komplexiert mit Malat bzw. Citrat vorliegen, unabhängig davon, ob Ausfällungen erlaubt waren.

Da die geringe, mit dem ICP wiedergefundene Al-Konzentration in der Variante Al-Malat (pH 6,0) auf Ausfällungen hindeutet, wurden diese auch bei der Berechnung

erlaubt. Der berechnete Anteil an ausgefallenem Al war mit 98 % wesentlich höher als das Meßergebnis. Mittels ICP konnten nur 60 % der 500 µM Al nicht wiedergefunden werden und waren wahrscheinlich als Ausfällungen durch die Membranfiltration entfernt worden.

3.3.2 Wurzelwachstum

Das Wurzelwachstum der Hortensienstecklinge unterschied sich in den drei Nährlösungsvarianten Al-Chlorid, -Malat und -Citrat bei einem pH-Wert von 4,3 nicht signifikant. Dabei spielte es keine Rolle, ob das absolute Wurzelwachstum (Abb. 3.22), die relative Wurzelwachstumsrate oder das prozentuale Wurzelwachstum (2.3.5) betrachtet wurden oder das theoretisch zu erwartende Wachstum ohne Al-Behandlung für den Zeitraum der Al-Behandlung errechnet und gleich 100 % gesetzt wurde (nicht dargestellt). Das theoretisch während der 48stündigen Versuchsdauer zu erwartende Wachstum ohne Al (Abb. 3.22) konnte aufgrund des Wachstums aller Versuchspflanzen in den zwei Tagen vor Beginn der Al-Behandlung berechnet werden. Tendenziell war das Wurzelwachstum von Stecklingen der Sorte 'Renate Steiniger' in der Al-Citrat-Variante am geringsten. Bei 'Blauer Ball' hingegen war es mit Al-Citrat etwas stärker als mit Al-Malat und mit Al-Chlorid am geringsten. Eine Erhöhung des pH-Werts von 4,3 auf 6,0 bei der Al-Malat-Variante führte bei beiden Sorten zu einer Verdopplung des Wachstums. Diese Wachstumsverdopplung war für 'Renate Steiniger' bei Berechnung des prozentualen Wachstums (Wurzeltauchgewicht zu Beginn der Al-Behandlung gleich 100 %) signifikant, aber nicht für 'Blauer Ball'. Das absolute Wurzelwachstum lag zwischen 0,6 g (RS, Al-Citrat) und 2 g (BB, Al-Malat, pH 6,0) pro Steckling in 2 Tagen. Während der Al-Behandlung wuchsen die Stecklinge der Varianten somit um 15 % bis 54 %. Das absolute Wurzelwachstum von 'Blauer Ball' war bei allen Nährlösungsvarianten durchschnittlich 35 % größer als von 'Renate Steiniger'. Dieser Sortenunterschied war jedoch nicht signifikant.

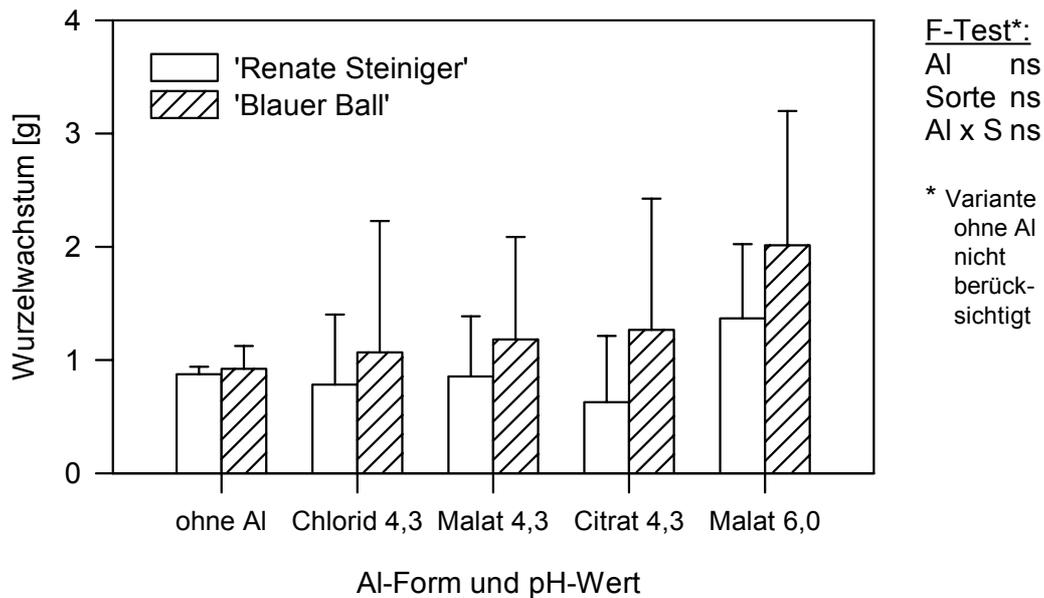


Abb. 3.22: Wurzelwachstum von Stecklingen der Hortensiensorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' während eines 48stündigen Angebots von 500 μM Al-Chlorid, -Malat und -Citrat (pH 4,3) und -Malat (pH 6,0). $n = 4$. Aufgrund des Wachstums der 16 Versuchspflanzen pro Sorte in den zwei Tagen vor der Al-Behandlung wurde das ohne Al (pH 4,3) zu erwartende Wachstum für die Versuchsdauer errechnet.

3.3.3 Al- und Kallosegehalte der Wurzelspitzen

Die in der Nährlösung angebotene Al-Form wirkte sich erheblich auf die Al-Gehalte der Wurzelspitze aus (Abb. 3.23A). Der Al-Gehalt der Chlorid-Variante betrug gemittelt über beide Sorten 0,82 μg pro Wurzelspitze. In der Malat-Variante (pH 4,3) lag der Al-Gehalt um 12 %, in der Citrat-Variante um 56 % niedriger. In der Malat-Variante (pH 6,0) lag der Al-Gehalt um 83 % höher als in der Chlorid-Variante. Die Sorten unterschieden sich nicht signifikant bezüglich des Al-Gehalts der Wurzelspitzen.

Der Kallosegehalt in Wurzelspitzen der Chlorid-Variante betrug 0,24 μg Pachyman-äquivalent (PÄ) pro Wurzelspitze (Abb. 3.23B). Im Vergleich hierzu wiesen Wurzelspitzen gemittelt über beide Sorten bei niedrigem pH-Wert in der Malat-Variante einen um 28 % und in der Al-Citrat-Variante um 71 % niedrigeren Kallosegehalt auf. In der Malat-Variante bei dem hohen pH-Wert von 6,0 war der Kallosegehalt im Sortenmittel um 56 % höher als in der Chlorid-Variante. Während beide Sorten in der Chlorid-Variante denselben Kallosegehalt aufwiesen, war der Kallosegehalt der Sorte 'Renate Steiniger' bei den restlichen drei Varianten um 45 - 65 % niedriger als bei 'Blauer Ball'.

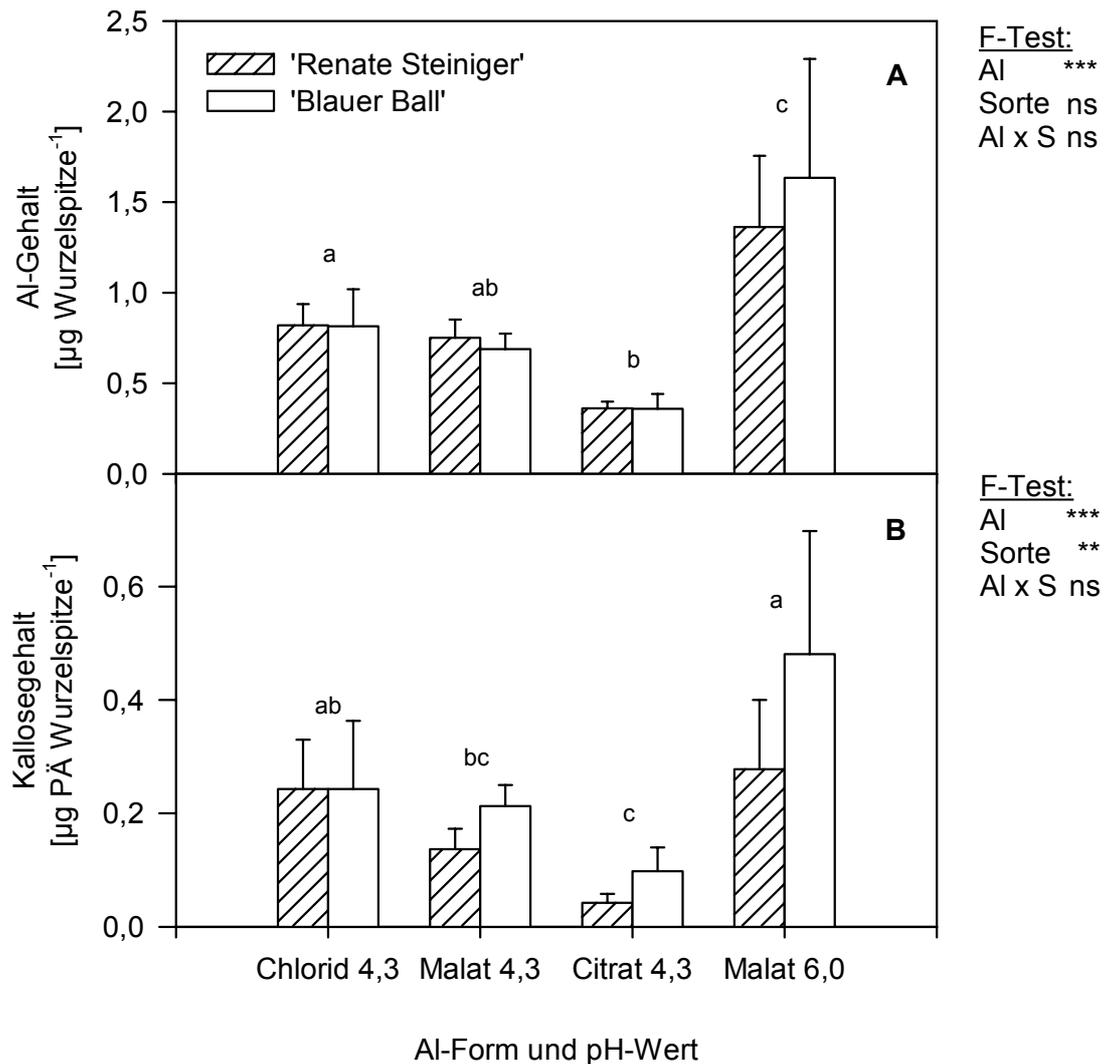


Abb. 3.23: Al-Gehalte (A) und Kallosegehalte (B) von Wurzelspitzen der Hortensien-sorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' nach 48stündigem Angebot von 500 μM Al-Chlorid, -Malat und -Citrat (pH 4,3) und -Malat (pH 6,0). Gleiche Buchstaben kennzeichnen nicht signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Al-Formen über beide Sorten (Tukey-Test, $p < 0,05$). $n = 4$.

Wie in Abb. 3.24 zu sehen ist, korrelierten Al- und Kallosegehalte der Wurzelspitzen bei den Sorten 'Renate Steiniger' ($r^2 = 0,60^{***}$) und 'Blauer Ball' ($r^2 = 0,69^{***}$) signifikant positiv miteinander. Der Kallosegehalt von 'Blauer Ball' war bei gleichem Al-Gehalt der Wurzelspitzen durchschnittlich höher als bei 'Renate Steiniger'.

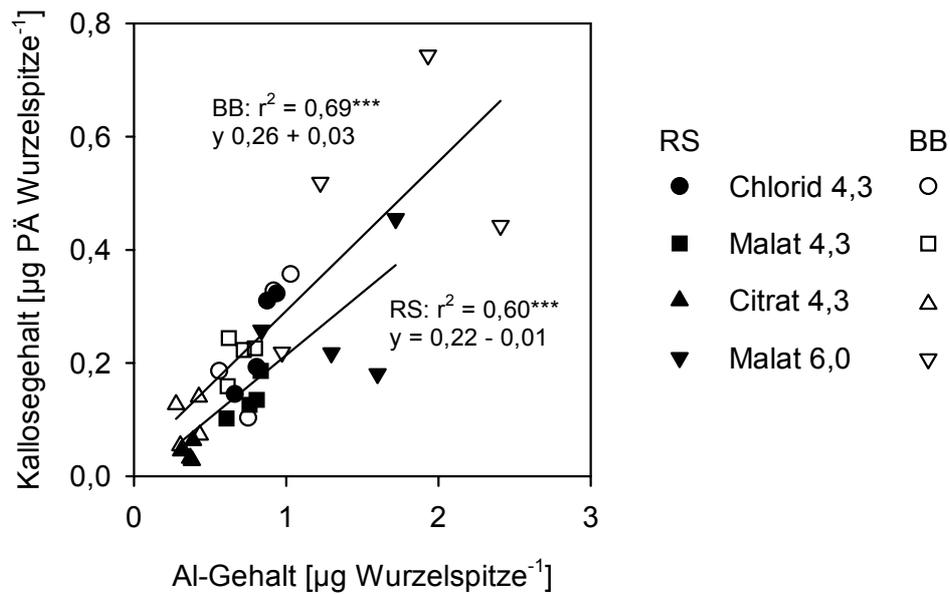


Abb. 3.24: Beziehung zwischen Al- und Kallosegehalten von Wurzelspitzen der Hortensiansorten ‘Renate Steiniger’ und ‘Blauer Ball’ nach 48stündigem Angebot von 500 µM Al-Chlorid, -Malat und -Citrat (pH 4,3) und -Malat (pH 6,0).

3.3.4 Al-Gehalt der Wurzel und verschiedener Sproßfraktionen

Die Al-Form in der Nährlösung hatte bei niedrigem pH-Wert keinen signifikanten Einfluß auf die Al-Gehalte der Wurzeln (Abb. 3.25). Bei Al-Chlorid-Angebot betrug der Al-Gehalt 3 mg (g TS)⁻¹. Die Malat- und Citrat-Varianten wiesen nur geringfügig niedrigere Al-Gehalte als die Chlorid-Variante auf. Die Verminderung des Al-Gehalts in der Citrat-Variante im Vergleich zur Chlorid-Variante fiel somit bei der Wurzel weniger deutlich aus als bei der Wurzelspitze (Abb. 3.23A). In der Malat-Variante bei hohem pH-Wert betrug der Al-Gehalt circa das Fünffache der Varianten bei niedrigem pH-Wert. Damit war dieser Unterschied auf der Ebene des gesamten Wurzelsystems deutlich stärker ausgeprägt als auf der Ebene der Wurzelspitzen. Die Al-Gehalte der Wurzeln beider Sorten unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Al-Malat- und Al-Citratangebot bewirkten bei niedrigem pH-Wert keine signifikante Erhöhung der in den Sproß verlagerten Al-Menge im Vergleich zu Al-Chlorid (Tab. 3.3). Bei der Sorte ‘Renate Steiniger’ war die Al-Aufnahme in der Citrat-Variante tendenziell sogar von 0,13 mg auf 0,08 mg im Sproß vermindert. Auch die Al-Gehalte in der basalen, medialen und apikalen Sproßfraktion unterschieden sich bei Angebot von Al-Malat und -Citrat im Vergleich zu -Chlorid bei niedrigem pH-Wert bei beiden

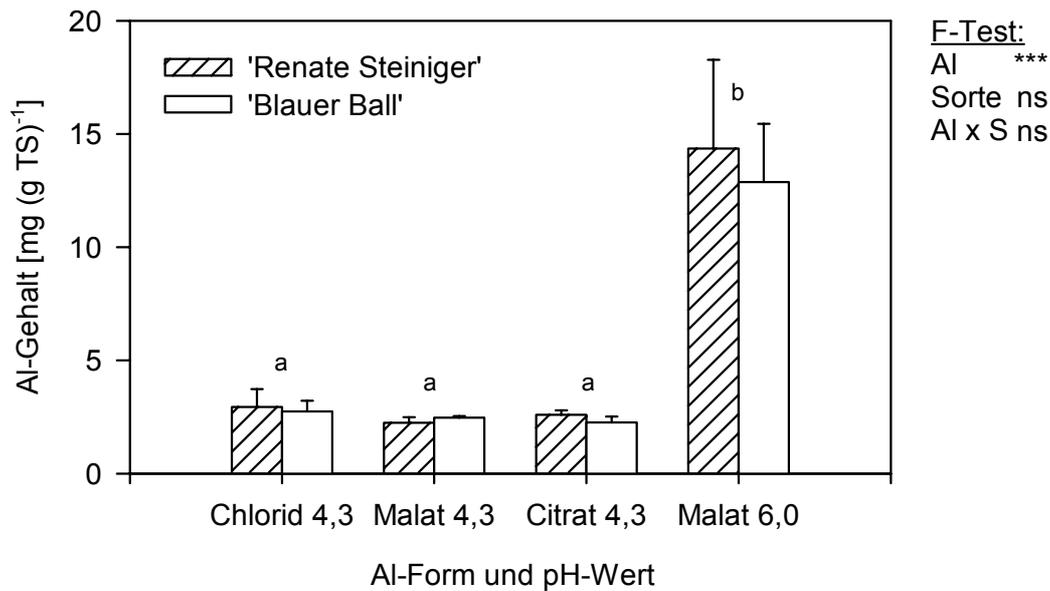


Abb. 3.25: Al-Gehalt von Wurzeln der Hortensienarten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' nach 48stündigem Angebot von 500 μM Al-Chlorid, -Malat und -Citrat (pH 4,3) und -Malat (pH 6,0). Gleiche Buchstaben kennzeichnen nicht signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Al-Formen über beide Sorten (Tukey-Test, $p < 0,05$). $n = 4$.

Sorten nicht signifikant (Abb. 3.26). Obwohl der Al-Gehalt in der Wurzel in der Malat-Variante (pH 6,0) fünfmal höher war als in den Varianten bei niedrigem pH-Wert, führte dies nicht zu einer erhöhten Al-Aufnahme in den Sproß. Vielmehr wurden hier von der in der gesamten Pflanze bestimmten Al-Menge nur 1,2 % Al im Sproß wiedergefunden. Das ist deutlich weniger als in den Varianten mit niedrigem pH-Wert, in denen bei 'Renate Steiniger' 15 %, bei 'Blauer Ball' 11 % des gesamten Al in den Sproß verlagert wurden. Auch absolut betrug die Al-Aufnahme des Sprosses mit 0,04 mg in der Variante Malat (pH 6,0) weniger als die Hälfte der Al-Aufnahme in den anderen Varianten bei niedrigem pH-Wert. Im Sortenvergleich wies 'Renate Steiniger' gemittelt über alle vier Al-Varianten eine 50 % höhere Al-Aufnahme in den Sproß als 'Blauer Ball' auf (nicht signifikant). Entsprechend lagen die Al-Gehalte von 'Renate Steiniger' in der medialen Sproßfraktion mit $0,09 \text{ mg (g TS)}^{-1}$ um 55 % und in der apikalen Sproßfraktion mit $0,24 \text{ mg (g TS)}^{-1}$ um 100 % signifikant höher als von 'Blauer Ball'. Wie ein Vergleich der Al-Gehalte in den verschiedenen Sproßfraktionen zeigt, war der Al-Gehalt in der apikalen Sproßfraktion bei 'Renate Steiniger' circa dreimal und bei 'Blauer Ball' circa doppelt so hoch wie in den basalen und medialen Sproßfraktionen, und zwar bei allen Al-Formen und einem pH-Wert von 4,3. Al wird also offenbar bevorzugt in die Sproßspitze transportiert.

Tab. 3.3: In den Sproß verlagerte Al-Menge bei den Hortensiensorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' nach 48stündigem Angebot von 500 μM Al-Chlorid, -Malat und -Citrat (pH 4,3) und -Malat (pH 6,0). Gleiche Buchstaben kennzeichnen nicht signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Al-Formen über beide Sorten (Tukey-Test, $p < 0,05$). $n = 4$.

Al-Form	pH-Wert	verlagerte Al-Menge [mg pro Sproß]		
		'Renate Steiniger'	'Blauer Ball'	
Chlorid	4,3	0,13	0,07	a
Malat	4,3	0,13	0,07	a
Citrat	4,3	0,08	0,07	ab
Malat	6,0	0,04	0,03	b
F-Test:	Al-Form: ***	Sorte: n.s.	Al x S: n.s.	

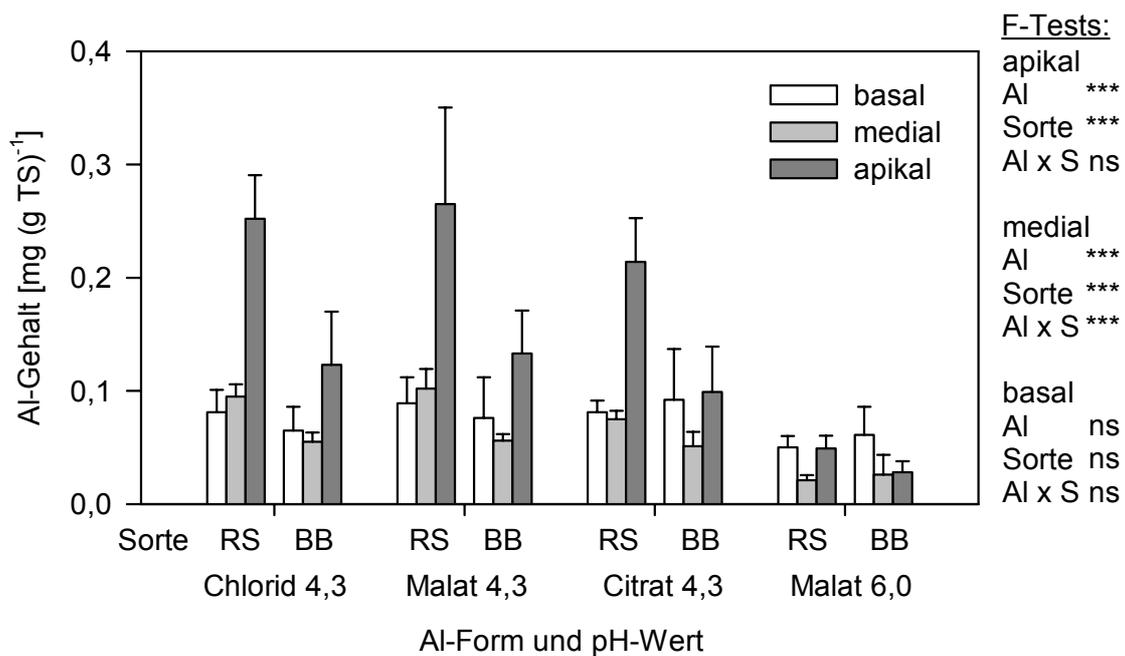


Abb. 3.26: Al-Gehalte in den basalen, medialen und apikalen Sproßfraktionen der Hortensiensorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' nach 48stündigem Angebot von 500 μM Al-Chlorid, -Malat und -Citrat (pH 4,3) und -Malat (pH 6,0). $n = 4$.

3.3.5 Wurzelfrischgewicht und exsudierte Xylemsaftmenge

Wie in Abb. 3.27 zu sehen ist, bestand eine enge positive Beziehung zwischen dem Wurzelfrischgewicht der Hortensienstecklinge und der exsudierten Xylemsaftmenge ($r^2 = 0,93^{***}$). Durch das Sortieren der Stecklinge zu Versuchsbeginn wurde erreicht, daß weder die Wurzelfrischgewichte noch die exsudierten Xylemsaftmengen der unterschiedlichen Al-Varianten und Sorten signifikante Unterschiede aufwiesen (Tab. 3.4). Folglich bestanden nur vernachlässigbar geringe Unterschiede zwischen den Relationen von Xylemsaftkonzentration und exsudierter Stoffmenge ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{Pflanze}^{-1}$ oder $\mu\text{mol h}^{-1} (\text{g Wurzelfrischgewicht})^{-1}$) der verschiedenen Al-Varianten und Sorten. Deshalb werden im folgenden alle Ergebnisse ausschließlich als Konzentrationen präsentiert.

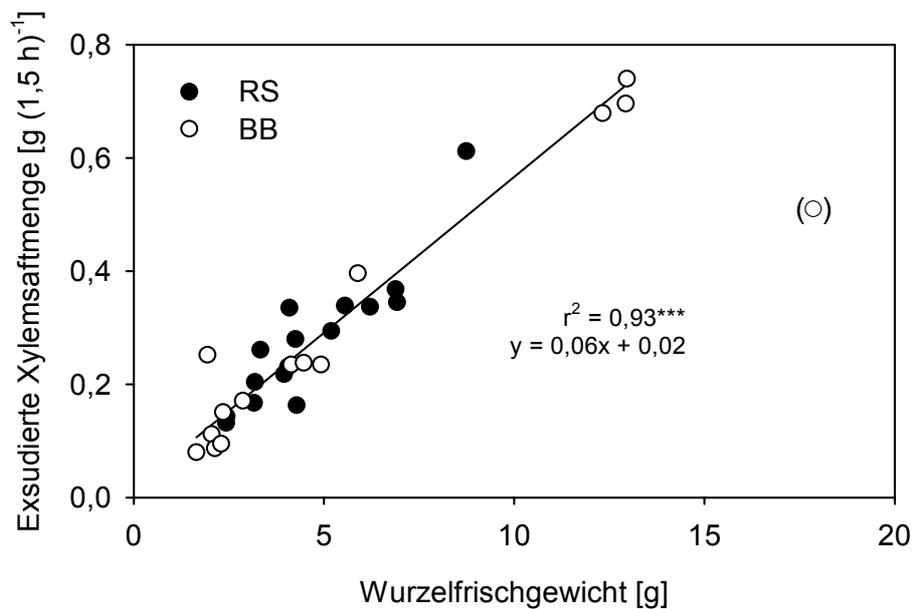


Abb. 3.27: Beziehung zwischen dem Wurzelfrischgewicht und der während 1,5 h exsudierten Xylemsaftmenge der Hortensienarten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' nach 48stündigem Angebot von 500 μM Al-Chlorid, -Malat und -Citrat (pH 4,3) und -Malat (pH 6,0).

Tab. 3.4: Wurzelfrischgewicht und exsudierte Xylemsaftmenge der Hortensiensorten ‘Renate Steiniger’ (‘RS’) und ‘Blauer Ball’ (‘BB’) nach 48stündigem Angebot von 500 μ M Al-Chlorid, -Malat und -Citrat (pH 4,3) und -Malat (pH 6,0). n = 4.

Al-Form	pH-Wert	Wurzelfrischgewicht		exsudierte Xylemsaftmenge	
		[g]		[g (1,5 h x Pflanze) ⁻¹]	
		'RS'	'BB'	'RS'	'BB'
Chlorid	4,3	5,3	6,5	0,34	0,28
Malat	4,3	5,1	6,0	0,29	0,39
Citrat	4,3	4,3	5,4	0,23	0,29
Malat	6,0	4,0	5,7	0,26	0,31
F-Test		Al-Form: n.s.	Sorte: n.s.	Al-Form: n.s.	Sorte: n.s.

3.3.6 Al und organische Säuren im Xylemsaft

Die Al-Malat-Variante (pH 4,3) wies eine signifikant um 30 % erhöhte Al-Konzentration im Xylemsaft auf im Vergleich zu den Al-Chlorid und -Citrat-Varianten bei niedrigem pH-Wert (Abb. 3.28). Die Al-Konzentration im Xylemsaft einzelner Pflanzen überstieg die in der Nährlösung (0,50 mM) z. T. deutlich, im Extremfall um bis zu 0,18 mM. Gemittelt über Al-Form und Sorte betrug sie bei niedrigem pH-Wert 0,41 mM. Analog zur niedrigeren Konzentration an gelöstem Al in der Nährlösung und dem niedrigeren Al-Gehalt im Sproß in der Malat-Variante (pH 6,0) war auch die Al-Konzentration im Xylemsaft um 85 % vermindert im Vergleich zu den Varianten bei niedrigem pH-Wert. Im Sortenvergleich wies ‘Renate Steiniger’ eine signifikant höhere Al-Konzentration im Xylemsaft auf als ‘Blauer Ball’, gemittelt über die vier Varianten um 22 %. Al-Konzentration und exsudierte Xylemsaftmenge waren nicht miteinander korreliert. Monomeres Al konnte mit der Aluminon-Methode (2.3.7) weder in 1:30 noch in 1:10 verdünntem Xylemsaft nachgewiesen werden. Dabei spielte es keine Rolle, ob Al in der Nährlösung als Chlorid, Malat oder Citrat angeboten wurde.

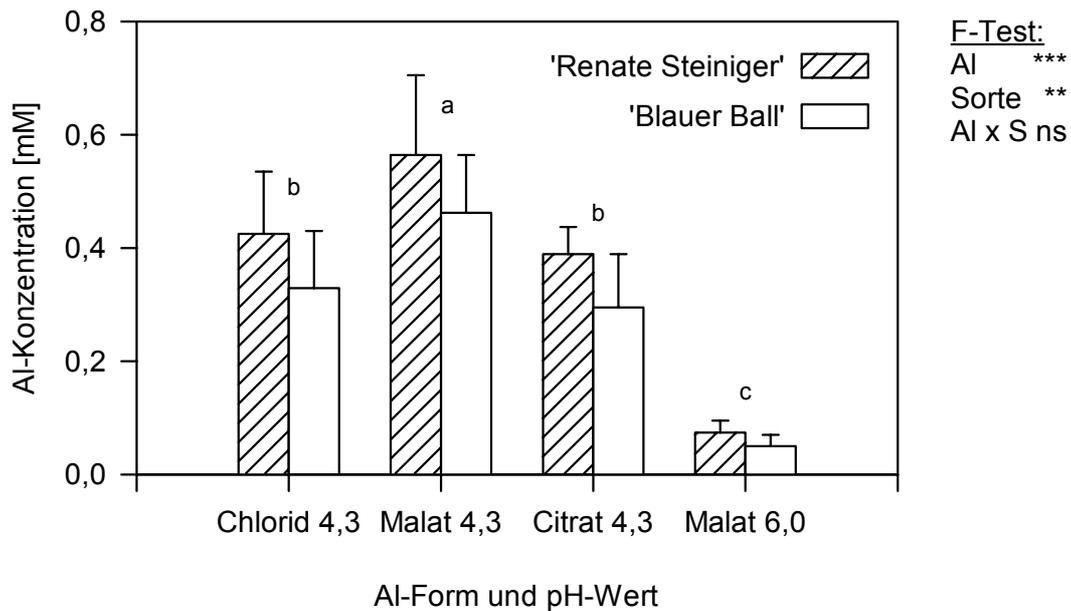


Abb. 3.28: Al-Konzentration im Xylemsaft der Hortensiensorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' nach 48stündigem Angebot von 500 μ M Al-Chlorid, -Malat und -Citrat (pH 4,3) und -Malat (pH 6,0). Gleiche Buchstaben kennzeichnen nicht signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Al-Formen über beide Sorten (Tukey-Test, $p < 0,05$). $n = 4$.

Auch auf die Konzentration organischer Säuren im Xylemsaft hatten die drei verschiedenen Al-Formen in der Nährlösung bei niedrigem pH-Wert keinen signifikanten Einfluß (Abb. 3.29). Selbst tendenziell war die Citratkonzentration bei Angebot von Al-Citrat im Xylemsaft gemittelt über beide Sorten nicht höher als bei Angebot von Chlorid und Malat bei niedrigem pH-Wert. In der Malat-Variante (pH 6,0) war die Citratkonzentration im Vergleich zu den anderen Varianten deutlich vermindert. Bei allen anderen organischen Säuren unterschied sich die Malat-Variante (pH 6,0) nicht signifikant von den übrigen Varianten. Im Unterschied zur Citratkonzentration war die Malatkonzentration der Malat-Variante im Vergleich zur Chlorid-Variante zumindest tendenziell erhöht, und zwar bei einem pH-Wert von 4,3 bei 'Renate Steiniger' und bei einem pH-Wert von 6,0 bei beiden Sorten. Die Citrat-Variante wies tendenziell die geringste Malatkonzentration auf. Die Sorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' unterschieden sich nicht bezüglich ihrer Citrat-, Oxoglutarat- und Malatkonzentration im Xylemsaft. Bei niedrigem pH-Wert lag die Malonatkonzentration von 'Blauer Ball' im Vergleich zu der von 'Renate Steiniger' um 42 % niedriger. 'Blauer Ball' wies jedoch zweimal höhere Succinat- und Fumaratkonzentrationen als 'Renate Steiniger' auf.

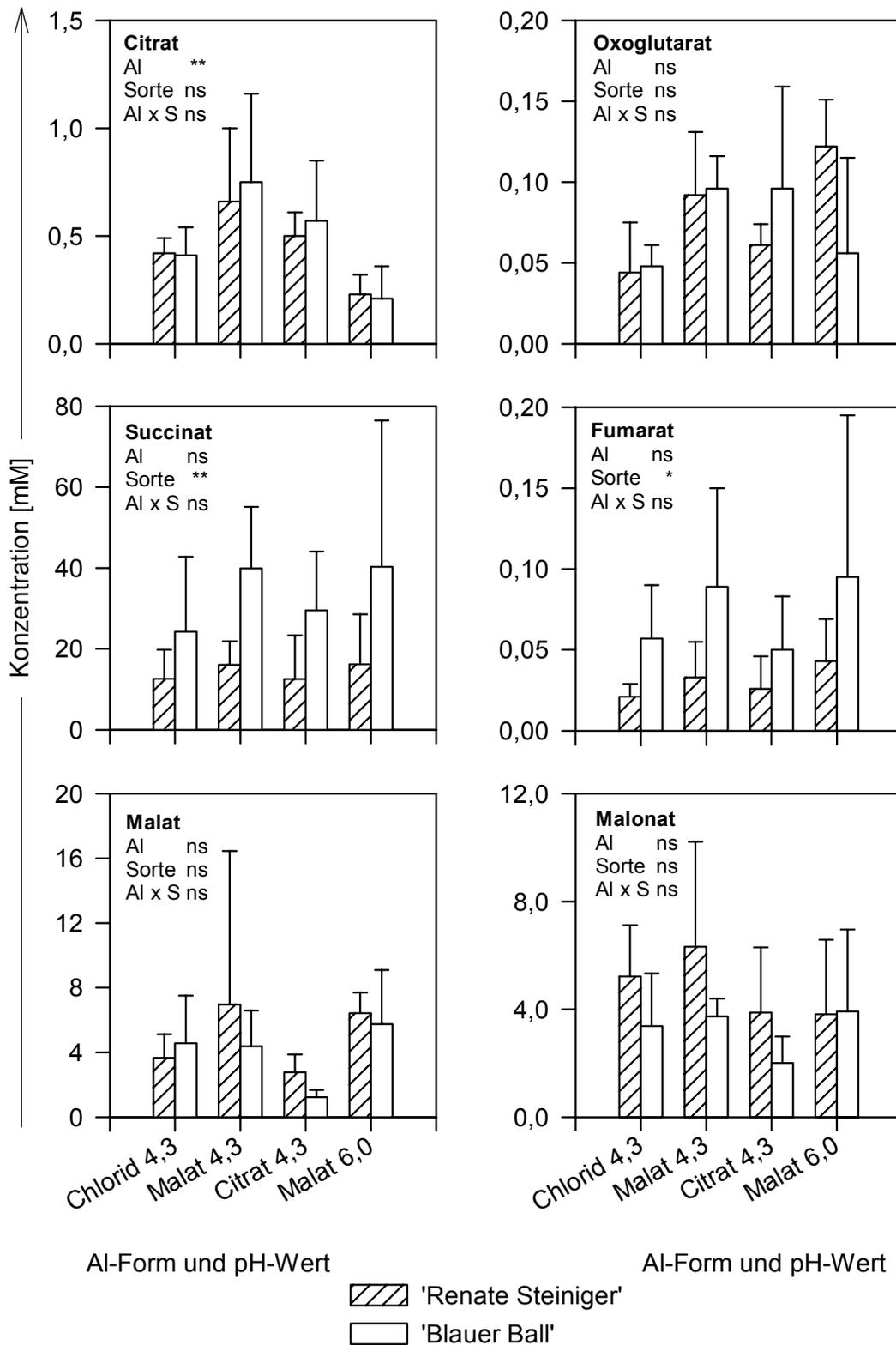


Abb. 3.29: Citrat-, Oxoglutarat-, Succinat-, Fumarat-, Malat- und Malonatkonzentration im Xylemsaft der Hortensiensorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' nach 48stündigem Angebot von 500 μ M Al-Chlorid, -Malat und -Citrat (pH 4,3) und -Malat (pH 6,0). n = 4.

Die Citratkonzentration betrug 0,43 mM, gemittelt über die vier Al-Formen und beide Sorten. Der Anteil an der Gesamtkonzentration aller gemessenen organischen Säuren lag für Succinat, Malat, Malonat und Citrat bei 72, 14, 12 und 1,4 %, für Oxoglutarat und Fumarat jeweils bei 0,2 % (nicht dargestellt). Trotzdem war Al nach Berechnungen mit dem Spezifikationsprogramm GEOCHEM-PC (2.3.10, Ergebnisse nicht dargestellt) zu 27 bis 60 % mit Citrat, zu 38 bis 72 % mit Malonat und zu weniger als 2,4 % mit Malat und Succinat komplexiert. Bei 'Blauer Ball' war der berechnete, mit Citrat komplexierte Al-Anteil circa zweimal höher als bei 'Renate Steiniger'. Bei 'Renate Steiniger' sollte Malonat eine größere Bedeutung für die Al-Komplexierung zukommen als Citrat.

Wie Regressionsberechnungen zwischen den Konzentrationen an Al und der gemessenen organischen Säuren im Xylemsaft ergaben, bestand ausschließlich zwischen der Al- und der Citratkonzentration ein signifikanter Zusammenhang (Abb. 3.30, RS: $r^2 = 0,59^{***}$, BB: $r^2 = 0,58^{***}$).

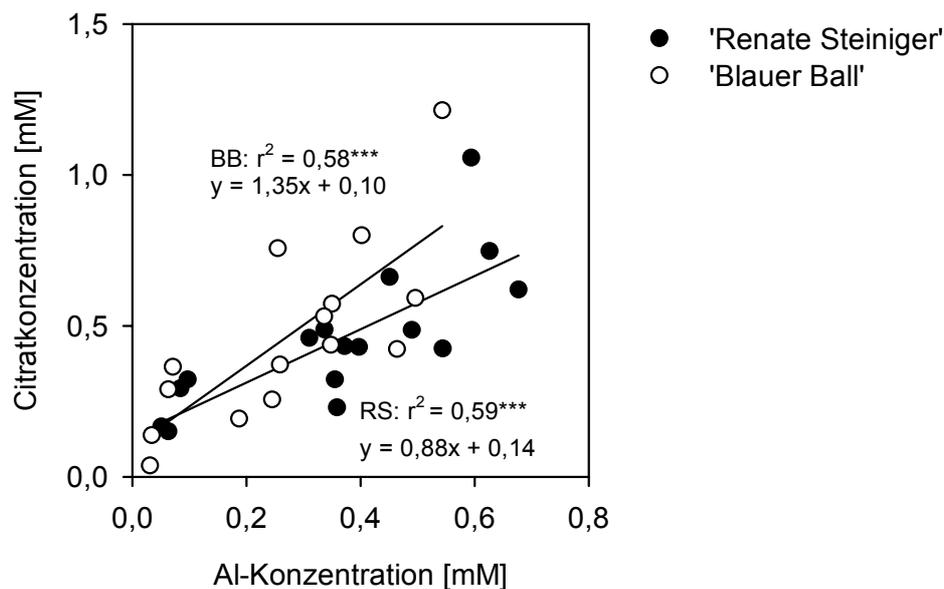


Abb. 3.30: Beziehung zwischen Al- und Citratkonzentration im Xylemsaft der Hortensiensorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' nach 48stündigem Angebot von 500 μ M Al-Chlorid, -Malat und -Citrat (pH 4,3) und -Malat (pH 6,0). n = 4.

3.4 Einfluß eines kurzfristig niedrigen Al-Angebots auf die Induktion von Al-Resistenz

Um die Möglichkeit der Induktion von Al-Resistenz bei Hortensien zu untersuchen, wurden bewurzelte Stecklinge der Sorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' bei niedrigem Al-Angebot von 25 und 50 μM Al für 7 Tage vorbehandelt und anschließend einem toxischem Angebot von 500 μM Al ausgesetzt (2.2.4).

3.4.1 Wurzelwachstum

Durch das niedrige Al-Angebot von 25 bzw. 50 μM war das relative Wurzelwachstum im Vergleich zur Kontrolle nicht vermindert (Abb. 3.31A). Anschließende 4- bzw. 7tägige Kultur bei 500 μM Al verringerten das relative Wurzelwachstum um circa 35 % gegenüber der Kontrolle (Abb. 3.31B). Signifikant war diese Verminderung nur nach 7 Tagen und Vorbehandlung mit 0 und 25 μM Al. Die Vorbehandlung bei niedrigem Al-Angebot bewirkte jedoch kein erhöhtes Wachstum im Vergleich zur nicht vorbehandelten Variante, wie es bei einer Induktion von Al-Resistenz zu erwarten gewesen wäre.

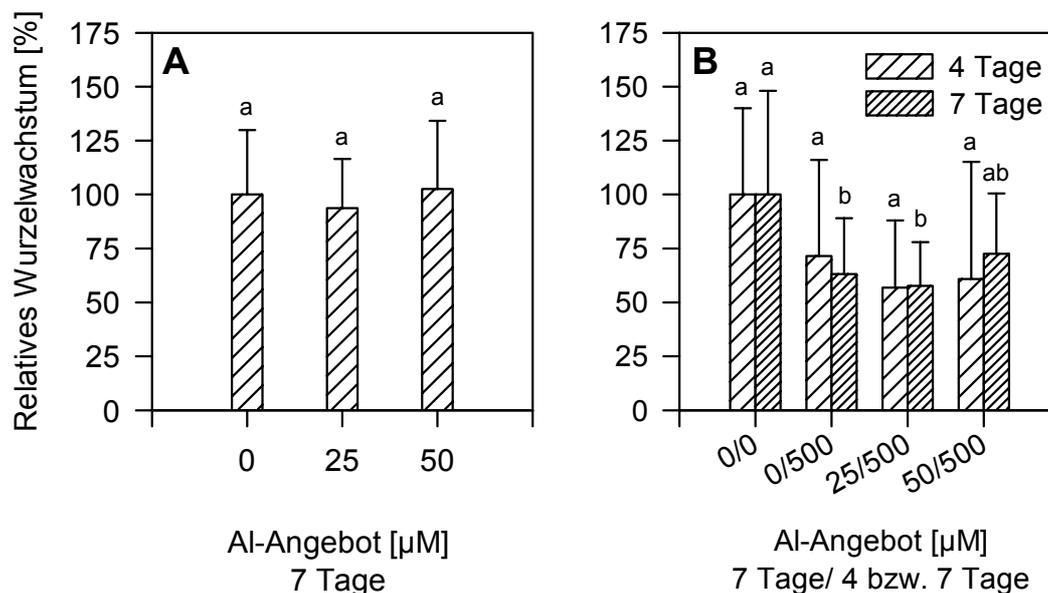


Abb. 3.31: Relatives Wurzelwachstum der Sorte 'Renate Steiniger' ohne und bei niedrigem Al-Angebot von 25 und 50 μM für 7 Tage (A) und Einfluß dieser Vorbehandlung auf das relative Wurzelwachstum während einer 4- und 7tägigen Behandlung mit 500 μM Al (B). Relative Wurzelwachstumsrate der Kontrolle gleich 100 % gesetzt. Gleiche Buchstaben kennzeichnen nicht signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Al-Vorbehandlungen (Tukey-Test, $p < 0,05$). $n = 12$.

3.4.2 Al- und Kallosegehalte in Wurzelspitzen

Nach Vorbehandlung:

Die 7tägige Vorbehandlung mit 25 bzw. 50 μM Al führte zu einer signifikanten Erhöhung der Al-Gehalte um circa 0,2 μg Wurzelspitze⁻¹ im Vergleich zur Kontrolle bei den Sorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' (Abb. 3.32A). Trotz des erhöhten Al-Gehalts der Wurzelspitzen war der Kallosegehalt signifikant um mehr als die Hälfte vermindert (Abb. 3.32B).

Nach Vorbehandlung und einem Tag bei 500 μM Al:

Nach der Vorbehandlung und einem zusätzlichen Tag bei 500 μM Al war der Al-Gehalt der Wurzelspitzen im Vergleich zur Kontrolle (0/0) um 0,7 μg Wurzelspitze⁻¹ erhöht, gemittelt über die drei Al-Varianten und beide Sorten (Abb. 3.32C). Der Al-Gehalt der mit 25 μM vorbehandelten Variante (25/500) unterschied sich bei beiden Sorten nicht von der nicht vorbehandelten Variante (0/500). Die Vorbehandlung mit 50 μM Al erhöhte den Al-Gehalt bei beiden Sorten signifikant. Diese Tatsache beruhte nur bei 'Renate Steiniger' auf einer höheren Aufnahme während des einen Tages bei 500 μM Al im Vergleich zur nicht vorbehandelten Variante. Bei 'Blauer Ball' hingegen ließ sich der höhere Al-Gehalt allein auf den bereits nach der Vorbehandlung mit 50 μM Al erhöhten Ausgangsgehalt zurückführen. Die Sorte 'Renate Steiniger' wies einen um den Faktor 1,7 höheren Al-Gehalt in den Wurzelspitzen als 'Blauer Ball' auf, gemittelt über die drei Al-Varianten.

Der Kallosegehalt der nicht vorbehandelten Variante (0/500) nahm während der 1tägigen Al-Behandlung mit 500 μM im Vergleich zur Kontrolle (0/0) signifikant zu, bei beiden Sorten um 0,27 μg PÄ Wurzelspitze⁻¹ (Abb. 3.32D). Die Vorbehandlung mit 25 bzw. 50 μM Al verringerte die Induktion der Kallosebildung während der 500 μM Al-Behandlung signifikant um mehr als die Hälfte verglichen mit der nicht vorbehandelten Variante (0/500). In der Variante 50/500 war die Kalloseinduktion sogar so stark vermindert, daß sich der Kallosegehalt nicht mehr signifikant von dem der Kontrolle (0/0) unterschied. Auch zwischen den Kallosegehalten beider Sorten bestand kein Unterschied.

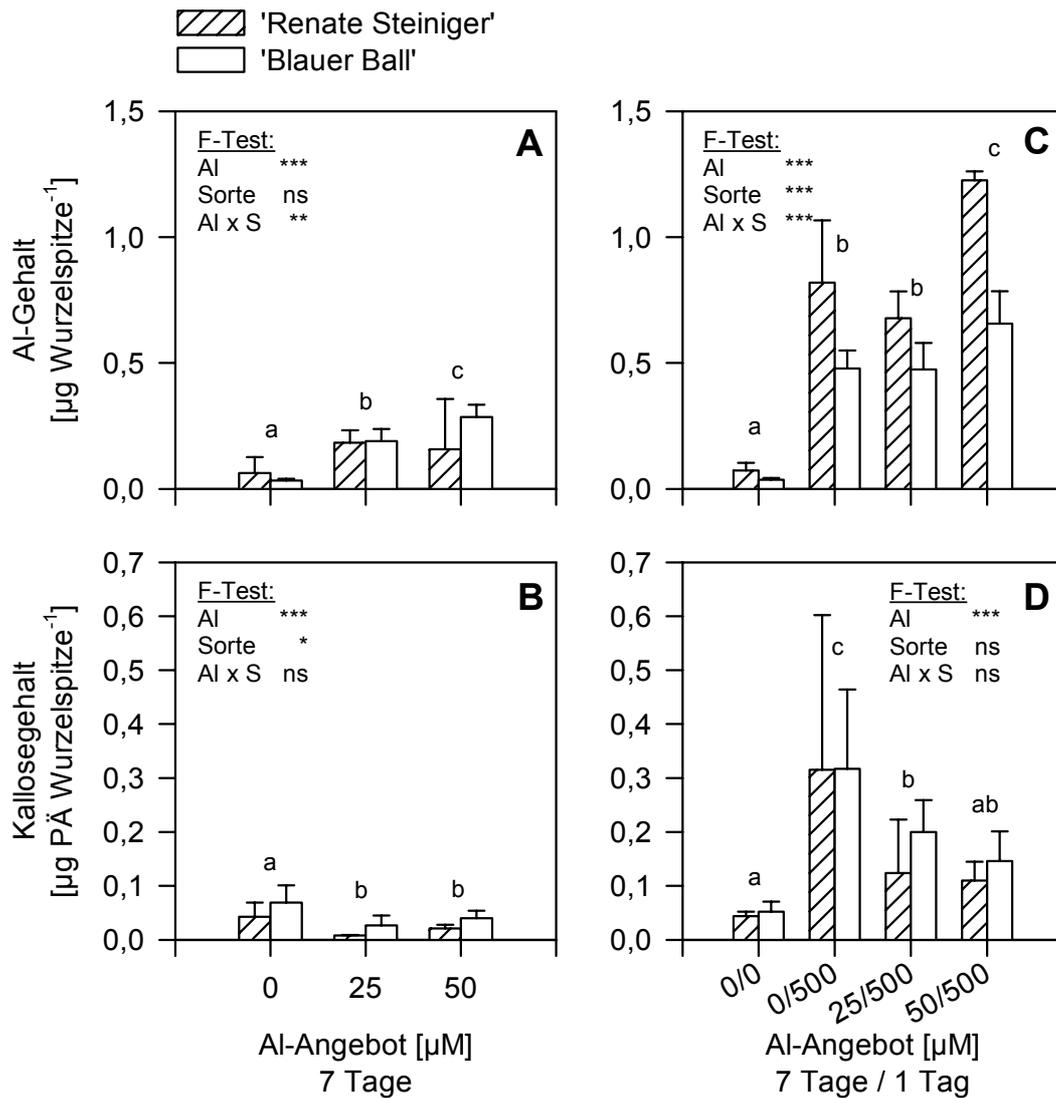


Abb. 3.32: Aluminium- (A) und Kallosegehalte (B) von Wurzelspitzen (1 cm) der Sorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' ohne und bei niedrigem Al-Angebot von 25 und 50 μM für 7 Tage und Einfluß dieser Vorbehandlung auf Al- (C) und Kallosegehalte (D) nach 1tägiger Behandlung mit 500 μM Al. Gleiche Buchstaben kennzeichnen nicht signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Al-Vorbehandlungen über beide Sorten (Tukey-Test, $p < 0,05$). RS: $n = 3$, BB: $n = 9$.

Nach Vorbehandlung und 7 Tagen bei 500 μM Al:

Nach 7tägiger Behandlung mit 500 μM Al lagen Al- und Kallosegehalte der Wurzelspitzen der Sorte 'Renate Steiniger' (Abb. 3.33A, B) auf ähnlichen Niveau wie bereits nach 1tägiger Behandlung, gemittelt über die drei Al-Varianten. Allerdings wies nicht mehr die Variante 50/500 den höchsten Al-Gehalt auf, sondern der Al-Gehalt der Variante 25/500 übertraf den der Varianten 0/500 und 50/500 um 24 %. Ein Einfluß der Vorbehandlung auf die Induktion von Kallose ließ sich nach der 7tägigen Behandlung mit 500 μM Al nicht mehr nachweisen.

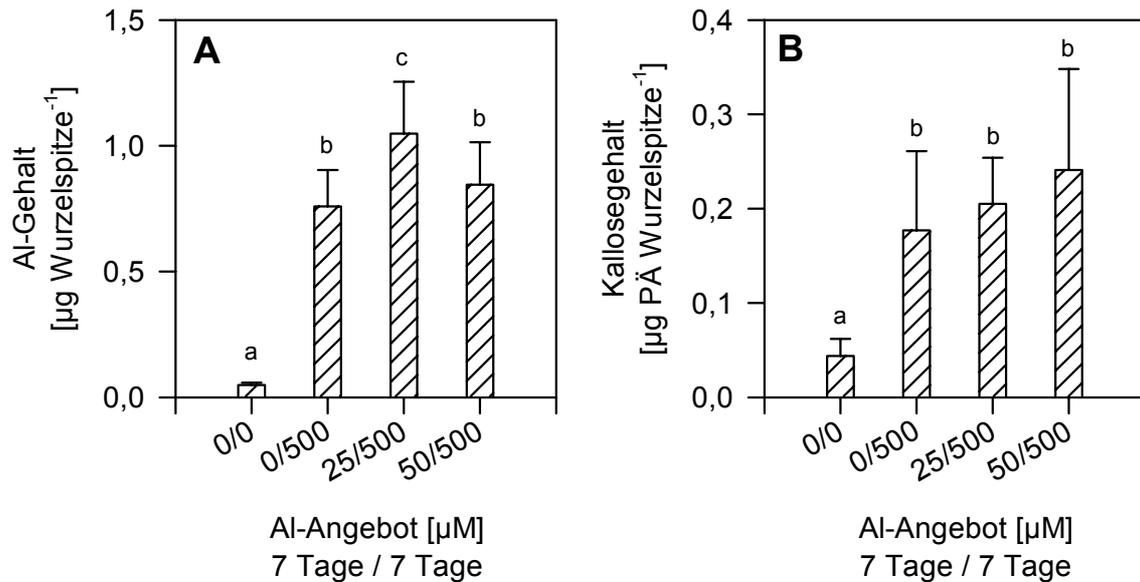


Abb. 3.33: Einfluß der Vorbehandlung ohne und bei niedrigem Al-Angebot von 25 und 50 µM für 7 Tage auf Al- (A) und Kallosegehalte (B) von Wurzelspitzen der Sorte 'Renate Steiniger' nach 7tägiger Behandlung mit 500 µM Al. Gleiche Buchstaben kennzeichnen nicht signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Al-Vorbehandlungen (Tukey-Test, $p < 0,05$). $n = 9$.

3.4.3 Al-Gehalte von Wurzel und Sproß

Die Wurzel der Sorte 'Blauer Ball' wies nach 1tägiger Behandlung mit 500 µM einen Al-Gehalt von $4,1 \text{ mg (g TS)}^{-1}$ in der nicht vorbehandelten Variante (0/500) auf (Abb. 3.34A). Die Vorbehandlung mit 25 bzw. 50 µM Al führte zu einer jeweils signifikanten Erhöhung des Al-Gehalts um den Faktor 1,6 bzw. 1,9. Der Al-Gehalt des Sprosses (Abb. 3.34B) betrug nur 1,4 % vom Al-Gehalt der Wurzel bei der nicht vorbehandelten Variante (0/500). Die durch die Vorbehandlung bewirkte Erhöhung des Al-Gehalts fiel im Sproß wesentlich stärker aus als in der Wurzel. Die Vorbehandlung mit 25 bzw. 50 µM Al erhöhte den Al-Gehalt im Sproß um den Faktor 5,7 bzw. 6,5.

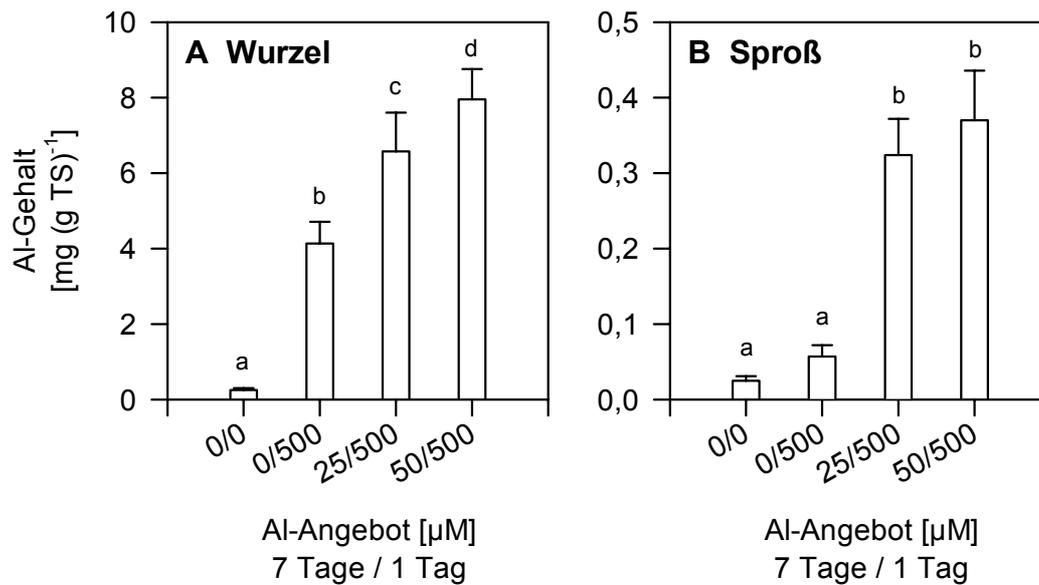


Abb. 3.34: Einfluß der Vorbehandlung ohne und bei niedrigem Al-Angebot von 25 und 50 μM für 7 Tage auf die Al-Gehalte in Wurzel (A) und Sproß (B) der Sorte 'Blauer Ball' nach 1tägiger Behandlung mit 500 μM Al. Gleiche Buchstaben kennzeichnen nicht signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Al-Vorbehandlungen (Tukey-Test, $p < 0,05$). $n = 9$.

3.5 Einfluß von Al auf die Exsudation organischer Säureanionen durch die Wurzel

Ob die Al-Resistenz der Hortensie auf der Ausscheidung von organischen Säuren beruhen könnte, sollte durch die Analyse von organischen Säuren in Wurzelexsudaten nach Al-Angebot untersucht werden (2.2.5). Bereits nach vierstündiger Al-Behandlung waren die Exsudationsraten für Citrat, Malat und Succinat im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 3.35). Für Citrat nahmen sie nach 24stündiger Behandlung (davon 22 h mit Al) tendenziell weiter zu, blieben nach 48 h (davon 44 h mit Al) jedoch auf demselben Niveau. Die Malatexsudationsrate veränderte sich im Anschluß an die 4stündige Al-Behandlung nicht weiter. Nach 48stündiger Behandlung wurde Succinat mit $116 \text{ nmol (h g FG)}^{-1}$ mit der höchsten Rate exsudiert, gefolgt von Citrat, Malonat, Malat und Glutarat mit 9,0, 8,6, 3,8 und 2,4 $\text{nmol (h g FG)}^{-1}$. Die Exsudationsraten von Malonat und Glutarat unterschieden sich mit und ohne Al-Behandlung nicht voneinander (nicht dargestellt). Der Al-Gehalt in den Wurzeln betrug nach der 48stündigen Behandlung $2,4 \text{ mg (g TS)}^{-1}$ und in den Sprossen $0,1 \text{ mg (g TS)}^{-1}$ (nicht dargestellt). Das Wurzelwachstum war durch die Al-Behandlung nicht signifikant vermindert (nicht dargestellt).

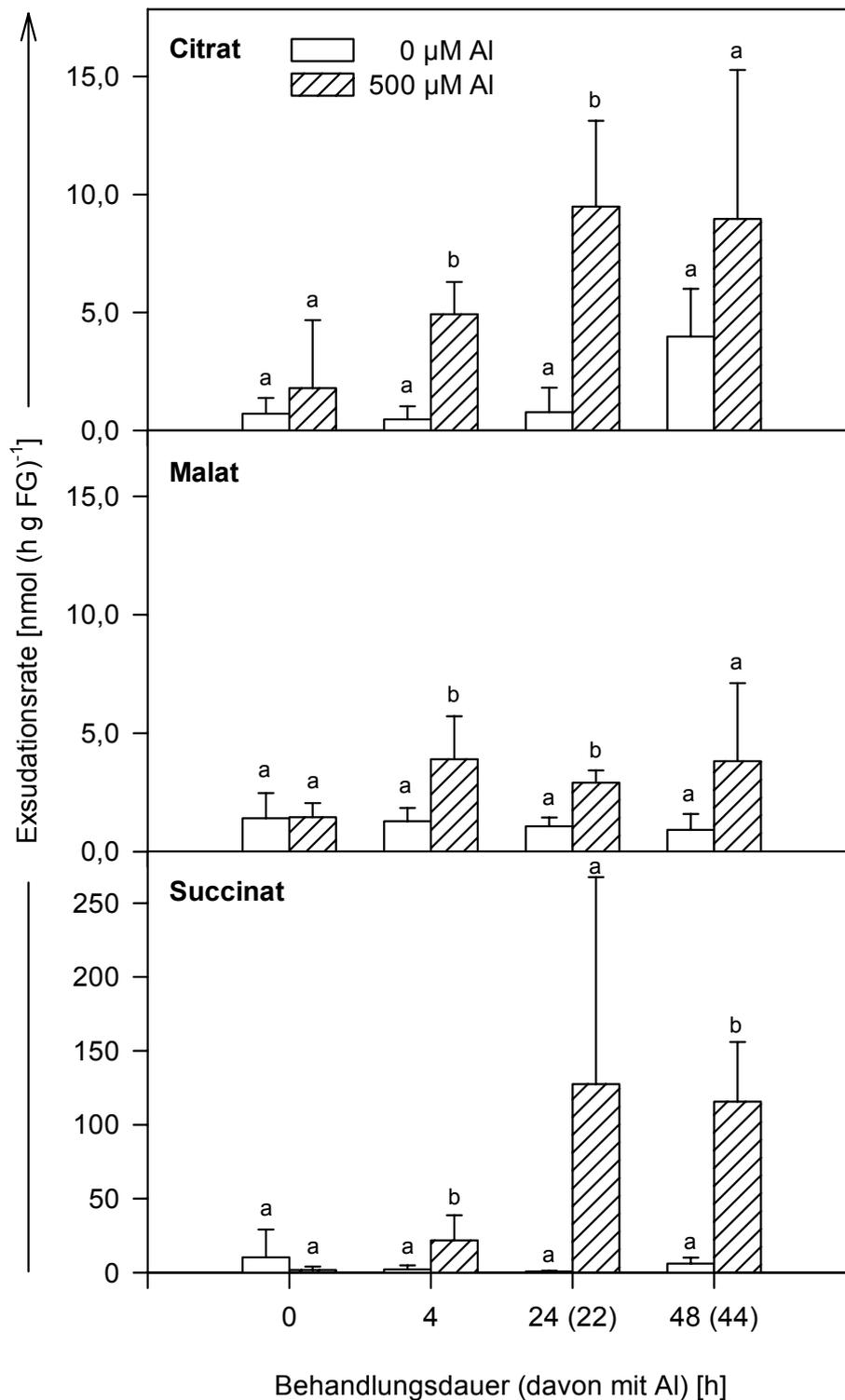


Abb. 3.35: Citrat-, Malat- und Succinat-Exsudationsraten von Wurzeln der Hortensien-sorte 'Renate Steiniger' 0, 4, 24 und 48 h nach Behandlungsbeginn, davon 0, 4, 22 und 44 h bei einem Al-Angebot von 500 μM. Sammlung der Exsudate für jeweils 2 h in 100 μM CaCl₂, pH-Wert 4,3. Gleiche Buchstaben kennzeichnen nicht signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Kontrollen und der Al-Behandlungen (Tukey-Test, $p < 0,05$). $n = 6$.

3.6 Al-Verlagerung in den Blütenstand und Blaufärbung in Nährlösungskultur

Die Al-Verlagerung aus der Nährlösung in die Blütenstände sollte durch Bestimmung des Al-Gehalts von Internodien, Blattpaaren, Rispenästen und Sepalen von bewurzelten Blütenstecklingen der Sorten 'Renate Steiniger', 'Adria' und 'Blauer Ball' nach 0-, 2-, 5-, 10- und 15tägiger Behandlung mit 500 μM AlCl_3 untersucht werden (2.2.6).

3.6.1 Al-Gehalte

Die Al-Gehalte der Rispenäste erster und zweiter Ordnung sowie der Sepalen nahmen bei allen Sorten mit längerer Behandlungsdauer zu (Abb. 3.36). Eine Ausnahme hiervon bildete nur die Sorte 'Renate Steiniger', die bereits nach 5 Tagen maximale Al-Gehalte aufwies.

Bereits nach 5 Tagen betrug der Al-Gehalt in den Sepalen der Sorte 'Renate Steiniger' 0,74 mg (g TS)⁻¹. Damit wurde der Al-Gehalt von 'Adria' um das 30fache und von 'Blauer Ball' um das 55fache übertroffen. Nach 15tägiger Al-Behandlung erreichte 'Adria' mit 0,67 mg (g TS)⁻¹ einen ähnlichen Al-Gehalt wie 'Renate Steiniger' bereits nach 5 Tagen. 'Blauer Ball' wies nach 15 Tagen einen um den Faktor 4 niedrigeren Al-Gehalt in den Sepalen auf als 'Renate Steiniger' und 'Adria'. Die Al-Gehalte in den Sepalen lagen gemittelt über alle Sorten und Erntetermine um den Faktor 2,3 und 2,1 höher als in den Rispenästen erster und zweiter Ordnung.

Wie Abb. 3.37 zeigt, traten nach 15tägigem Al-Angebot innerhalb einer Sorte große Unterschiede zwischen den Einzelpflanzen beim Al-Transport von der Sproßbasis zu den Sepalen auf. Diese übertrafen teilweise die Sortenunterschiede deutlich. Einige Einzelpflanzen wiesen in den basalen Blättern und Internodien niedrige Al-Gehalte auf, während in den apikalen Blättern und Sepalen relativ hohe Al-Gehalte beobachtet wurden (RS 2, RS 3, BB 3). Bei anderen Einzelpflanzen wiesen basale oder mediale Internodien wesentlich höhere Al-Gehalte als apikale Internodien auf (RS 1, RS 4, AD 1). Die Al-Gehalte in den Blättern ähnelten zum Teil den Al-Gehalten der entsprechenden Internodien oder übertrafen diese zum Teil um ein Vielfaches. Insbesondere in den apikalen Blattpaaren fand bei den meisten Pflanzen von 'Renate Steiniger' und 'Adria' eine starke Al-Akkumulation statt (RS 2 - 4, AD 1-3), so daß hier durchschnittlich höhere Al-Gehalte als in den entsprechenden Internodien und in den Sepalen erreicht wurden. Auch in den apikalen Blättern von zwei Pflanzen der Sorte 'Blauer Ball' waren

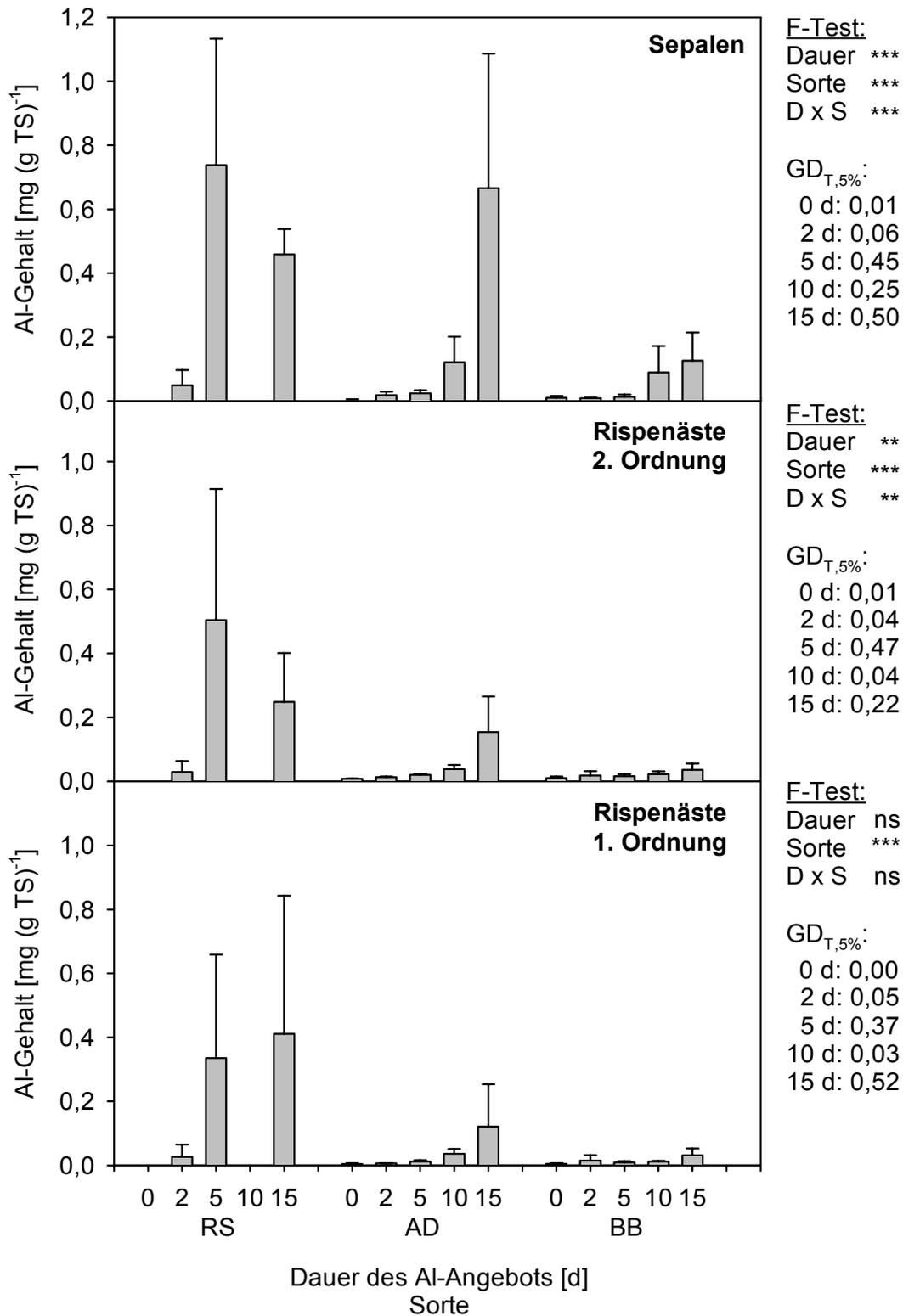


Abb. 3.36: Al-Gehalte in Rispenästen erster und zweiter Ordnung und in Sepalen von bewurzelten Blütenstecklingen der Hortensiensorten 'Renate Steiniger', 'Adria' und 'Blauer Ball' nach 0-, 2-, 5-, 10- und 15tägigem Angebot von 500 μM AlCl_3 . $\text{GD}_{T, 5\%}$: für Sortenunterschiede getrennt nach Al-Angebotsdauer. $n = 4$.

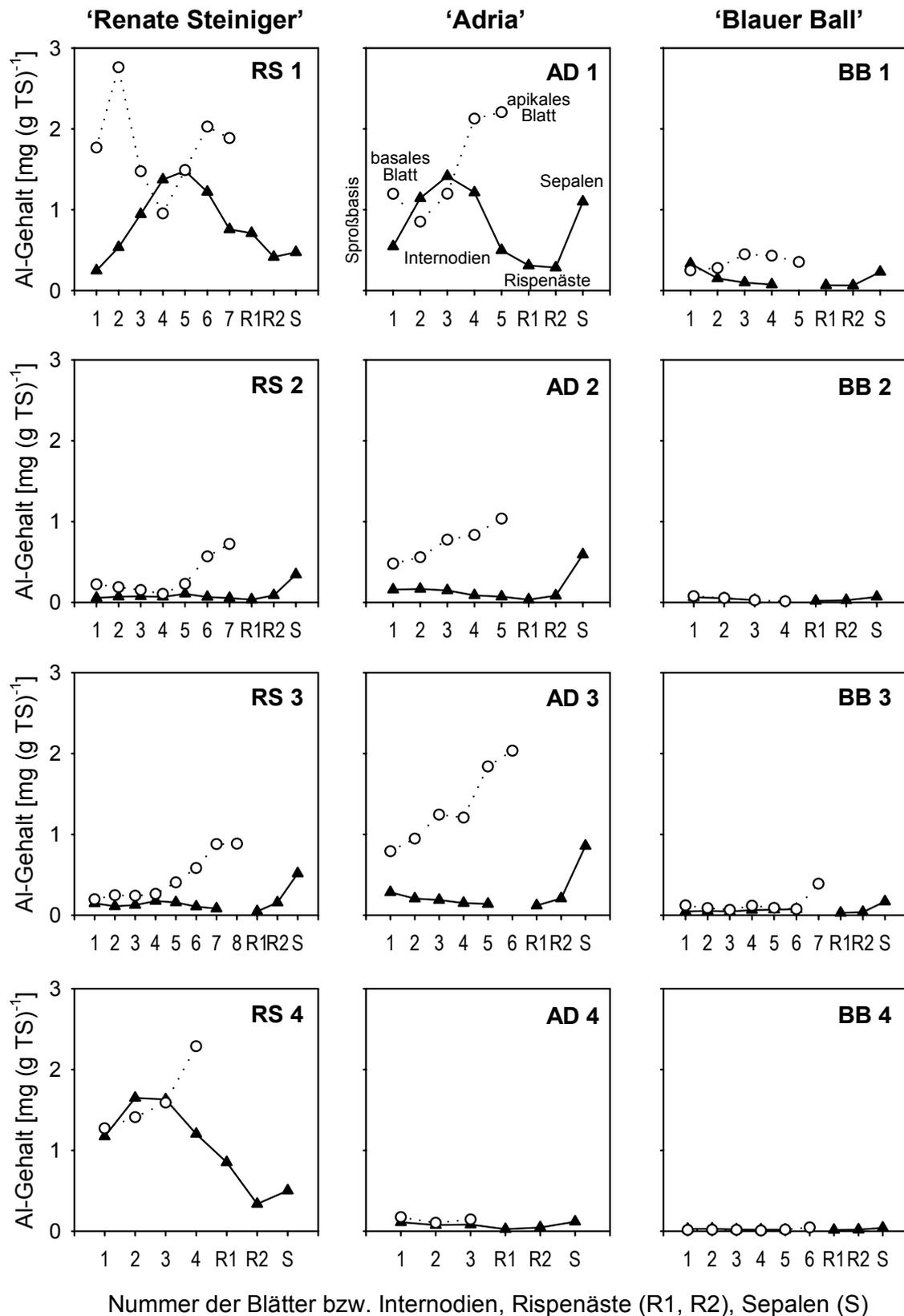


Abb. 3.37: Al-Verteilung in bewurzelten Blütenstecklingen nach 15tägigem Angebot von 500 μM AlCl_3 . Numerierung der Blätter und Internodien an der Sproßbasis (links) mit 1 beginnend, aufsteigend in Richtung Blütenstand (rechts): Rispenästen erster (R1) und zweiter Ordnung (R2) und Sepalen (S). Untereinander dargestellt je vier Einzelpflanzen der Hortensiensorten 'Renate Steiniger' (RS 1-4), 'Adria' (AD 1-4) und 'Blauer Ball' (BB 1-4).

die Al-Gehalte leicht erhöht (BB 1, BB 3). In drei Einzelpflanzen (AD 4, BB 2, BB 4) erfolgte keine nennenswerte Al-Verlagerung in den Sproß. Im Mittel über alle 12 Einzelpflanzen wiesen die Al-Gehalte von Internodien und Blättern deutlich höhere Variationskoeffizienten als die Al-Gehalte der Sepalen auf.

3.6.2 Beziehung zwischen Al-Gehalt und Farbe der Sepalen

Die ersten Anzeichen der Blaufärbung ließen sich bei ‘Renate Steiniger’ bereits nach 2 Tagen, bei ‘Adria’ nach 3 und bei ‘Blauer Ball’ nach 5 Tagen erkennen (nicht dargestellt). Abb. 3.38 zeigt die typische Blaufärbung von bewurzelten Hortensienstecklingen nach 15tägiger Al-Behandlung. Die Farbunterschiede von Einzelpflanzen einer Sorte zu einem Erntetermin betragen allerdings bis zu zwei Boniturnoten. Der Al-Gehalt der Sepalen war über die drei Sorten hinweg signifikant positiv mit der Blaufärbung der Sepalen korreliert (Abb. 3.39).



Abb. 3.38: Foto von bewurzelten Blütenstecklingen der Hortensiensorten ‘Renate Steiniger’, ‘Adria’ und ‘Blauer Ball’ nach 15tägigem Angebot von 500 µM AlCl₃.

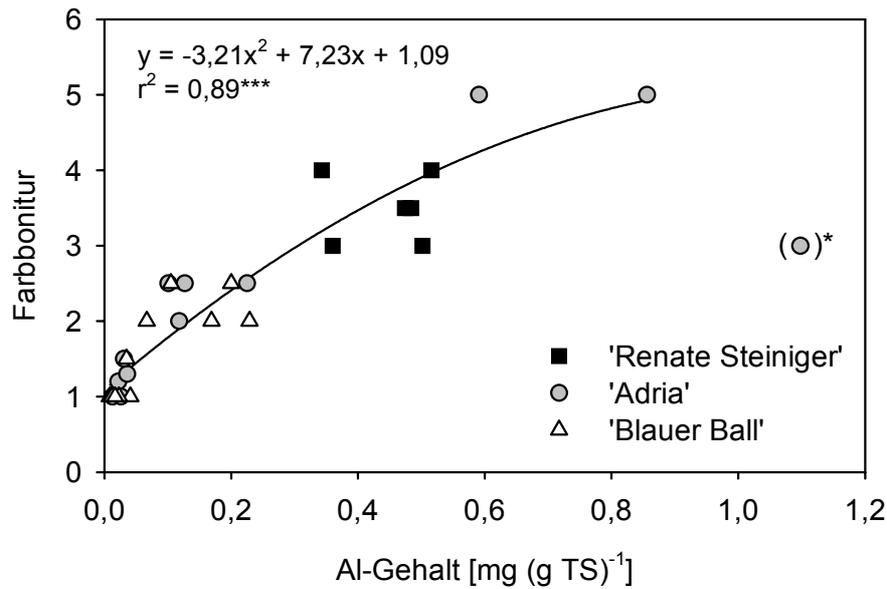


Abb. 3.39: Beziehung zwischen dem Al-Gehalt und der Farbbonitur von Sepalen der Hortensiensorten 'Renate Steiniger', 'Adria' und 'Blauer Ball' nach 0- bis 15tägigem Angebot von 500 μM AlCl_3 . * aufgrund von starken Nekrosen nicht bei Korrelationsberechnung berücksichtigt.

3.7 Einflußfaktoren auf die Al-Verlagerung in die Sepalen

3.7.1 Blütenstandsgröße

Die Al-Verlagerung in Blütenstände verschiedener Größe wurde untersucht, um herauszufinden, ob bestimmte Entwicklungsphasen von besonderer Bedeutung für die Al-Verlagerung in die Blütenstände sind (2.2.7.1). Die aus dem Substrat in die Blütenstände verlagerte Al-Menge war positiv linear mit dem Trockengewicht und der Fläche der Blütenstände korreliert (Abb. 3.40A und B). Der Al-Gehalt betrug durchschnittlich $0,69 \text{ mg (g TS)}^{-1}$ und war nicht signifikant mit dem Trockengewicht (Abb. 3.40C) oder der Fläche der Blütenstände korreliert (nicht dargestellt).

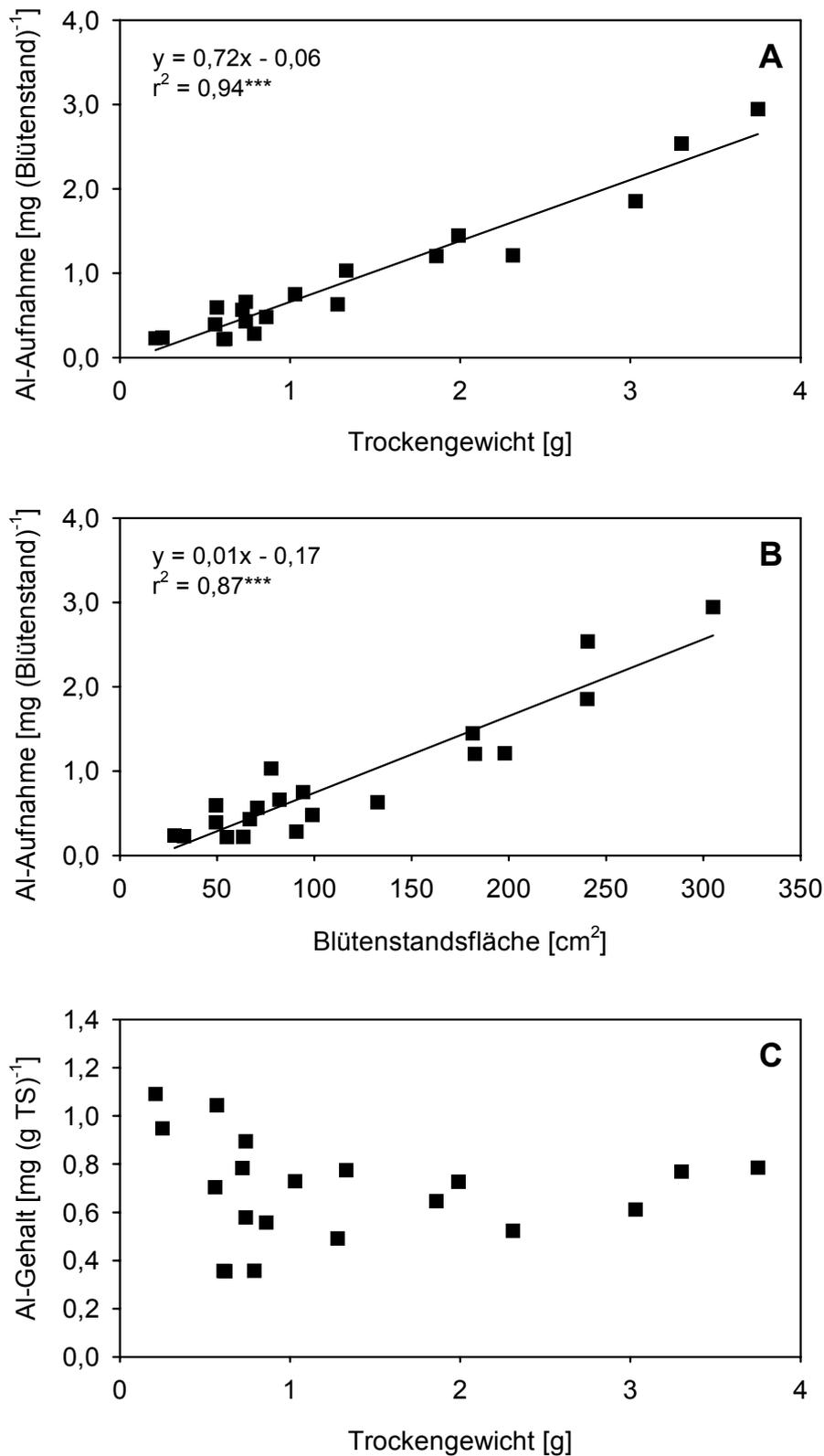


Abb. 3.40: Beziehung zwischen der in die Blütenstände der Hortensiensorte ‘Renate Steiniger’ aufgenommenen Al-Menge und dem Trockengewicht (A) bzw. der Fläche (B) der Blütenstände. (C) Beziehung zwischen Al-Gehalt und Trockengewicht der Blütenstände. Pflanzen zuvor für 12 Monate in Substrat kultiviert, Substrat-pH-Wert durch Gießen von 10 g $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{H}_2\text{O}$ (L Substrat)⁻¹ auf 3,8 abgesenkt.

3.7.2 Unterbrechung des Phloemtransports durch Ringelung

Mittels Unterbrechung des Phloemtransports durch Ringelung der Sproßachse unter dem Blütenstand (2.3.14) sollte untersucht werden, ob Al im Phloem in den Blütenstand verlagert wird. Die Untersuchungen wurden an Pflanzen in Substrat und in Nährlösungskultur durchgeführt (2.2.7.2).

Substratkultur:

Sieben Tage nach der Ringelung wiesen die Sepalen und Doldenstiele der unterhalb der Blütenstände geringelten Hortensientriebe der Sorte 'Renate Steiniger' nur geringfügig, nicht signifikant niedrigere Al-Gehalte auf als die der nicht geringelten Triebe (Abb. 3.41). Die Al-Gehalte im Stengelstück unter der Ringelstelle und einem entsprechenden Stengelstück der ungeringelten Triebe unterschieden sich nicht. Zum Zeitpunkt des Ringelns betrug die Fläche sowohl der nicht geringelten als auch der geringelten Blütenstände durchschnittlich 52 cm^2 . Sieben Tage später war die Fläche der nicht geringelten Blütenstände mit $89 \pm 44 \text{ cm}^2$ um ein Drittel größer als die Fläche der geringelten ($56 \pm 30 \text{ cm}^2$), das Trockengewicht der Sepalen von nicht geringelten Blütenständen lag mit $1,1 \pm 0,4 \text{ g}$ um 27 % höher als das von geringelten ($0,8 \pm 0,4 \text{ g}$). Auch die in die Sepalen von nicht geringelten Blütenständen aufgenommene Al-Menge betrug mit $0,60 \pm 0,23 \text{ mg}$ ein Drittel mehr als die von geringelten Blütenständen ($0,40 \pm 0,21$). Die zuvor genannten Unterschiede bezüglich Durchmesser der Blütenstände, Trockengewicht der Sepalen und der in die Sepalen aufgenommenen Al-Menge zwischen nicht geringelten und geringelten Trieben waren nicht signifikant (nicht dargestellt).

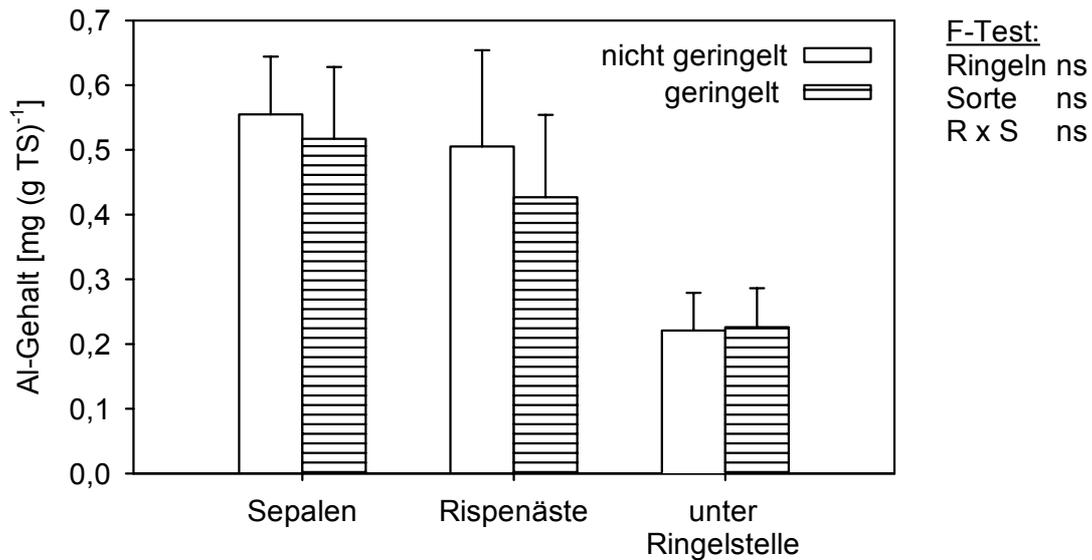


Abb. 3.41: Al-Gehalte in Sepalen, Rispenästen und einem 2,5 cm langen Stück der Sproßachse unterhalb der Ringelstelle bzw. einem entsprechenden Stück der nicht geringelten Triebe von Hortensienpflanzen der Sorte 'Renate Steiniger' 7 Tage nach der Ringelung. Pflanzen zuvor für 12 Monate in Substrat kultiviert, Substrat-pH-Wert durch Gießen von $4 \text{ g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O} (\text{L Substrat})^{-1}$ auf 4,3 abgesenkt, nach der Ringelung weitere Behandlung mit $1 \text{ g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O} (\text{L Substrat})^{-1}$. $n = 6$.

Nährlösungskultur:

Nach der Ringelung und 5tägiger Behandlung mit $500 \mu\text{M AlCl}_3$ unterschieden sich die Al-Gehalte in den Sepalen von Hortensienpflanzen der Sorte 'Renate Steiniger' nicht von denen der nicht geringelten Pflanzen (Abb. 3.42). 'Adria' und 'Blauer Ball' hingegen wiesen in den Sepalen geringelter Pflanzen mit $0,06$ und $0,01 \text{ mg (g TS)}^{-1}$ jeweils nur 53 % vom Al-Gehalt ungeringelter Pflanzen auf, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war. Da sich das Trockengewicht der Sepalen von geringelten und nicht geringelten Pflanzen nicht signifikant unterschied, ergab sich für die in die Sepalen verlagerten Al-Mengen (nicht dargestellt) ein ähnliches Bild wie für die Al-Gehalte.

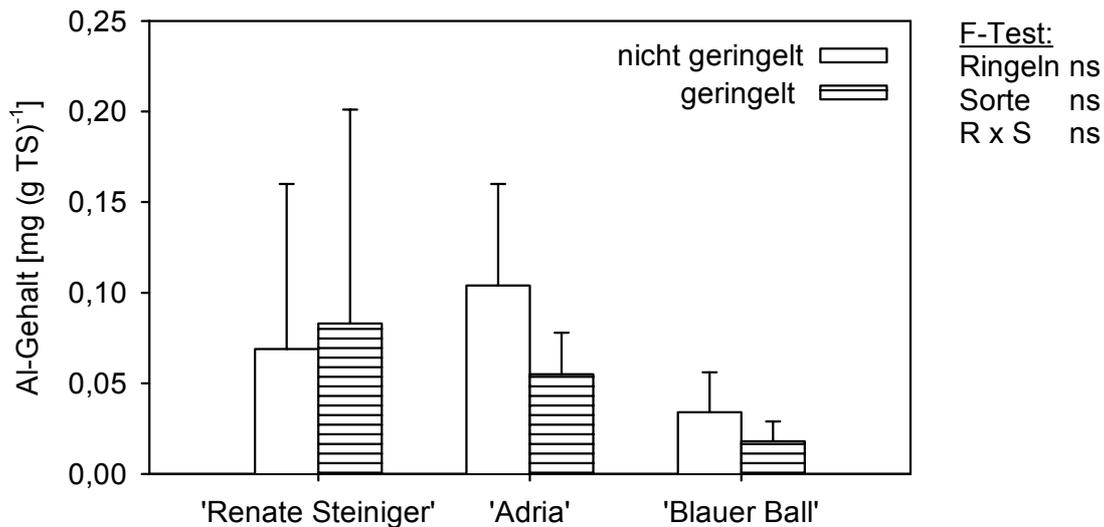


Abb. 3.42: Al-Gehalte in Sepalen von nicht geringelten und geringelten 15 Monate alten, eintriebigen Hortensienpflanzen der Sorten 'Renate Steiniger', 'Adria' und 'Blauer Ball' nach 5tägiger Behandlung mit 500 μM AlCl_3 . 'Renate Steiniger': n = 6; 'Adria': n = 4; 'Blauer Ball': n = 5.

3.7.3 Transpiration

Durch Eintüten von Blütenständen und Eintüten plus Zugabe von Silikagel sollte die Luftfeuchtigkeit und dadurch die Transpiration der Blütenstände variiert werden (2.2.7.3), um den Einfluß der Transpiration auf die Al-Verlagerung in die Blütenstände zu untersuchen. Die höchsten Al-Gehalte wurden in Blütenständen nachgewiesen, die für drei Wochen in Tüten mit Silikagel gesteckt hatten (Abb. 3.43). Blütenstände der Sorte 'Renate Steiniger' in Tüten mit Silikagel wiesen mit $1,14 \text{ mg (g TS)}^{-1}$ um 20 % signifikant höhere Al-Gehalte auf als nicht eingetütete. Bei 'Adria' war dieser Unterschied nicht signifikant. Hingegen übertrafen die Al-Gehalte von Blütenständen in Tüten mit Silikagel der Sorte 'Adria' mit $1,17 \text{ mg (g TS)}^{-1}$ die der eingetüteten signifikant um 15 %. Blütenstände beider Sorten ohne und mit Tüte unterschieden sich nicht signifikant bezüglich ihrer Al-Gehalte. Weder durch Eintüten noch durch die Zugabe von Silikagel wurde das Trockengewicht der Blütenstände beeinflusst, weshalb sich für die in die Blütenstände verlagerten Al-Mengen dasselbe Bild wie für die Al-Gehalte ergab (nicht dargestellt).

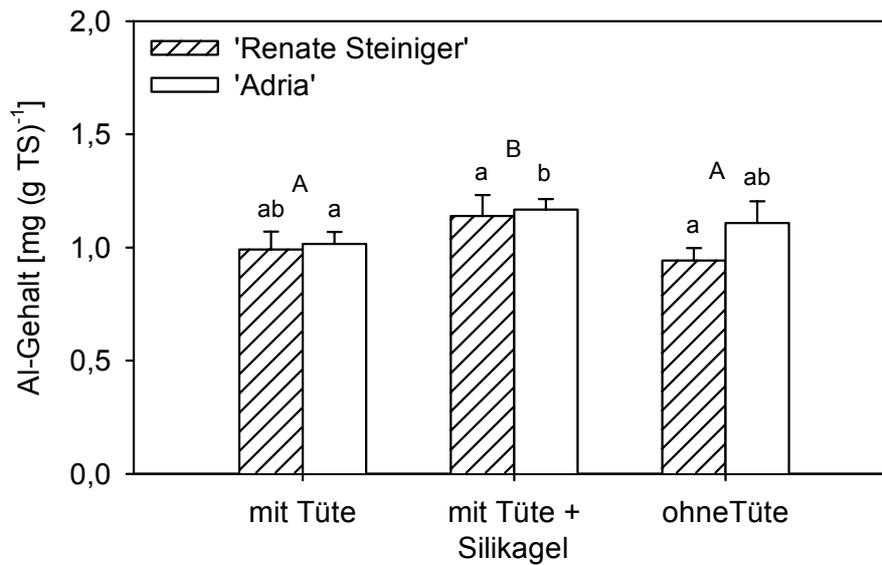


Abb. 3.43: Al-Gehalte von Blütenständen je einer 3 Jahre alten Hortensienpflanze der Sorte 'Renate Steiniger' und 'Adria' in Abhängigkeit von einer für 3 Wochen veränderten Luftfeuchtigkeit. Erhöhung der Luftfeuchtigkeit sollte durch Eintüten der Blütenstände, Verminderung durch Zugabe von Silikagel in die Tüte erreicht werden. Pflanzen zuvor mit $8 \text{ g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O (L Substrat)}^{-1}$ behandelt. Gleiche Buchstaben kennzeichnen nicht signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten getrennt nach Sorten (a, b) und gemittelt über die Sorten (A, B) (Tukey-Test, $p < 0,05$). $n = 4$.

3.8 Bestimmung der Al-Konzentration im Vakuolensaft von Sepalen

Zur Bestimmung der Al-Konzentration wurde Vakuolensaft aus Subepidermiszellen von Sepalen der Hortensienarten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' nach Angebot von 0, 2 und 6 $\text{g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O (L Substrat)}^{-1}$ (2.2.8) mittels modifizierter Druckmeßsondentechnik (2.3.15) entnommen und mittels Energiedispersiver Röntgenmikroanalyse (2.3.16) untersucht.

Für eine korrekte Entnahme des Vakuoleninhalts aus Subepidermiszellen spricht die Tatsache, daß Proben von rosa Sepalen im Lichtmikroskop erkennbar rosa und von blauen Sepalen blau gefärbt waren. Die Abb. 3.44 zeigt EDXA-Spektren von Vakuolensaft aus Subepidermiszellen von Hortensiensepalen der Sorte 'Renate Steiniger' nach Angebot von 0 und 6 $\text{g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O (L Substrat)}^{-1}$. Ohne Al-Behandlung des Substrats lag die Al-Konzentration in den gemessenen Vakuolensaftproben der Sorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' unterhalb der Nachweisgrenze, die etwa bei 1,5 mM liegt. Nach Al-Angebot ließ sich eindeutig Al im Vakuolensaft nachweisen.

Nach Angebot von $6 \text{ g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O} (\text{L Substrat})^{-1}$ betrug die durchschnittliche Al-Konzentration in den analysierten Vakuolensäften der Sorte ‘Renate Steiniger’ ca. $6,5 \text{ mM}$, während sie bei ‘Blauer Ball’ mit ca. $3,5 \text{ mM}$ deutlich niedriger lag (Abb. 3.45). Die Sorte ‘Renate Steiniger’ wies mit ca. $3,0 \text{ mM Al}$ in den analysierten Vakuolensaftproben bereits bei einem Al-Angebot von $2 \text{ g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O} (\text{L Substrat})^{-1}$ eine ähnliche Konzentration auf wie ‘Blauer Ball’ bei dem hohen Al-Angebot von $6 \text{ g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O} (\text{L Substrat})^{-1}$. Der Variationskoeffizient der 3 bis 4 Wiederholungsmessungen aus derselben Vakuolensaft-Mischprobe war bei Meßwerten um 3 mM Al mit 58 bis 112 relativ hoch, bei Meßwerten um $6,5 \text{ mM}$ lag er mit 4 bis 31 deutlich niedriger. Die Konzentration im Vakuolensaft war über beide Sorten signifikant positiv mit den Farbboniturnoten der Sepalen korreliert (Abb. 3.46).

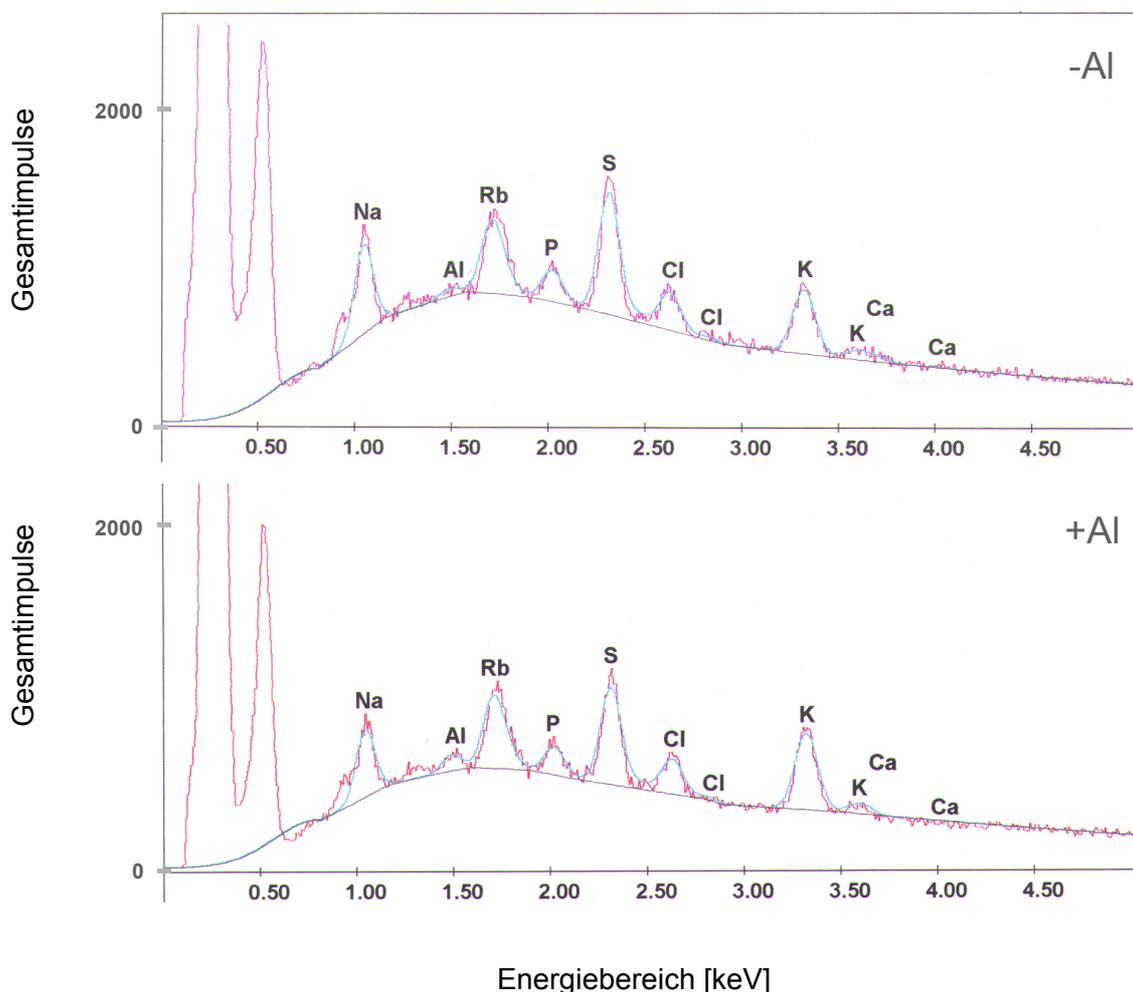


Abb. 3.44: EDXA-Spektren von Vakuolensaft aus Subepidermiszellen von Hortensien-sepalen der Sorte ‘Renate Steiniger’ nach Angebot von (-Al) 0 und (+Al) $6 \text{ g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O} (\text{L Substrat})^{-1}$. Aus den gemessenen Gesamtimpulsen (rote Linie) wurde von der Kalibrationssoftware eine Funktion errechnet, die zur Ermittlung der „Peakfläche“ zwischen der zugehörigen Kurve (blaue Linie) und der Basislinie (schwarz) diene.

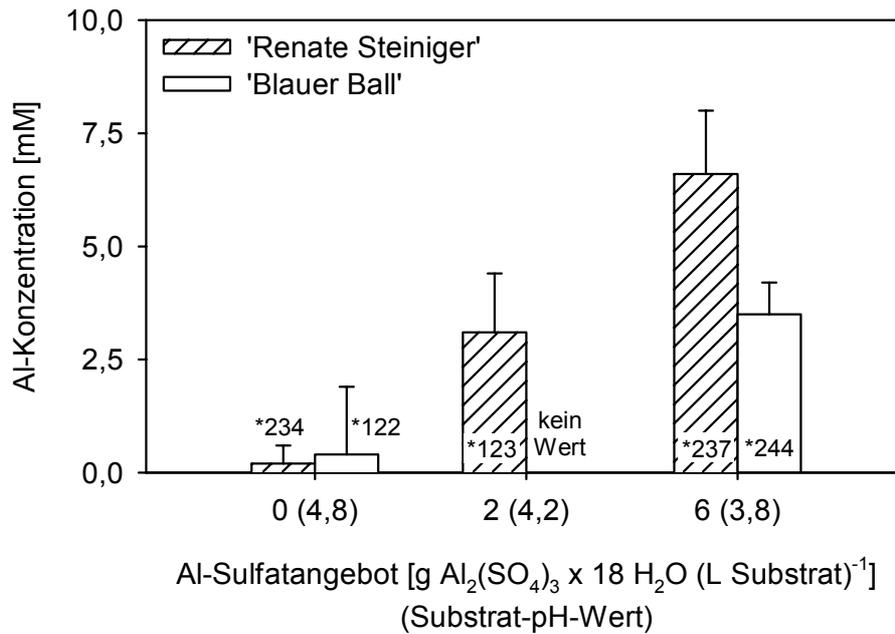


Abb. 3.45: Al-Konzentration im Vakuolensaft aus Subepidermiszellen von Hortensiensepalen der Sorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' nach Angebot von 0, 2 und 6 g Al₂(SO₄)₃ x 18 H₂O (L Substrat)⁻¹ und bei Substrat-pH-Werten von 4,8, 4,2 und 3,8.

*n₁n₂n₃ gibt die Anzahl an Pflanzen (n₁), Sepalen (n₂) und Vakuolensaft-Mischproben (n₃) aus 15 Subepidermiszellen an, die zur Bildung der Mittelwerte analysiert wurden.

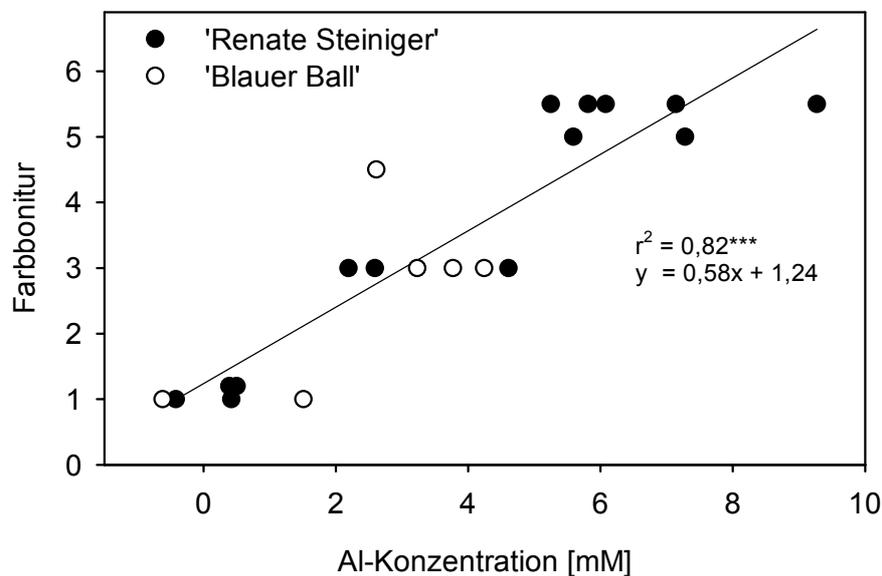


Abb. 3.46: Beziehung zwischen der Al-Konzentration im Vakuolensaft (Mischprobe aus je 15 Subepidermiszellen) und der Farbbonitur von Sepalen der Hortensienarten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball'.

4 DISKUSSION

4.1 Einfluß des Al-Angebots auf Al-Verlagerung und Blaufärbung verschiedener Sorten in Substratkultur

Nach der am Institut für Pflanzenernährung (IPE) entwickelten Strategie zur Blaufärbung von Hortensien wird die zur Absenkung des Substrat-pH-Werts auf circa 4,3 benötigte Al-Sulfatmenge bereits vor Kulturbeginn mit Hilfe einer „Pufferkurve“ (Abb. 2.1) abgeschätzt (Weithmann *et al.*, 1995; Horst und Weithmann, 1997; Weithmann und Horst, 1997). Im vorliegenden Versuch (2.2.1, 3.1) sollte die Blaufärbbarkeit von verschiedenen Hortensiensorten mit Hilfe dieser Strategie untersucht werden. Außerdem sollten grundlegende Erkenntnisse über die Zusammenhänge zwischen Al-Applikation, Substrat-pH-Wert, Al-Verlagerung in der Pflanze und Blaufärbung der Sepalen gewonnen werden. Den organischen Säuren im Xylemsaft wurde als möglichen Komplexoren für Al und denkbarer Ursache für die außergewöhnliche Al-Verlagerung in Hortensien besondere Beachtung geschenkt. Durch den Sortenvergleich sollten Ursachen für die sortenspezifischen Unterschiede in der Blaufärbung aufgedeckt werden.

Substrat-pH-Werte

Durch Al-Behandlung mit 3, 6 und 12 g Al-Sulfat wurde der pH-Wert des unbehandelten Substrats im Mittel über die acht Sorten von 6,1 über 5,4 und 4,9 auf 4,3 abgesenkt (Abb. 3.1). Verglichen mit den ursprünglich angestrebten Ziel-pH-Werten von 5,0, 4,5 und 4,0 lagen diese Werte um 0,3 bis 0,4 pH-Werteinheiten höher. Diese Abweichung entspricht einer Verschlechterung der Bonitur der Blaufärbung um den Wert 0,7. Auch eine solche Abweichung von der optimalen Blaufärbung führt noch zu Pflanzen, deren Blaufärbung als gut bis zufriedenstellend zu bezeichnen ist. Damit wäre die erzielte Blaufärbung deutlich besser, als sie durchschnittlich im Endverkauf anzutreffen ist. Bei den Sorten ‘Adria’, ‘Blauer Zwerg’ und ‘Elbtal’ stimmten die gemessenen pH-Werte sogar relativ genau mit den Ziel-pH-Werten überein. In zwei ähnlichen Versuchen im Kulturjahr 1996/97 wurden, gemittelt über die Sorten, sogar noch geringere Abweichungen von 0,01 bis 0,18 pH-Werteinheiten im Vergleich zu den Ziel-pH-Werten beobachtet (Naumann und Horst, 1998). Die vorliegenden Untersuchungen zeigen die gute Eignung der Al-Pufferkurve (Abb. 2.1) zur Abschätzung des Al-Bedarfs zur

Absenkung des pH-Werts im Substrat bei verschiedenen Hortensiensorten. Eine Kontrolle der pH-Werte im Substrat im Kulturverlauf bleibt jedoch unerlässlich. Dann können Abweichungen vom berechneten Al-Bedarf zur Absenkung auf einen definierten Ziel-pH-Wert im Kulturverlauf durch entsprechende Anpassung der Al-Sulfatapplikation leicht korrigiert werden. Trotz einer den pH-Wert stabilisierenden, nitratbetonten Düngungsstrategie sind Abweichungen vom Ziel-pH-Wert aufgrund wechselnder klimatischer und betrieblicher Kulturbedingungen (z. B. hartes Gießwasser) möglich.

Farbbonitur

Die beste Blaufärbung wurde bei allen Sorten bei dem höchsten Al-Angebot und einem Substrat pH-Wert von 4,3 erzielt (Abb. 3.2). Sie war bei allen Sorten außer 'Blauer Ball' als gut zu beurteilen. Um eine bessere Blaufärbung der Sorte 'Blauer Ball' zu erreichen, wäre ein höheres Al-Angebot und somit eine stärkere Absenkung des Substrat-pH-Werts notwendig gewesen, als im vorliegenden Versuch erfolgte. Aufgrund der Versuchsergebnisse der Kulturjahre 1996/97 und 1997/98 ist die Einstellung eines pH-Werts zwischen 4,5 und 4,3 zur Erzielung einer guten Blaufärbung empfehlenswert. Mit besonders leicht blau zu färbenden Sorten wie 'LK15', 'Blaumeise' und 'Renate Steiniger' kann bei ausreichendem Al-Angebot und entsprechender Pufferkapazität des Substrats bereits bei einem pH-Wert von 5,0 eine zufriedenstellende Blaufärbung erreicht und so die Gefahr von Wurzelschäden durch Al- und Protonentoxizität vermindert werden. Bei einer geringen Al-Pufferkapazität des Substrats und einem geringeren Al-Angebot als 4 g Al-Sulfat pro Liter Substrat kann jedoch auch eine Absenkung des pH-Werts von 4,0 auf 3,8 noch zu einer Verbesserung der Blaufärbung führen (Kulturjahr 1998/1999, nicht dargestellt). Die Verbesserung der Blaufärbung ist wahrscheinlich jedoch mit einer Verminderung der Wurzel- und Sproßqualität aufgrund des niedrigen pH-Werts verbunden. Deshalb ist die Wahl eines Substrats mit höherer Al-Pufferkapazität entscheidend für die Produktion qualitativ hochwertiger Hortensien nach der Strategie IPE.

Farbmessung

Die Blaufärbung wurde nicht nur mit Hilfe einer Farbbonitur, sondern zusätzlich auch mit einem Farbmeßgerät erfaßt. Hierfür gab es folgende Gründe: 1. Die sortentypischen Unterschiede der Ausgangsfarbe – mehr rosa oder mehr rot – und der maximal erreichbaren Blaufärbung führen dazu, daß gleiche Boniturnoten bei unterschiedlichen Sorten

nicht für identische Farben stehen. Der Vergleich von eher rot gefärbten mit eher rosa gefärbten Sorten ist deshalb bei der Farbbonitur schwierig. 2. Individuelle Boniturfehler können vermieden werden. Die Farbmessung ermöglicht den Vergleich von Versuchen verschiedener Jahre. Dies ist aufgrund der Schwierigkeit der Aufstellung desselben Boniturschemas in verschiedenen Jahren kompliziert, vor allem wenn die Bonitur von unterschiedlichen Personen durchgeführt wird. 3. Im Gegensatz zur Farbbonitur führt die Farbmessung nicht zu ordinalskalierten, sondern zu metrischen Datensätzen. Dies verbessert die Eigenschaften der Daten für die statistische Auswertung.

Die weitgehende Übereinstimmung bei der Bewertung der Blaufärbung mittels Farbbonitur und –messung spricht für die Eignung beider Methoden (Abb. 3.2, Abb. 3.4). Eine signifikante Verbesserung der Blaufärbung durch das höchste Al-Angebot im Vergleich zum mittleren wurde jedoch für die meisten Sorten nur durch die Farbbonitur, aber nicht durch die Farbmessung nachgewiesen. Die relative Standardabweichung war zwar bei der Farbmessung niedriger als bei der Farbbonitur, aber dies ist vermutlich vorwiegend darauf zurückzuführen, daß der Farbabstand nur an einer repräsentativen von fünf Pflanzen gemessen wurde. Da die Farbmessung deutlich aufwendiger als die Farbbonitur ist, sind die Vorteile der Farbmessung mit dem Nachteil verbunden, daß in derselben Zeit geringere Stichprobenanzahlen erfaßt werden können. Als weiterer Nachteil der Farbmessung erwies sich, daß der Unterschied zwischen guter bis sehr guter Blaufärbung mit der Farbbonitur besser zu erfassen ist als mit der Farbmessung: Werden Farbbonitur und Farbabstand gegen den Al-Gehalt der Sepalen aufgetragen, so verläuft die Steigung des Farbabstands bei hohen Al-Gehalten flacher als bei der Farbbonitur (Abb. 3.8). Begründet ist dies wahrscheinlich darin, daß sich gut und sehr gut blau gefärbte Sepalen vor allem in der Ausfärbung des Randbereichs unterscheiden. Der Randbereich wird jedoch aufgrund der kreisförmigen Öffnung des Farbmeßgeräts nur zu einem sehr geringen Prozentsatz berücksichtigt. Mit einer tortenstückförmigen Meßöffnung des Farbmeßgeräts könnte anteilig mehr Rand gemessen und so vermutlich eine Verbesserung der Methode erzielt werden.

Bei der Farbmessung schnitt 'Blauer Ball' weniger schlecht ab als bei der Farbbonitur. Dies ist eventuell auf den Umstand zurückzuführen, daß bei der Farbmessung der Sepalenrand nicht ausreichend berücksichtigt wurde. Außerdem spielt bei der Vergabe von Boniturnoten auch die Ästhetik der Farbe eine Rolle. Schmutzige Farben und

ungleichmäßig gefärbte Sepalen erhalten möglicherweise bei gleichem Farbabstand schlechtere Boniturnoten.

Die Tellerhortensie ‘Blaumeise’ wies den größten Farbabstand auf, obwohl sie nicht als besonders blau bonitiert worden war. Die schlechtere Bewertung bei der Bonitur ist auf die relativ stark rote Originalfarbe zurückzuführen. Dadurch erreichte diese Sorte auch bei maximalem Al-Gehalt der Sepalen keine reine Blaufärbung, sondern einen Lilaton.

Al- und Nährstoffgehalte der Sepalen

Für eine zufriedenstellende Blaufärbung der Sorte ‘Renate Steiniger’ ist ein Al-Gehalt von mindestens $1 \text{ mg Al (g TS)}^{-1}$ in den Sepalen erforderlich (Weithmann *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß entsprechende Al-Gehalte bei allen untersuchten Sorten zu einer zufriedenstellenden bis guten Blaufärbung führten (Abb. 3.8). Diese Beobachtung spricht dafür, daß Al-Gehalte von über 1 mg (g TS)^{-1} grundsätzlich eine zufriedenstellende Blaufärbung von rosa Sepalen garantieren. Der Al-Gehalt und die Blaufärbung der Sepalen waren über alle Sorten hinweg signifikant positiv miteinander korreliert. Insbesondere für die einzelnen Sorten war diese Korrelation für den Farbabstand deutlich enger als für die Farbbonitur. Sortenunterschiede bewirkten in der Regel bei gleichem Al-Gehalt der Sepalen höchstens eine positive oder negative Abweichung vom Sortenmittel von einer Boniturnote bzw. eine Veränderung des Farbabstands von 10.

Gemittelt über alle Sorten wurde in den Sepalen ein Al-Gehalt von $0,5 \text{ mg (g TS)}^{-1}$ mit einem Angebot von $3 \text{ g Al-Sulfat (L Substrat)}^{-1}$ erreicht (Abb. 3.6). In Anbetracht der bei dem hohen Substrat-pH-Wert von 5,4 geringen Al-Verfügbarkeit war dieser Al-Gehalt in den Sepalen unerwartet hoch und führte bereits zu einer mittelmäßigen Blaufärbung der Boniturnote 3,0. Mitverantwortlich für diese relativ hohe Al-Aufnahme war vermutlich eine ungleichmäßige Al-Verteilung im Topf, die lokal niedrigere pH-Werte bewirkte. Während ein Al-Sulfatangebot von $6 \text{ g (L Substrat)}^{-1}$ bei einem Substrat mit geringer Al-Pufferkapazität für eine gute Blaufärbung ausreicht, wurde hier mit einem Al-Gehalt von $0,8 \text{ mg (g TS)}^{-1}$ in den Sepalen und einer Boniturnote von 3,9 nur eine zufriedenstellende Blaufärbung erreicht. Aufgrund der hohen Al-Pufferkapazität des Substrats senkte dieses Al-Angebot den Substrat-pH-Wert nur auf 4,9 ab. Bei dem höchsten Angebot von 12 g Al-Sulfat und einem dadurch auf 4,3 abgesenkten Substrat-pH-Wert erhöhte sich der Al-Gehalt in den Sepalen auf $1,0 \text{ mg (g TS)}^{-1}$ und die Blaufärbung verbesserte sich auf die Boniturnote 4,6.

Neben dem gewünschten Effekt der Al-Behandlung auf die Blaufärbung sind bei hohem Al-Angebot negative Effekte auf die Pflanzenqualität zu erwarten. Sowohl Protonen- als auch Aluminiumtoxizität können zu einer Verminderung des Frischgewichts durch Konkurrenz bei der Kationenaufnahme (Godbold *et al.*, 1988; Marschner, 1991) und Verminderung der Phosphorverfügbarkeit (Marschner, 1995) führen. In diesem Versuch war das Sproßfrischgewicht nur bei der hohen Gabe von 12 g Al-Sulfat (L Substrat)⁻¹ signifikant um 14 % gegenüber der Kontrolle vermindert (Abb. 3.9). Durch die Al-Behandlung war der Ca-Gehalt der Sepalen signifikant vermindert, während die K- und Mg-Gehalte nicht abnahmen (Tab. 3.1). Die Ursache hierfür ist vermutlich die kontinuierliche Düngung mit relativ hohen K- und Mg-Konzentrationen. Ca wurde hingegen nicht gedüngt, sondern nur mit dem Leitungswasser zugeführt. Auch der P-Gehalt in den Sepalen war nach Al-Behandlung signifikant erniedrigt. Als Ursache hierfür kommt die Bildung von Al-Phosphaten im Substrat in Betracht (Lindsay und Walthall, 1989). Deren Löslichkeit und Pflanzenverfügbarkeit nimmt mit sinkendem pH-Wert ab. Für die Verminderung des Frischgewichts bei dem höchsten Al-Angebot spielte induzierter Ca-Mangel vermutlich eine größere Rolle als P-Mangel. Während der Ca-Gehalt der Sepalen mit 3,6 mg (g TS)⁻¹ unter den nach Stout (1961) empfohlenen Gehalt für optimale Entwicklung von 5 mg (g TS)⁻¹ absank, sollte ein P-Gehalt von 2,4 mg (g TS)⁻¹ noch für eine normale Entwicklung ausreichen.

Al und organische Säuren im Xylemsaft

Eine so starke Al-Verlagerung von der Wurzel in den Sproß im Xylemsaft wie bei der Hortensie setzt voraus, daß Al im Xylemsaft in gelöster Form vorliegt. Bei einem pH-Wert um 6 wäre aufgrund der Ausfällung von Al(OH)₃ nur eine geringe Konzentration an gelöstem Al zu erwarten (Lydersen *et al.*, 1991). Durch die Komplexierung von Al mit organischen Säuren wird die Löslichkeit von Al-Hydroxiden jedoch heraufgesetzt (Kwong und Huang, 1979). Zudem belegen zahlreiche Untersuchungen eine Verminderung der Phytotoxizität von monomerem Al durch stark komplexierende organische Säuren (Hue *et al.*, 1986; Ma, 2000 und Referenzen darin). Während einer durch organische Säuren verminderten Phytotoxizität von Al beim Transport in den toten Xylemzellen wahrscheinlich eine geringere Bedeutung zukommt, könnte sie beim Übergang des Al in den Blattapoplasten und der bei dortiger Akkumulation unvermeidlichen Aufnahme in den Symplast entscheidend sein. Bei der Al-akkumulierenden Pflanzenart Buchweizen fanden Ma und Hiradate (2000) Hinweise für einen Al-

Citratkomplex als Transportform im Xylem, während für die Detoxifizierung im Blattgewebe ebenso wie bei *Melastoma malabathricum* (Watanabe *et al.*, 1998) ein Al-Oxalatkomplex verantwortlich gemacht wurde (Ma *et al.*, 1998). Für die interne Detoxifizierung von Al in Blättern der Hortensie schrieben Ma *et al.* (1997) hingegen Citrat eine entscheidende Bedeutung zu. Um zu untersuchen, ob und welche organischen Säuren bei der Komplexbildung von Al während des Xylemtransports eine Rolle spielen, wurde zur Blütezeit Xylemsaft gesammelt und dessen Gehalt an Al, organischen Säuren und weiteren Mineralstoffen sowie dessen pH-Wert bestimmt. Mit Hilfe des Programms GEOCHEM-PC wurde die Komplexbildung von Al mit den denkbaren Bindungspartnern berechnet.

Nach der Al-Behandlung war die Al-Konzentration im Xylemsaft signifikant erhöht (Abb. 3.10). Die höchste gemessene Al-Konzentration betrug 0,57 mM. Die hohe Konzentration an Al im Xylemsaft läßt den Schluß zu, daß der Al-Transport im Xylem für die Al-Verlagerung von der Wurzel in den Sproß von entscheidender Bedeutung ist. Die Al-Konzentration im Xylemsaft der drei Sorten bei unterschiedlichem Al-Angebot wies, relativ gesehen, eine auffallende Ähnlichkeit zu den Al-Gehalten der Sepalen (Abb. 3.6) auf. Obwohl es sich bei dem zur Blüte gesammelten Xylemsaft nur um eine Momentaufnahme handelt, scheint sie erstaunlich aussagekräftig für das Verhältnis der Al-Gehalte der Sepalen verschiedener Al-Behandlungsstufen und Sorten zu sein, das das Ergebnis der Al-Aufnahme und -Verlagerung während der gesamten Kulturdauer ist. Kleinere Abweichungen von der weitgehenden Übereinstimmung zwischen den Al-Konzentrationen im Xylemsaft und den Al-Gehalten in den Sepalen unterstützen die Hypothese, daß es bei sehr hohem Al-Angebot im Verlauf der Kultur zu einer starken Schädigung der Wurzeln kommt und die Mineralstoffaufnahme dadurch gehemmt wird. Entsprechend dieser Hypothese war bei den Sorten 'Renate Steiniger' und 'Adria' die Al-Konzentration bei dem hohen Al-Angebot relativ zum mittleren Al-Angebot im Xylemsaft kleiner als das entsprechende Verhältnis der Al-Gehalte in den Sepalen. Der höchste Al-Gehalt in den Sepalen und die höchste Al-Konzentration im Xylemsaft von 'Blauer Ball' bei dem höchsten Al-Angebot ließen sich dementsprechend auf eine geringere Schädigung des Wurzelsystems und geringere Verminderung der Mineralstoffaufnahme zurückführen als bei den beiden anderen Sorten.

Für die Komplexbildung von Al im Xylemsaft scheint Citrat die größte Bedeutung von allen gemessenen organischen Säuren zuzukommen. Dafür spricht, daß 1. die Citrat-

und Al-Konzentrationen bei allen drei Sorten eng miteinander korrelierten (Abb. 3.12), 2. das Verhältnis äquimolar war, 3. der Al-Gehalt der Sepalen eng mit der Citratkonzentration im Xylemsaft korrelierte (Abb. 3.13) und 4. nach Berechnungen mit dem Spezifikationsprogramm GEOCHEM-PC zwischen 40 und 90 % des Al mit Citrat komplexiert waren (Abb. 3.11). Für den Sortenunterschied bei der Blaufärbung scheint die Fähigkeit zur Synthese ausreichender Citratmengen keine Rolle zu spielen. Trotz der schlechteren Blaufärbung war bei 'Blauer Ball' das Verhältnis von Citrat zu Al im Xylemsaft etwas höher als bei 'Renate Steiniger' und 'Adria'. Obwohl auch die Konzentrationen an Malat und Malonat mit steigendem Al-Angebot signifikant und die Succinatkonzentration tendenziell zunahm und ihre Konzentration sogar das 8-, 4- und 28fache der Citratkonzentration betrug, scheint ihre Bedeutung für die Komplexierung von Al geringer zu sein: Die Korrelation zwischen Al und Malat war signifikant, aber weniger eng als für Citrat. Dasselbe gilt für Succinat, außer für die Sorte 'Renate Steiniger', bei der diese Beziehung nicht signifikant war. Berechnungen mit GEOCHEM-PC weisen darauf hin, daß Malonat einen entscheidenden Beitrag zum besseren Al-Transport in die Sepalen bei den Sorten 'Renate Steiniger' und 'Adria' leisten könnte. Die Malonat- und die Al-Konzentration bei den Sorten 'Renate Steiniger' und 'Adria' korrelierten zwar nur lose miteinander ($p = 0,07$), nach Berechnungen mit GEOCHEM-PC sollen jedoch bei diesen beiden Sorten 16 bis 65 % des Al mit Malonat komplexiert vorliegen, während der Anteil bei 'Blauer Ball' mit 5 und 8 % vernachlässigbar ist. Sämtliche Spezifikationen mit GEOCHEM-PC sind jedoch mit großer Vorsicht zu behandeln, da Kommentare im Programm die Vertrauenswürdigkeit der benutzten Stabilitätskonstanten ($\log K$'s) in Frage stellen (Citrat: unterschiedliche Werte zitiert, aber benutzte Werte vereinbar mit denen anderer Quellen, Oxalat: einige Inkonsistenzen, Succinat: vorläufig (engl.: tentative), Malat: extrem vorläufig, Originalquelle konnte nicht zurückverfolgt werden, Malonat: nur als Annäherung zu betrachten). Bereits geringfügige Änderungen dieser Stabilitätskonstanten können die Speziesverteilung entscheidend beeinflussen.

Untersuchungen von Hue *et al.* (1986) zur Hemmung des Wurzelwachstums durch mit organischen Säuren komplexiertem Aluminium lassen Zweifel aufkommen, inwieweit die mit GEOCHEM-PC berechneten Speziesverteilungen der Realität entsprechen. Während Al nach eigenen Berechnungen mit GEOCHEM-PC bei gleicher Konzentration an Malat und Malonat nur zu einem geringen Teil mit Malat komplexiert war, verminderten nach Hue *et al.* (1986) gleiche Konzentrationen dieser Säuren die Hem-

mung des Wurzelwachstums durch Al in ähnlichem Ausmaß. Die basierend auf dem Wurzelwachstum berechneten ähnlichen Stabilitätskonstanten für Al-Komplexe mit Malat bzw. Malonat stimmten darüber hinaus nach Hue *et al.* (1986) gut mit bereits veröffentlichten Stabilitätskonstanten überein. Allerdings enthielt die für Malat zitierte Quelle keine Angabe über die Ionenstärke, für die die Stabilitätskonstante gilt. Somit ist die Aussagekraft eingeschränkt.

Das Programm GEOCHEM-PC bietet die Optionen, bei Berechnungen Ausfällungen zuzulassen oder zu untersagen. Bei erlaubter Ausfällung sollen ca. drei Viertel des gemessenen Al im Xylemsaft in fester Form als $\text{Al}(\text{OH})_3$ ausfallen. Das ist aus folgenden zwei Gründen sehr unwahrscheinlich: 1. wurde der Xylemsaft vor der Al-Bestimmung am ICP filtriert ($0,2 \mu\text{m}$ Porengröße), um partikuläre Ausfällungen zu entfernen und 2. wurden beträchtliche Mengen Al in die Blüten transportiert, und dies ist vermutlich ausschließlich in gelöster Form möglich. Für eine Diskrepanz zwischen berechneter und realer Al-Spezifikation könnte von Bedeutung sein, daß nicht alle Inhaltsstoffe des Xylemsafts bestimmt wurden. Außerdem berechnet GEOCHEM-PC die Verhältnisse im thermodynamischen Gleichgewicht, also nach unendlich langer Reaktionszeit. Beim Xylemsaft befinden sich die ablaufenden chemischen Reaktionen hingegen im Fließgleichgewicht. Die Option, die Ausfällungen untersagt, entspricht folglich eher den realen Bedingungen und wurde deshalb im vorliegenden Versuch bei allen Berechnungen mit GEOCHEM-PC gewählt.

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für anorganische Chemie der Universität Hannover wurde die Speziierung von Al in ausgewählten Xylemsäften aus diesem Versuch von Busch (2001) kat- und anionenchromatographisch näher untersucht. Obwohl bisher nur Einzelproben ohne repräsentative Wiederholungen gemessen wurden, sind aufgrund der vorliegenden Ergebnisse doch bereits einige allgemeine Aussagen möglich. Wie die ionenchromatographischen Untersuchungen zeigten, lagen die geringen Konzentrationen an freiem Al^{3+} in Xylemsäften von Al-behandelten Pflanzen in der Nähe der Nachweisgrenze, die aufgrund der komplexen Chemie von Al nicht bestimmbar ist. Mit höchstens 10 % an der gesamten Al-Konzentration im Xylemsaft kam den positiv geladenen und neutralen Al-Ligand-Systemen eine geringe Bedeutung zu. Der Hauptanteil lag mit durchschnittlich mehr als 50 % als Al-Ligand-System mit einer Ladung zwischen 0 und -1 vor. Höher negativ geladene Spezies spielten mit weniger als 5 % eine untergeordnete Rolle. Al-Citrat- oder Oxalatspezies mit

glatter positiver oder negativer Ladungszahl waren nicht nachweisbar. Folglich werden andere Ein-Ligand-Komplexe, zum Beispiel Al-Malat- oder -Malonat-Komplexe, ausgebildet, oder durch Komplexierung von Al^{3+} mit unterschiedlichen organischen Säuren entstehen Mehr-Ligand-Systeme. Außerdem wäre eine Bildung von Al-Komplexen mit zwei Al-Zentralionen und formaler Ladung zwischen 0 und 1 oder 1 und 2 durch intermolekulare Dimerisierung denkbar. Nur für die circa 10 % des gesamten Al, die als neutrales Al-Ligand-System vorliegen, ist ein 1:1 Al-Citrat-Komplex denkbar. Obwohl aufgrund des äquimolaren Verhältnisses von Al zu Citrat im Xylemsaft die Ausbildung eines 1:1 Komplexes wahrscheinlich erscheint, lassen die Ergebnisse der chromatographischen Al-Speziierung vermuten, daß die tatsächlichen Verhältnisse für die restlichen 90 % Al komplizierter sind.

Untersuchungen zum Einfluß von Al auf die Wasseraufnahme (Stienen, 1986) und Transpiration (Grimme und Lindhauer, 1989; Schlegel *et al.*, 1991) von Pflanzen lieferten Hinweise für eine Al-bedingte Verminderung. Daraus resultierende Veränderungen der Xylemsaftflußrate sollten den radialen Transport von Al und Wasser in die Xylemgefäße in unterschiedlicher Weise beeinflussen (Steudle und Peterson, 1998) und folglich die Al-Konzentration im Xylemsaft verändern. Als Maß für die Flußrate wurde deshalb die Xylemsaftexsudationsrate in Abhängigkeit von Al-Behandlung und Sorte bestimmt, wobei es sich hier aufgrund des Abschneidens des Sprosses und der Unterbrechung des Transpirationssoges nur um eine Annäherung handelt. Im vorliegenden Versuch hatte die Al-Behandlung keinen signifikanten Einfluß auf die exsudierte Xylemsaftmenge (nicht dargestellt). Auch zwischen den Sorten bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der exsudierten Xylemsaftmenge (nicht dargestellt). Aufgrund der geringen Stichprobenanzahl und der relativ hohen Standardabweichung ist dieses Ergebnis jedoch mit Vorsicht zu behandeln. Konzentrationen und Exsudationsraten verschiedener Elemente und organischer Säuren waren relativ eng miteinander korreliert (Al: $r^2 = 0,69^{***}$, Citrat: $r^2 = 0,77^{***}$). Deshalb wurde auf die Darstellung von Exsudationsraten im Ergebnisteil verzichtet. Noch enger wäre diese Korrelation sicherlich, wenn die von Einzelpflanzen exsudierten Xylemsaftmengen nicht relativ unterschiedlich wären. Dies führte dazu, daß die relative Standardabweichung der verschiedenen Versuchsvarianten für die Exsudationsraten höher war als für die Konzentrationen.

Zwischen der exsudierten Xylemsaftmenge und dem Sproßfrischgewicht bestand eine über die drei Sorten hinweg signifikante, positive Beziehung (nicht dargestellt). Das Wurzel-Sproß-Verhältnis einer Pflanzenart ist in der Regel konstant, kann jedoch durch externe Faktoren beeinflusst werden (Klepper, 1991). Die Ursache für die Zunahme der Xylemsaftexsudation ist in einer Vergrößerung der für die Wasseraufnahme verfügbaren Wurzeloberfläche zu suchen. Da das Al-Angebot hier keinen Einfluß auf die Menge an Xylemexsudat hatte, scheint den Unterschieden des Frischgewichts der Einzelpflanzen eine größere Bedeutung für die exsudierte Menge zuzukommen als dem Einfluß von Al auf das Frischgewicht. Für zukünftige Untersuchungen heißt das, daß der Faktor Pflanzengröße genau kontrolliert werden muß.

Sortenunterschiede

Als Ursache für Sortenunterschiede in der Blaufärbbarkeit kommt eine sortenspezifische Beeinflussung des Substrat-pH-Werts in Betracht. Dadurch könnte bei gleicher Al-Sulfatbehandlung eine unterschiedliche Absenkung des Substrat-pH-Werts erfolgen und somit die Pflanzenverfügbarkeit von Al beeinflusst werden. Sorten könnten sich jedoch auch bei gleichem Substrat-pH-Wert in ihrer Al-Aufnahme oder -Verlagerung unterscheiden oder sogar bei gleichem Al-Gehalt in den Sepalen eine unterschiedliche Blaufärbung aufweisen. In der vorliegenden Arbeit waren die Sortenunterschiede in der Blaufärbung bei hohem Al-Angebot und niedrigem Substrat-pH-Wert weniger ausgeprägt als bei niedrigem Al-Angebot und hohem pH-Wert (Abb. 3.2). Faktoren, die die Aufnahme von Al durch die Wurzel beeinflussen, scheinen also eine größere Rolle für diese Sortenunterschiede zu spielen als die Fähigkeit zur Verlagerung in der Pflanze. Eine sortenspezifische Beeinflussung des Substrat-pH-Werts könnte zum Beispiel auf unterschiedlichen Verhältnissen der Kationen-/Anionenaufnahme und auf unterschiedlicher Exsudation organischer Säureanionen (vergl. Kap. 4.5) beruhen. Tatsächlich unterschieden sich die pH-Werte der Sorten bei niedrigem Al-Angebot von 3 g Al-Sulfat maximal um 1,1 pH-Wert-Einheiten, bei dem höchsten Al-Angebot von 12 g Al-Sulfat um 0,6 pH-Wert-Einheiten (Abb. 3.1). Im allgemeinen entsprachen die über- bzw. unterdurchschnittlichen Al-Gehalte in den Sepalen der Sorten nach gleicher Al-Behandlung ihren unter- bzw. überdurchschnittlichen Substrat-pH-Werten (Abb. 3.6, Abb. 3.1). Die Sorte 'Adria' zeichnete sich z. B. durch niedrigen Substrat-pH-Wert und hohe Al-Gehalte aus. 'LK 15' und 'Renate Steiniger' wiesen mittlere Substrat-pH-Werte und Al-Gehalte auf. Der überdurchschnittliche Substrat-pH-Wert der schlecht

blauzufärbenden Sorte 'Blauer Ball' spiegelte sich in ihrem unterdurchschnittlichen Al-Gehalt wider. Bei einem bestimmten Substrat-pH-Wert erreichten die sehr leicht blau zu färbenden Sorten 'LK 15' sowie 'Renate Steiniger' und die schwer blauzufärbende Sorte 'Blauer Ball' jedoch ähnliche Al-Gehalte in den Sepalen (Abb. 3.7). Die schlechtere Al-Verlagerung in die Sepalen von 'Blauer Ball' scheint also vorwiegend auf die geringere Absenkung des Substrat-pH-Werts bei gleichem Al-Angebot zurückzuführen zu sein. Möglicherweise spielt auch die geringere Malonatkonzentration und Komplexierung von Malonat mit Al im Xylemsaft eine Rolle für die schlechtere Al-Verlagerung der Sorte 'Blauer Ball' im Vergleich zu 'Renate Steiniger' und 'Adria' (Abb. 3.11). Wie die folgenden Beispiele zeigen, wird der unterschiedliche Al-Gehalt in den Sepalen von Hortensiensorten nicht ausschließlich durch Substrat-pH-Wert bzw. Al-Verfügbarkeit bestimmt. Trotz ihrer relativ hohen Substrat-pH-Werte waren die Al-Gehalte in den Sepalen der Tellerhortensiensorten 'Blaumeise' und 'Bläuling' nach denen von 'Adria' am höchsten. Möglicherweise erfolgte hier aufgrund der geringeren Anzahl von Sepalen eine stärkere Al-Akkumulation als bei den meisten Ballsorten. Bei definiertem Substrat-pH-Wert erreichten die Sorten 'Adria', 'Blaumeise' und 'Bläuling' höhere Al-Gehalte in den Sepalen als 'LK 15', 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' (Abb. 3.7). 'Elbtal' hingegen wies trotz des niedrigen Substrat-pH-Werts weit unterdurchschnittliche Al-Gehalte auf. Anders als bei 'Blauer Ball' waren die geringen Al-Gehalte in den Sepalen von 'Elbtal' also nicht auf erhöhte pH-Werte zurückzuführen. Als Ursache kommt vielmehr das überdurchschnittliche Frischgewicht von 'Elbtal' in Betracht, das bei derselben aufgenommenen Al-Menge einen niedrigeren Al-Gehalt zur Folge hätte als bei einer Sorte mit geringerem Frischgewicht.

Interessanterweise nahm die Blaufärbung der Sorten bei der höchsten Al-Behandlung in derselben Reihenfolge ab wie das Frischgewicht. Dies scheint darauf hinzudeuten, daß sich eine gewisse Resistenz gegenüber Al positiv auf die Blaufärbung auswirkt. Von diesem Trend wichen nur 'Blauer Zwerg' und vor allem 'Elbtal' ab. Das Frischgewicht von 'Elbtal' war nach der höchsten Al-Behandlung identisch mit dem der Kontrolle. Dies deutet auf eine sehr hohe Al-Resistenz von 'Elbtal' hin. Trotzdem lag 'Elbtal' bei der Bonitur der Blaufärbung nur auf dem vorletzten Rang. Möglicherweise ist eine gewisse Schädigung der Wurzeln eine Voraussetzung für die Aufnahme von Al durch die Wurzel. Wie bereits zuvor diskutiert, könnte allerdings auch allein das hohe Frischgewicht bei gleicher Al-Aufnahme zu geringeren Al-Gehalten in den Sepalen und damit zu schlechterer Blaufärbung führen.

Die Blaufärbung aller Sorten - sowohl einzeln als auch gemittelt - war eng positiv mit dem Al-Gehalt in den Sepalen korreliert (Abb. 3.8). Obwohl sich die Sorten 'LK 15' und 'Renate Steiniger' wesentlich leichter blau färben lassen als 'Blauer Ball', wiesen sie bei gleichem Al-Gehalt in den Sepalen nicht nur, wie bereits erwähnt, ähnliche Al-Gehalte in den Sepalen auf, sondern überdies eine ähnliche Blaufärbung. Bei anderen Sorten unterschied sich die Blaufärbung jedoch auch bei gleichem Al-Gehalt in den Sepalen um bis zu 2 Boniturnoten. Die sehr leicht zu bläuenden Sorten 'LK 15' und 'Renate Steiniger' wiesen bei definiertem Al-Gehalt eine überdurchschnittliche Blaufärbung auf. Diese Tatsache trug entscheidend dazu bei, daß sie eine überdurchschnittliche Blaufärbung erreichten, obwohl sie bei allen drei Al-Angeboten nur mittlere Al-Gehalte aufwiesen. Die Sorte 'Adria' hingegen lag trotz ihrer überdurchschnittlich hohen Al-Gehalte in den Sepalen (Abb. 3.6) bei der Blaufärbung nur im Mittelfeld (Abb. 3.2), weil sie bei definiertem Al-Gehalt der Sepalen nur eine unterdurchschnittliche Blaufärbung erreichte (Abb. 3.8). Da der P-Gehalt in den Sepalen bei 'Adria' deutlich erhöht war (nicht dargestellt), konkurriert hier möglicherweise Phosphat mit Delphinidin um die Bindung von Al. Der relativ hohe, für eine gute Blaufärbung benötigte Al-Gehalt von 'Adria' könnte für die Schwierigkeiten dieser Sorte bei der Blaufärbung verantwortlich sein. Für die sortenspezifische Modifizierung der Blaufärbung bei gleichem Al-Gehalt der Sepalen könnte ferner der Al-Bindungsform und -Kompartimentierung, dem Gehalt an Delphinidin, weiteren durch Al nicht veränderbaren roten Farbstoffen und den Al-Delphinidin-Komplex stabilisierenden Komponenten, z. B. 3-Caffeoylchinasäure (Takeda *et al.*, 1985; 1990), eine Bedeutung zukommen.

4.2 Einfluß von Al auf Wurzelmorphologie und Al-Lokalisation in der Wurzel

Bei Al-Exkluderpflanzen konnte ein Einfluß von Al auf die Wurzelmorphologie und Ultrastruktur der Wurzelzellen in zahlreichen Untersuchungen belegt werden (Wagatsuma *et al.*, 1987; Bennet *et al.*, 1985; Marienfeld, 1992; Budíková, 1999). Deshalb erschien die Frage interessant, ob die Hortensie als Al-Akkumulator trotz ihrer Al-Resistenz nach Al-Behandlung ähnliche Symptome aufweist. Die höheren Al-Gehalte von Al-Akkumulatoren im Vergleich zu Al-Exkludern stellen - in Anbetracht der geringen Sensitivität der verfügbaren Meßmethoden für Al - einen entscheidenden Vorteil für die Al-Lokalisation dar. Obwohl die in diesem Versuch verwendete Konzentration von

500 μM AlCl_3 nach einer Woche nur eine 35%ige Hemmung des Wurzelwachstums bewirkte (Abb. 3.31) und nach 2wöchigem Angebot zu gesund wirkenden Pflanzen mit sortenbedingt mehr oder weniger blauen Blüten führte (Kap. 3.6), waren nach der Al-Behandlung deutliche Veränderungen der Wurzelmorphologie zu beobachten (Kap. 3.2; Naumann *et al.*, 2001). Sie wurden ausschließlich in der Wurzelspitze beobachtet. In mehr als 1 cm Entfernung von der Wurzelspitze waren keine Al-bedingten Veränderungen erkennbar. Der Hauptgrund hierfür ist wahrscheinlich, daß das Wachstum des älteren Wurzelabschnitts in Abwesenheit von Al erfolgte und der erste Kontakt mit Al erst nach weitgehend abgeschlossener Differenzierung der Zellen stattfand. Während der 3tägigen Al-Behandlung wurde ein apikaler Wurzelzuwachs von ca. 3 mm Länge beobachtet. Eine besondere Bedeutung der Wurzelspitze für Al-Toxizität und -Resistenz konnte bei Mais bereits nachgewiesen werden (Ryan *et al.*, 1993; Sivaguru und Horst, 1998; Horst *et al.*, 1999; Kollmeier *et al.*, 2000). Bei einer mit der Wurzelbildung beginnenden Al-Behandlung wären allerdings auch morphologische Veränderungen an älteren Wurzelabschnitten vorstellbar. Für zukünftige Versuche zur Kinetik der Al-Aufnahme dürfte die Beobachtung, daß scheinbar gleichartige „Hauptwurzeln“ zwei, drei oder vier Xylem- und Phloemstränge aufwiesen, von entscheidender Bedeutung sein. Vermutlich handelt es sich trotz des gleichartigen Erscheinungsbildes der Stecklingswurzeln um Haupt- und Seitenwurzeln, deren Transportraten in der Wurzel sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Morphologie unterscheiden. Die Xylemstränge sind aufgrund ihrer Fluoreszenz bei UV-Beleuchtung mikroskopisch in intakten Wurzeln erkennbar (nicht dargestellt).

Mögliche Entstehungsursachen der beobachteten Al-bedingten Veränderungen der Wurzelmorphologie und Auswirkungen auf Al-Aufnahme und -Toleranz sollen im folgenden diskutiert werden.

Nach der dreitägigen Al-Behandlung wurde eine erhebliche Vergrößerung der Zellen im Randbereich der Wurzelspitzen beobachtet. Die Zellvergrößerung könnte auf eine Hemmung der mitotischen Teilungsaktivität zurückzuführen sein (Clarkson *et al.*, 1966; Horst *et al.*, 1983). Sie war jedoch nicht mit einer deutlichen Zunahme des Durchmessers der Wurzelspitzen verbunden. Auch eine Zunahme der Anzahl an Zellagen nach Al-Behandlung, wie sie von Marienfeld *et al.* (1995) bei *Avena sativa* nachgewiesen wurde, war bei Hortensienwurzeln nicht festzustellen. Allerdings war nach Al-Behandlung eine stärkere Abrundung der Wurzelspitze durch die Vergrößerung der

Randzellen und die näher an der Wurzelspitze beginnende Zellstreckung zu beobachten. In Substrat könnte diese Form der Wurzelspitze das Eindringen erschweren. Der Effekt der Hemmung des Wurzelwachstums könnte hierdurch im Vergleich zum Wachstum in Nährlösung noch verstärkt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete verstärkte Bildung von Vesikeln und Vakuolen nach Al-Angebot wurde gleichermaßen auch von Bennet *et al.* (1985), Ikeda und Tadano (1993), Marienfeld *et al.* (1995) und Budíková (1999) beobachtet. Möglicherweise haben die Hemmung der Zellteilung und die starke Vesikel- und Vakuolenbildung dieser Zellen dieselbe Ursache: Beeinflussung des Vesikeltransports vom Golgiapparat zur Plasmamembran bzw. zur Zellplatte. Es ist davon auszugehen, daß die Richtung des Vesikeltransports durch das Cytoskelett bestimmt wird, bei Pflanzen vor allem durch Mikrofilamente (Taylor und Hepler, 1997; Franklin-Tong, 1999). Eine Desorganisation der Struktur des Cytoskeletts nach Al-Behandlung konnte mehrfach nachgewiesen werden (Grabski und Schindler, 1995; Baluška *et al.*, 1997; Blancaflor *et al.*, 1998; Sivaguru *et al.*, 1999; Frantziou *et al.*, 2001). Eine Störung des zielgerichteten Transports von Vesikeln zu Plasmamembran und Zellplatte würde die Chance des Kontakts mit den entsprechenden Membranen herabsetzen. Ohne Kontakt kann jedoch keine Fusion der Vesikel erfolgen, so daß daraus eine Anreicherung von Vesikeln resultieren und die Ausbildung der Zellplatte verzögert oder gestört würde. Sivaguru *et al.* (1999) und Vázquez *et al.* (1999) beobachteten tatsächlich unregelmäßige Zellteilungen nach Al-Behandlung.

Al könnte neben der Transportrichtung jedoch auch direkt die Ca-regulierte Exocytose von Vesikeln (Zorec und Tester, 1992; 1993; Thiel *et al.*, 1994; Carroll *et al.*, 1998) durch eine Störung der Ca-Homöostase beeinflussen. Eine Störung der Exocytose würde eine Akkumulation von Vesikeln nach sich ziehen, deren Verschmelzung die Bildung der beobachteten Vakuolen erklären könnte. Calciumionen spielen vermutlich nicht nur bei der Regulierung der Exocytose eine bedeutende Rolle, sondern auch bei der Kontrolle des Gleichgewichts zwischen Exo- und Endocytose (Steer, 1988; Battey und Blackbourn, 1993). Insbesondere die Verschmelzung der Vesikel mit anderen Membranen scheint durch Ca und somit möglicherweise auch durch Al beeinflusst zu werden. Wie Colombo *et al.* (1994) nachwies, wurde die Fusion von Endosomen mit einem intrazellulären proteolytischen Kompartiment durch Al-Fluorid gehemmt. Da Al die Lipidzusammensetzung von Membranen (Lindberg und Griffiths, 1993; Zhang

et al., 1997) und auch die Membranfluidität (Zel *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2000) verändert, ist ein Einfluß auf Auf- und Abbau von Membranen (engl.: membrane turnover) denkbar. Eine durch Al verminderte Membranfluidität könnte durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zu Lasten des Membranabbaus eine Anreicherung von Vesikeln nach sich ziehen. Außerdem können die Al-bedingte Veränderung der Lipidzusammensetzung und der Membranfluidität den Kreislauf des Transports von Vesikeln vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu den Dictyosomen, der Plasmamembran und den Vakuolen (Membranfluß, engl.: membrane cycling) beeinflussen. Hinweise für die große Bedeutung des Membranflusses entdeckten Carroll *et al.* (1998) an sekretorischen Mais-Wurzelhaubenzellen. Die von Bennet *et al.* (1985) und Puthota *et al.* (1991) beobachtete starke Verminderung des Volumens an Dictyosomen und ER nach Al-Behandlung unterstützen die Hypothese, daß Al den Membranfluß beeinflusst.

Als Ursache für die Al-bedingte stärkere Vakuolisierung könnte auch die Hemmung von Zellteilung und Zellstreckung durch die Al-Behandlung eine Rolle spielen. Dadurch sind Zellen in gleicher Entfernung von der Wurzelspitze älter als in Kontrollwurzeln. Ihr Differenzierungsgrad sollte dementsprechend weiter fortgeschritten sein. Da jedoch Ikeda und Tadano (1993) bereits nach einstündiger Al-Behandlung eine Akkumulation von Vesikeln in Gerstenwurzeln beobachteten, erscheint ein direkter Einfluß von Al auf die Vesikelbildung wahrscheinlicher.

Die granulären Ablagerungen in den Vakuolen, in denen nur nach Al-Behandlung mittels EELS und ESI Al nachgewiesen werden konnte, könnten sichtbarer Ausdruck eines Detoxifizierungsmechanismus für Al in der Vakuole sein. Im folgenden sollen die Möglichkeiten der Art dieses Detoxifizierungsmechanismus diskutiert werden. Auch McQuattie und Schier (1990) beobachteten nach Al-Behandlung von *Picea rubens*-Wurzeln granuläre Ablagerungen in der Vakuole, die sich mit Toluidinblau schwarz färbten. Aufgrund ihrer Lokalisierung und ihres Auftretens unter ähnlichen Präparationsbedingungen hielten McQuattie und Schier eine phenolische Natur dieser Ablagerungen für wahrscheinlich, wobei sie auf die Arbeiten von Chafe und Durzan (1973) und Johnson-Flanagan und Owens (1985) verwiesen. Insbesondere kondensierte Tannine (Catechine) weisen eine starke Osmiophilie auf (Lees *et al.*, 1993; 1995) und können Al komplexieren, wie Nagata *et al.* (1991; 1992; 1993) bei Tee (*Camellia sinensis*) zeigen konnten. Dagegen wiesen Vázquez *et al.* (1999) in ähnlichen Al-

reichen vakuolären Ablagerungen in Maiswurzelspitzen zusätzlich P, Ca, Zn und Mg nach und stellten eine ähnliche Mineralzusammensetzung fest, wie sie für Phytin nachgewiesen wurde (Mikus *et al.*, 1992). Auch die vorliegenden Untersuchungen zeigten eine Kollokalisierung von Al, P und S in den vakuolären Ablagerungen und deuten somit eher auf eine Detoxifikation von Al in Form von Phytin, anderen Polyphosphaten oder eines Gemisches von Al-Phosphat und -Sulfat hin als auf eine phenolische Natur der Ablagerungen. Übereinstimmend wurden Al-Polyphosphate in den Vakuolen von Mykorrhiza (Martin *et al.*, 1994; Turnau *et al.*, 1993) und erhöhte vakuoläre Phosphorkonzentrationen nach 2tägiger Al-Behandlung in Buchenwurzeln beobachtet (Jensen *et al.*, 1989). Denkbar wäre ferner eine Detoxifizierung von Al durch vakuoläre Proteine. Bisherige Untersuchungen beschäftigten sich jedoch nach meiner Kenntnis nicht mit der Möglichkeit der Detoxifizierung von Al durch Polypeptide in der Vakuole, sondern vor allem in Apoplast (Basu *et al.*, 1997; Tamas *et al.*, 1997) und Cytoplasma (Aniol, 1984; Mistrik *et al.*, 1997). Untersuchungen zur Verteilung von Al bei dem Al-Akkumulator *Melastoma malabathricum* sprachen nicht für eine Bindung von Al an Proteine (Watanabe *et al.*, 1998). Wenn der Inhalt der Vesikel, wie von Puthota *et al.* (1991) vermutet, aus polysaccharidischem Mucigel- oder Zellwandmaterial besteht, könnten auch diese Polysaccharide eine Al-detoxifizierende Funktion ausüben.

Bei der Akkumulation von Al in den vakuolären Ablagerungen handelt es sich um keinen Austausch von Ca durch Al, weil in diesen Strukturen in Kontrollwurzeln kein Ca nachgewiesen werden konnte. Es ist fraglich, ob die Entstehung dieser Al-haltigen Strukturen bereits im vitalen Zustand erfolgte oder ob sie erst im Verlauf der Präparation, z. B. während der Entwässerung bei der Einbettung, stattfand. Da Al-Ionen aufgrund der großen positiven Ladungsdichte jedoch relativ fest an negative Bindungsplätze in der Zellwand gebunden sind (Grauer und Horst, 1992; Horst, 1995; Blamey 1990; 1992), erscheint eine Umverteilung und Verdrängung von Al aus dem Apoplasten in die Vakuolen während der Einbettung relativ unwahrscheinlich. Falls die nach der Einbettung beobachtete Akkumulation von Al in den vakuolären Strukturen tatsächlich die *in situ* Al-Verteilung widerspiegelt, würde das den Transport großer Al-Mengen in die Vakuole voraussetzen. Das heißt, Al müsste das Cytoplasma durchqueren. Ohne negative Auswirkungen auf den Stoffwechsel im Cytoplasma ist dies wahrscheinlich nur in detoxifizierter Form möglich, z. B. komplexiert mit organischen Säuren oder Phosphat. Denkbar wäre auch ein direkter endocytotischer Transport von Al vom

Apoplast in die Vakuole ohne Durchquerung des Cytoplasmas. Berechnungen von Akeson und Munns (1990) ergaben, daß an der Plasmamembranoberfläche gebundenes und durch Endocytose aufgenommenes Al wesentlich an der Al-Aufnahme in die Zelle beteiligt sein könnte.

Die beobachteten Al-bedingten morphologischen Veränderungen der Wurzelspitze beeinflussen sicherlich die Al-Aufnahme. Die Al-bedingte Hemmung des Wurzelwachstums führt im Vergleich zu Kontrollpflanzen zu einer Reduktion der Wurzeloberfläche, die zur Al-Aufnahme zur Verfügung steht. Der Al-Transport könnte sowohl auf symplastischem Weg als auch teilweise, zumindest streckenweise, auf apoplastischem Weg durch sogenannten „bypass-flow“ in Richtung Zentralzylinder erfolgen (Marschner, 1995 und Referenzen darin). Daß in Zellwänden kein Al nachgewiesen werden konnte, heißt nicht, daß kein apoplastischer Transport stattfindet, sondern daß die Al-Konzentration im Apoplasten unter der Nachweisgrenze lag. Durch die Vergrößerung der Rhizodermis- und äußeren Cortexzellen wird das Verhältnis von Apoplast zu Symplast zu Lasten des Apoplasts verschoben. Damit könnte eine Verminderung des apoplastischen Al-Transports verbunden sein. Falls es sich bei den beobachteten vakuolären Al-haltigen Ablagerungen um einen Detoxifikationsmechanismus für Al handelt, eröffnen sich zwei Möglichkeiten. 1. Die Verlagerung von Al in die Vakuolen von Wurzelzellen ist endgültig, das vakuoläre Al steht für den Weitertransport in den Sproß und die Blüte nicht mehr zur Verfügung. 2. Al wird nur vorübergehend in den Vakuolen zwischengelagert und dann weitertransportiert.

Die Al-bedingte Hemmung des Wurzelwachstums und die in geringerer Entfernung von der Wurzelspitze einsetzende Zellstreckung sind vermutlich verbunden mit einem höheren Zellalter und größerem Zelldifferenzierungsgrad in gleicher Entfernung von der Wurzelspitze. Mit einer zunehmenden Differenzierung nahm bei Mais der Gehalt an Lignin und Suberin in Rhizo-, Hypo- und Endodermis zu (Zeier *et al.*, 1999). Durch eine Inkrustierung der Wände von Exo- und Endodermiszellen mit Lignin und Suberin wird der apoplastische Transport von Ionen eingeschränkt (Läuchli, 1976; Clarkson, 1996, Peterson und Cholewa, 1998; Gierth, 2000). Entsprechend könnte auch bei Al-behandelten Hortensienwurzeln der apoplastische Transport durch Inkrustierung der Zellwände von Rhizo-, Hypo-, Exo- und Endodermis mit Lignin oder Suberin bereits näher an der Wurzelspitze eingeschränkt werden und so ein kürzerer Bereich hinter der Wurzelspitze für ungehinderten apoplastischen Transport in den Zentralzylinder zur

Verfügung stehen als bei Kontrollpflanzen. Neben dieser indirekten Induktion der Ligninbildung über eine Beeinflussung des Differenzierungsgrads der Zellen wäre auch ein direkter Effekt von Al denkbar. Eine Al-induzierte Lignifizierung von Zellwänden beobachteten zum Beispiel Sasaki *et al.* (1996; 1997) in den äußeren Zellschichten des Cortex bei Weizen und Budíková (1999) in rhizodermalen, hypodermalen und corticalen Zellwänden in der Nähe von Al-bedingten Gewebzusammenbrüchen bei Mais. Snowden und Gardener (1993) fanden ein Al-induziertes Gen (*wali4*) für Phenylalanin-Ammonium-Lyase, ein Schlüsselenzym der Ligninsynthese. Die Transkription dieses Gens wurde auch durch Verletzungen erhöht (Snowden *et al.*, 1995) und spricht für einen engen Zusammenhang zwischen Al-induzierter und als „Wundreaktion“ induzierter Ligninbildung. Damit wäre die Ligninbildung Ausdruck von Al-Toxizität und könnte gleichzeitig durch eine Verminderung der Al-Aufnahme die Al-Resistenz erhöhen. Für die Züchtung leicht blau zu färbender Hortensiensorten wären solche Al-Resistenzmechanismen, die auf Al-Exklusion beruhen, jedoch negativ zu bewerten.

Eine weitere Erhöhung der Al-Konzentration sollte die morphologischen Veränderungen verstärken und letztlich die Wurzel und insbesondere die Membranen so stark schädigen, daß eine Kontrolle der Al-Aufnahme unmöglich wird (vergl. Wagatsuma *et al.*, 1997). Diese Hypothese zieht die Schlußfolgerung nach sich, daß die in Substrat bei sehr hohem Al-Angebot beobachtete unbefriedigende Blaufärbung (Horst *et al.*, 1993; Weithmann, persönliche Mitteilung) nicht auf geringere Al-Gehalte der Wurzel, sondern eher auf eine Verminderung der Al-Verlagerung von der Wurzel in den Sproß und die Sepalen zurückzuführen ist. Die Al-bedingte Hemmung des Wurzelwachstums und die folglich kleinere für die Al-Aufnahme verfügbare Wurzeloberfläche sollte entscheidend zur geringeren Al-Verlagerung in den Sproß beitragen.

4.3 Einfluß der Al-Form auf Al-Aufnahme, -Verlagerung und -Toxizität

Al-Speziesverteilung in der Nährlösung

In vielen Versuchen konnte eine Verminderung der Toxizität von Al durch die Komplexierung mit organischen Säuren nachgewiesen werden (Review: Ma, 2000). Der Einfluß auf die Al-Aufnahme wurde bisher jedoch wenig untersucht. In mehreren Untersuchungen bei Mensch und Tier wurden bei gleichzeitiger Ernährung mit Al und Citrat oder auch allein Citrat erhöhte Al-Gehalte in verschiedenen Geweben nachge-

wiesen (Martin, 1988 und Referenzen darin). Im Pflanzenreich hingegen wurde bei Angebot von Al im Komplex mit organischen Säuren in der Regel eine verminderte Al-Aufnahme festgestellt, z. B. von Bartlett und Riego (1972) bei Mais und von Vitorello und Haug (1996) bei Tabakzellen. Konträr hierzu beobachteten Muchovej *et al.* (1988) eine erhöhte Al-Aufnahme bei Al-Angebot in komplexierter Form. Allerdings könnte dieser Effekt bei dem hohen Nährlösungs-pH-Wert von 6,0 auf einer Erhöhung der Löslichkeit von Al und somit der Pflanzenverfügbarkeit in der Nährlösung durch die organischen Komplexoren beruhen. Auch Taylor *et al.* (2000) wiesen nach Komplexierung von Al mit Citrat einen erhöhten Transport von Al durch die Plasmamembran in den Protoplasten an einzelnen Zellen von *Chara corallina* nach. Welchen Einfluß die Al-Form auf Al-Toxizität, -Aufnahme und -Verlagerung bei dem Al-Akkumulator Hortensie hat, soll im folgenden diskutiert werden.

Da die Chemie von Al in wäßrigen Lösungen sehr kompliziert ist, sollten zunächst die Al-Formen der vier Nährlösungsvarianten mittels chemischer Spezifikationsbestimmungen und theoretischer Berechnungen näher charakterisiert werden (3.3.1). Durch eine höhere Malatkonzentration (750 μM) in der Nährlösung im Vergleich zu Citrat (500 μM) sollte die geringere Stabilität des Komplexes zwischen Al und Malat im Vergleich zu Citrat zumindest partiell ausgeglichen werden. Auch die Malat-Variante mit dem erhöhten pH-Wert von 6,0 wurde gewählt, um zu überprüfen, ob sich hierdurch der Anteil an mit Malat komplexiertem Al erhöhen läßt. Denkbar wäre dies, weil das Gleichgewicht bei höherem pH-Wert von der Carbonsäure in Richtung des negativ geladenen Carboxylations verschoben wird, das möglicherweise positiv geladenes Al stärker komplexieren kann. Eine Erhöhung des Anteils an Al-Malat würde voraussetzen, daß die Stabilitätskonstante des Al-Malatkomplexes bei dem pH-Wert von 6,0 die von $\text{Al}(\text{OH})_3$ übertrifft, da $\text{Al}(\text{OH})_3$ sonst bei diesem pH-Wert ausfallen würde (Lydersen *et al.*, 1991). Nach Kwong und Huang (1979) sind organische Säuren in der Lage, die Löslichkeit von Al-Hydroxiden heraufzusetzen, und könnten somit die Al-Ausfällung vermindern.

Zur Überprüfung, in welchem Umfang in den Nährlösungsvarianten eine Ausfällung von Al auftrat, wurden die Proben vor der Messung von Al mittels ICP durch Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 μm filtriert. Nur in der Malat-Variante bei einem pH-Wert von 6,0 konnte mit dieser Methode eine Ausfällung von Al nachgewiesen werden (Abb. 3.21). Damit reduzierte sich die Konzentration an gelöstem und somit

phytotoxischem Al im Vergleich zu den Varianten bei niedrigem pH-Wert (4,3) von 500 μM auf 200 μM . Durch Malat konnte die Ausfällung von Al-Hydroxiden bei dem hohen pH-Wert von 6,0 also nur partiell verhindert werden. Der Anteil an ausgefallenem Al könnte bei der angewandten Methode eher unter- als überschätzt werden, da durch die Filtration bei einer Porengröße von 0,2 μm sehr feine Al-Hydroxid-Mikropartikel möglicherweise nicht vollständig entfernt werden (Menzies *et al.*, 1991).

Im Gegensatz zu den Messungen sollte Al nach Berechnungen mittels GEOCHEM-PC in der Al-Chlorid-Variante zu 89 % in fester Form als Al-Hydroxid ausfallen. Dies erscheint in Anbetracht der mittels ICP bestimmten Al-Konzentration und der Tatsache, daß von Pflanzen aller Varianten bei niedrigem pH-Wert ähnliche Al-Mengen aufgenommen wurden, sehr unwahrscheinlich. Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen Messung und Berechnung könnte darin zu sehen sein, daß GEOCHEM den Gleichgewichtszustand nach unendlich langer Zeit berechnet, dieser jedoch während der kurzen Versuchsdauer nicht erreicht wird. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese haben Kinraide und Parker (1989) gezeigt, daß Al in Lösungen für viele Tage mononuklear bleibt, sofern der Quotient der Aktivitäten $\{\text{Al}^{3+}\}/\{\text{H}^+\}$ kleiner als $10^{8,8}$ bleibt, was für diesen Versuch zutrifft. Auch in der Malat-Variante (pH 6,0) übertrifft die berechnete Ausfällung von Al mit 98 % wahrscheinlich die tatsächliche Ausfällung deutlich. Diese Behauptung läßt sich aus der mittels ICP bestimmten Al-Konzentration der Nährlösung und der Al-Aufnahme der Pflanzen ableiten. Für die Malat- und Citrat-Varianten bei niedrigem pH-Wert wurden übereinstimmend mit den Messungen keine Al-Ausfällungen berechnet.

Entsprechend den höheren Stabilitätskonstanten für Al-Citrat-Komplexe im Vergleich zu Al-Malat-Komplexen (Hue *et al.*, 1986; Parker *et al.*, 1995 und Referenzen darin) lagen in der Citrat-Variante 90 %, in der Malat-Variante (pH 4,3) hingegen nur 50 % des Al in komplexierter Form vor. Da der Anteil an komplexiertem Al die Differenz aus dem mit dem ICP gemessenen Anteil an gelöstem Al und dem mittels Aluminon bestimmten Anteil an monomerem Al darstellt, spricht dies für die Eignung der Aluminon-Methode (2.3.7) zur Darstellung relativer Unterschiede des Anteils an monomerem Al durch Komplexierung mit organischen Säuren. Hingegen sind die absoluten, mittels der Aluminon-Methode bestimmten Konzentrationen an monomerem Al kritisch zu betrachten, da das Reaktionsgleichgewicht in der Probenlösung durch Vermischung mit der Farbstofflösung verändert werden kann und die Reaktionszeit

zwischen Proben- und Farbstofflösung mit 30 Sekunden willkürlich gewählt wurde (Thoß, persönliche Mitteilung). Die mit GEOCHEM-PC berechneten Anteile an monomerem Al lagen in der Citrat-Variante mit 1 % und vor allem in der Malat-Variante (pH 4,3) mit 2 % deutlich niedriger als die Meßwerte. In der Realität liegen die Anteile an monomerem Al vermutlich zwischen den berechneten und den Meßwerten. Dafür sprechen die Untersuchungen von Delhaize *et al.* (1993) an Weizen, nach denen ein Al-Malat-Angebot im Verhältnis von 1 : 1,5 zu einer etwa 30%prozentigen Erhöhung des Wurzelwachstums der Al-behandelten Variante führte im Vergleich zur Kontrolle (ohne Al und ohne Malat). Der Anteil an komplexiertem Al lag hier also vermutlich mindestens bei 30 %. Die Erhöhung des pH-Werts im vorliegenden Versuch in der Malat-Variante auf 6,0 resultierte nicht wie beabsichtigt in einer höheren Konzentration an Al-Malat, sondern vor allem aufgrund der Ausfällung von Al in einer niedrigeren Konzentration an Al-Malat.

Die Zunahme des Anteils an komplexiertem Al während der 48stündigen Al-Chlorid-Behandlung der Pflanzen (Abb. 3.21) könnte auf der Ausscheidung organischer Säureanionen beruhen (Kap. 3.5). Die leichte Verminderung dieses Anteils in der Al-Malat- (pH 4,3) und -Citrat-Variante hingegen könnte auf einen Abbau organischer Säuren - sowohl der angebotenen als auch zusätzlich exsudierter - durch Mikroorganismen zurückzuführen sein. Das Populationswachstum von Mikroorganismen könnte hier durch die von Anfang an hohe Konzentration organischer Säuren begünstigt sein, während sie auf die Ausscheidung organischer Säureanionen vermutlich negativ wirkt. Die starke Verminderung des Anteils an monomerem Al in der Malat-Variante (pH 6,0) ließe sich durch die Ausscheidung organischer Säureanionen während der Al-Behandlung erklären, die eine höhere Komplexstabilität aufweisen und so zu einer Verschiebung zugunsten des Anteils an komplexiertem Al führen.

Wurzelwachstum, Kallose- und Al-Gehalte der Wurzelspitzen

Als Parameter für die Charakterisierung der Toxizität von Al eignen sich die Hemmung des Wurzelwachstums (Horst *et al.*, 1992; Weithmann *et al.*, 1995) und die Induktion der Kallosesynthese (Wissemeier *et al.*, 1987; 1995; Schreiner *et al.*, 1994) in Wurzelspitzen. Ein Angebot von Al-Malat (pH 4,3) und Al-Citrat führte nicht zu stärkerem Wurzelwachstum im Vergleich zu Al-Chlorid (Abb. 3.22), wie es bei einer Verminderung der Toxizität von Al durch die Komplexbildung mit Malat und Citrat zu erwarten gewesen wäre. Allerdings war auch das Wurzelwachstum der Al-Chlorid-Variante im

Vergleich zum Wachstum ohne Al (in den zwei Tagen vor Beginn der Al-Behandlung) nur geringfügig vermindert. Deshalb ist es unzulässig, aus dem Wurzelwachstum Schlußfolgerungen über die unterschiedliche Toxizität der Al-Formen zu ziehen. Auch im Versuch zum Einfluß von Al auf die Exsudation organischer Säuren führte eine zweitägige Al-Behandlung nicht zu einer wesentlichen Hemmung des Wurzelwachstums (Kap. 3.5), während nach vier- und siebentägiger Al-Behandlung eine 30%ige Hemmung des Wurzelwachstums nachzuweisen war (Kap. 3.4.1). Da Hortensien im Vergleich zu Mais wesentlich langsamer wachsen und deutlich Al-toleranter sind, erfolgt eine Hemmung des Wurzelwachstums bei Hortensien möglicherweise erst mit Verzögerung (Lag-Phase).

Der Kallosegehalt der Wurzelspitzen war hingegen in der Malat-Variante tendenziell und in der Citrat-Variante deutlich niedriger als bei Angebot von Al-Chlorid (Abb. 3.23B). Dies deutet auf eine leichte Verminderung der Al-Toxizität durch Malat und eine stärkere durch Citrat hin. Die verminderte Kalloseinduktion ist verbunden mit geringeren Al-Gehalten in der Wurzelspitze (Abb. 3.23 A, Abb. 3.24), die somit als Ursache für die geringere Kalloseinduktion in Betracht kommen. Die geringeren Al-Gehalte in der Wurzelspitze beruhen nicht auf einer Verdünnung durch stärkeres Wachstum oder stärkerer Verlagerung in den Sproß. Wahrscheinlich sind sie die Folge unterschiedlich starker Bindung der verschiedenen Al-Formen im Apoplast. Übereinstimmend beobachteten Taylor *et al.* (2000) bei Angebot von Al-Citrat eine geringere Al-Akkumulation in Zellwänden von *Chara corallina* als bei Angebot von Al-Chlorid und hielten die veränderte Ladung vom dreifach positiv geladenen Al-Ion im Vergleich zu neutralen und einfach negativ geladenen Al-Citrat-Komplexen (AlCit^0 , AlCit_H^-) für eine wahrscheinliche Ursache. Verantwortlich für die Al-Adsorption im Apoplast sind die negativen Ladungen der Carboxylgruppen des Pektins der Zellwand und der Proteine und Phospholipide der Außenseite der Plasmamembran (Grauer und Horst, 1992; Horst, 1995; Blamey *et al.*, 1990; 1992). Die Adsorption von Al an Ca-Pektat (Blamey *et al.*, 1997) und Phospholipid-Vesikel (Shi und Haug, 1988) war in Anwesenheit von Komplexbildnern wie Citrat und Malat *in vitro* vermindert und könnte folglich die geringeren Al-Gehalte der Wurzelspitzen in den entsprechenden Nährlösungsvarianten erklären. Daß die unterschiedlichen Al-Formen keinen Einfluß auf die Al-Gehalte des gesamten Wurzelsystems hatten, könnte auf die geringeren Pektingehalte älterer Wurzelbereiche im Vergleich zur Wurzelspitze zurückzuführen sein (Schmohl, 2001 und persönliche Mitteilung).

Obwohl die Konzentration an gelöstem Al in der Al-Malat-Variante bei einem pH-Wert von 6,0 im Vergleich zu den drei Varianten bei niedrigem pH-Wert (4,3) um 60 % vermindert war, wiesen die Wurzelspitzen dieser Variante signifikant erhöhte Al-Gehalte und erhöhte Kallosegehalte auf. Erstaunlicherweise war jedoch trotz des erhöhten Al-Gehalts das Wurzelwachstum gegenüber den Varianten bei niedrigem pH-Wert verdoppelt. Die Verbesserung des Wurzelwachstums ist vermutlich größtenteils auf die geringere Konzentration an gelöstem Al zurückzuführen. Auch verminderte Protonentoxizität könnte zu diesem Effekt beitragen. Die höheren Al-Gehalte der Wurzelspitze lassen sich durch eine Zunahme der Kationenaustauschkapazität von Ca-Pektat bei steigendem pH-Wert durch zunehmende Deprotonierung von Carboxylgruppen zu negativ geladenen Carboxylatgruppen erklären (Blamey *et al.*, 1993b). Auch die Bindung von Al an Phospholipide der Plasmamembran könnte bei einem pH-Wert von 6,0 erhöht sein, wofür Shi und Haug (1988) in Untersuchungen an Phospholipid-Vesikeln Hinweise fanden. Die bevorzugte Ausfällung von $\text{Al}(\text{OH})_3$ an Oberflächen und das Wachstum von relativ stabilen Al-Hydroxid-Polymeren an bereits gebundenem Al (Hem, 1986) könnte zur Erhöhung der Al-Gehalte beitragen. Wie läßt sich der Widerspruch erklären, daß das stärkere Wachstum für eine geringere Al-Toxizität der Malat-Variante (pH 6,0) spricht, während der höhere Kallosegehalt auf eine stärkere Toxizität hindeutet? Für diese gegensätzliche Wirkung des hohen Al-Gehalts der Wurzelspitze auf die Kallosesynthese und das Wurzelwachstum sind zwei Interpretationen denkbar: 1. Sowohl die Zunahme des Wachstums als auch der Kallosesynthese sind weniger mit dem Al-Gehalt verbunden als vielmehr auf eine Verminderung der Protonentoxizität zurückzuführen. Der höhere pH-Wert könnte sich positiv auf die Enzymaktivität der Kallose-Synthetase auswirken und auch andere Wachstumsprozesse günstig beeinflussen. 2. Die Induktion der Kallosesynthese erfolgt durch andere Mechanismen als die Hemmung des Wurzelwachstums. Denkbar wäre, daß apoplastisch gebundenes Al Kallosebildung induzieren kann, während für die Hemmung des Wachstum Al in löslicher Form vorliegen muß und unter Umständen eine Aufnahme in den Symplasten voraussetzt. Dies steht im Widerspruch zu Untersuchungen bei Mais und Kartoffel, die viele Hinweise für die Hemmung des Wurzelwachstums durch apoplastisches, an Pektin gebundenes Al über Interaktion mit dem Zellwand-Plasmamembran-Cytoskelett-Kontinuum lieferten (Horst *et al.*, 1999; Schmohl *et al.*, 2000). Außerdem zeichnete sich ein Al-resistenter Mais-Genotyp im Vergleich zu einem sensitiven durch eine geringere Al-Akkumulation, geringere

Hemmung des Wurzelwachstums und geringere Al-induzierte Kallosebildung aus, wobei sich die Wurzelzone in 1-2 mm Entfernung von der Wurzelspitze als besonders Al-sensitiv bezüglich der Wachstumshemmung erwies (Kollmeier *et al.*, 2000). Unterschiede in der toxischen Wirkung von Al sind allerdings zu erwarten, da der Al-Akkumulator Hortensie über andere Toleranz-Mechanismen als die wesentlich Al-sensitiveren Pflanzenarten Mais und Kartoffel verfügen sollte. Auch die tendenziell höheren Kallosegehalte der Sorte 'Blauer Ball' stehen im Widerspruch zum tendenziell höheren Wachstum von 'Blauer Ball' im Vergleich zu 'Renate Steiniger'. Auch hier könnte entsprechend dieser zweiten Interpretation eine geringere Al-Verlagerung in den Symplast für das bessere Wachstum von 'Blauer Ball' im Vergleich zu 'Renate Steiniger' verantwortlich sein.

Al-Gehalte der Wurzel und verschiedener Sproßfraktionen

Im Gegensatz zu den Wurzelspitzen unterschieden sich die Al-Gehalte des gesamten Wurzelsystems bei niedrigem pH-Wert bei Angebot von Al in Form von Chlorid, Malat oder Citrat nicht (Abb. 3.25). Auch die Al-Verlagerung in den Sproß wurde durch die Al-Form bei niedrigem pH-Wert nicht beeinflusst (Tab. 3.3, Abb. 3.26). Für die Al-Aufnahme und Verlagerung in den Sproß scheint es folglich unerheblich zu sein, in welcher Form das Al vorliegt. Monomeres und komplexiertes Al scheinen mit der gleichen Aufnahmerate aufgenommen zu werden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Bartlett und Riego (1972), die bei Angebot von Al-Chlorid wesentlich höhere Al-Gehalte in Maiswurzeln und -sprossen fanden als mit Al-Citrat. Wie bereits erklärt, sollten sich Al-Exkluder und -Akkumulatoren jedoch in der Art und Weise ihrer Al-Aufnahme unterscheiden. Die vorliegenden Ergebnisse widersprechen auch der von Martin (1988) aufgestellten Hypothese, daß der neutrale Al-Citrat-Komplex die Permeation von Al durch Membranen ermöglichen könnte. Bei einem pH-Wert von 4,3 soll Al-Citrat zumindest teilweise als neutraler 1:1 Al-Citrat-Komplex vorliegen (Martin, 1988). Allerdings bezogen sich die Überlegungen von Martin auf tierische Systeme und können aufgrund der pflanzlichen Zellwand und unterschiedlicher Membranzusammensetzung nicht unbedingt auf pflanzliche Systeme übertragen werden. Im Gegensatz zu der Hypothese von Martin (1988) berechneten Akeson und Munns (1990), daß passive Permeation von ungeladenen und geladenen Al-Citrat-Komplexen nicht zur Aufnahme von Al in den Wurzelsymplast beiträgt. Auch Phospholipidvesikel wiesen eine sehr geringe Permeationsrate für Al-Citrat auf (Akeson und

Munns, 1989). Die Permeabilität biologischer Membranen kann sich jedoch erheblich von der von Phospholipidvesikeln unterscheiden. Einzelne Zellen von *Chara corallina* wiesen nach Behandlung mit Al-Citrat höhere Al-Gehalte im Protoplast auf als bei Behandlung mit Al-Chlorid, wobei hier Zellwand und Protoplast für die Al-Bestimmung durch mechanische Präparation voneinander getrennt wurden (Taylor *et al.*, 2000). Keine der genannten Untersuchungen oder Überlegungen enthält einen Erklärungsansatz für das Ergebnis des vorliegenden Versuchs, daß die Al-Verlagerung in den Sproß unabhängig von der Komplexierung des Al durch Malat oder Citrat war. Neben derselben Aufnahmerate für monomeres und komplexiertes Al ließe sich die Unabhängigkeit der Al-Verlagerung von der Al-Form durch zwei weitere Hypothesen erklären: 1. Die Al-Komplexe werden vor der Al-Aufnahme zerstört, so daß ausschließlich monomeres Al aufgenommen wird. 2. Es können genug organische Säureanionen ausgeschieden werden, so daß auch in der Al-Chlorid-Variante Al in komplexierter Form aufgenommen werden kann.

Der Al-Gehalt des gesamten Wurzelsystems der Al-Malat-Variante (pH 6,0) lag fünfmal höher als in den Varianten mit niedrigem pH-Wert. Trotzdem betrug die in den Sproß verlagerte Al-Menge bei hohem pH-Wert nur ca. ein Drittel der bei niedrigem pH-Wert verlagerten Al-Menge. Die geringe Al-Verlagerung in den Sproß in der Al-Malat-Variante (pH 6,0) läßt vermuten, daß die hohen Al-Gehalte der Wurzel vorwiegend auf einer Erhöhung des apoplastisch gebundenen Al und nicht auf einer erhöhten Aufnahme in den Symplasten beruhen. Sollte dies zutreffen, ließe sich außerdem die Schlußfolgerung ziehen, daß die Al-Aufnahme nicht durch das apoplastisch gebundene Al, sondern durch die Konzentration an gelöstem Al in der Nährlösung bzw. im Apoplasten bestimmt wird. In Übereinstimmung mit dieser Annahme waren sowohl die Konzentration an löslichem Al in der Nährlösung als auch die Al-Verlagerung in den Sproß um ca. zwei Drittel reduziert. Die Verminderung der Konzentration an löslichem Al in der Nährlösung während der 48stündigen Versuchsdauer ließ sich vollständig durch die in der Pflanzensubstanz analysierte Al-Menge erklären. Mögliche Ursachen für die höheren Al-Gehalte der Wurzel bei erhöhtem pH-Wert wurden bereits in bezug auf die Wurzelspitze erläutert und dürften auch für das gesamte Wurzelsystem zutreffen. Während der Al-Gehalt des gesamten Wurzelsystems in der Variante Al-Malat (pH 6,0) jedoch fünfmal höher war als in den Varianten bei niedrigem pH-Wert, betrug dieser Unterschied auf der Ebene der Wurzelspitzen nur das Doppelte. Dieser Unterschied läßt sich auf das stärkere

Wachstum der Wurzelspitzen in der Malat-Variante (pH 6,0) zurückführen, der mit einer stärkeren Verdünnung des Al verbunden sein könnte.

Als Nebeneffekt der separaten Mineralstoffanalyse in der basalen, medialen und apikalen Sproßfraktion konnte nachgewiesen werden, daß Al bei niedrigem pH-Wert bevorzugt in die apikale Sproßfraktion verlagert wurde und sich dort akkumulierte. Dieser Effekt war bei der Sorte 'Renate Steiniger' wesentlich ausgeprägter als bei 'Blauer Ball' und trägt sicherlich zur leichteren Blaufärbbarkeit von 'Renate Steiniger' bei. In der medialen Sproßfraktion unterschieden sich die Al-Gehalte der beiden Sorten nur geringfügig, in der basalen Sproßfraktion und der Wurzel nicht. Da der hohe Assimilatbedarf von Meristemen vorwiegend über Phloemtransport gedeckt wird (Marschner, 1995), könnte die Al-Akkumulation in der apikalen Sproßfraktion auf diesem Weg erfolgen. Denkbar wäre jedoch auch, daß Al im Xylemsaft bis in den apikalen Sproßbereich transportiert wird und sich dort akkumuliert, nachdem zunächst die Bindungsstellen für Al in der Wurzel und dann auch in den basaler gelegenen Sproßbereichen abgesättigt wurden. Dafür spricht, daß die apikale Al-Akkumulation der Sorte 'Blauer Ball', die insgesamt weniger Al in den Sproß verlagerte, geringer ausfiel. Außerdem war in der Al-Malat-Variante (pH 6,0) mit der geringsten in den Sproß verlagerten Al-Menge bei beiden Sorten keine Al-Akkumulation in der apikalen Sproßfraktion zu beobachten.

Al und organische Säuren im Xylem

Während die in den Sproß verlagerten Al-Mengen und die Al-Gehalte in den drei Sproßfraktionen bei niedrigem pH-Wert nicht von der angebotenen Al-Form beeinflusst wurden, war die Al-Konzentration im Xylemsaft in der Malat-Variante (pH 4,3) signifikant erhöht im Vergleich zu den Al-Chlorid und -Citrat-Varianten (Abb. 3.28). Auch die Malatkonzentration im Xylemsaft war in den beiden Al-Malat-Varianten geringfügig erhöht im Vergleich zu den Varianten mit Al-Chlorid und -Citrat-Angebot (Abb. 3.29). Diese beiden Beobachtungen lassen sich als Hinweis auf eine Beteiligung von Malat an der Al-Aufnahme bzw. an der Verlagerung und Detoxifizierung von Al im Xylemsaft interpretieren. Falls Malat tatsächlich eine Rolle spielen sollte, so ist die Hortensie jedoch in der Lage, die erforderlichen Konzentrationen an Malat selbst zu produzieren. Tatsächlich war die Malatkonzentration im Xylemsaft in Substratkultur nach Behandlung mit Al signifikant erhöht. Bei Angebot von Al-Chlorid in der Nährlösung betrug die Malatkonzentration circa 4 mM und war somit fünfmal höher als

in der Nährlösung. Ein Angebot von 500 μM Al mit einer mehrfach höheren Konzentration an Malat könnte den Anteil an mit Malat komplexiertem Al in der Nährlösung erhöhen und eventuell den Einfluß auf Al- und Malatkonzentration im Xylemsaft deutlicher erkennen lassen. Möglicherweise könnte ein langfristiges Angebot von Al-Malat eine Erhöhung der Al-Aufnahme oder zumindest eine Verbesserung der Pflanzenqualität bewirken, da die Pflanze Energie für die Produktion von Malat einsparen könnte. Trotzdem wäre dieser Effekt für eine Verbesserung der Al-Aufnahme bei der Produktion von blauen Hortensien in Substratkultur wahrscheinlich bedeutungslos, da aufgrund des relativ schnellen Abbaus des Malats im Substrat durch Mikroorganismen (Jones, 1998) kein langfristiges Angebot von Al in komplexierter Form aufrecht erhalten werden könnte.

Im Gegensatz zu Al-Malat beeinflusste ein Angebot von Al-Citrat weder die Al- noch die Citratkonzentration im Xylemsaft. Al- und Citratkonzentration waren jedoch im Xylemsaft signifikant miteinander korreliert (Abb. 3.30). Zwischen Al- und Malatkonzentration bestand kein Zusammenhang. Folglich ist es denkbar, daß Al komplexiert mit Malat aufgenommen und für den Transport im Xylem zu Al-Citrat umkomplexiert wird. Abweichend von den vorliegenden Ergebnissen führte ein Angebot von komplexiertem Al in Form von Oxalat bei Buchweizen im Vergleich zu Al-Chlorid zu einer starken Verminderung der Al-Konzentration im Xylemsaft. Dieses Ergebnis interpretierten Ma und Hiradate (2000) als Hinweis auf eine Aufnahme von Al in ionischer Form. Die Al-induzierte Exsudation von Oxalat bei Buchweizen (Zheng *et al.*, 1998a) könnte somit zur Verminderung der Al-Aufnahme beitragen. Übereinstimmend mit den vorliegenden Untersuchungen scheint auch bei Buchweizen Al im Xylem mit Citrat komplexiert transportiert zu werden. Auch bei Buchweizen soll somit Al in unterschiedlichen Formen aufgenommen und im Xylem transportiert werden. Während Al bei Hortensien jedoch auch in den Blättern durch Komplexierung mit Citrat detoxifiziert werden soll (Ma *et al.*, 1997), erfolgt bei Buchweizen hier anscheinend eine erneute Umkomplexierung zu Al-Oxalat (Ma *et al.*, 1998). Bei dem Al-Akkumulator Tee (*Camellia sinensis*) hingegen wurden Al-Fluorid-Komplexe als Transportform favorisiert (Nagata *et al.*, 1993; Yuan *et al.*, 1996) und Al-Catechin-Komplexe für die Detoxifizierung in den Blättern verantwortlich gemacht (Nagata *et al.*, 1992).

Wie ein Vergleich von Stecklingen aus Nährlösung mit Pflanzen aus Substratkultur zeigt, ähneln sich die prozentualen Anteile der verschiedenen organischen Säuren im

Xylemsaft. Nährlösungsversuche scheinen also für Untersuchungen zur Charakterisierung des Al-Transports und der transportierten Al-Form geeignet zu sein. Absolut waren jedoch in Nährlösungskultur sowohl die Konzentration an Al als auch an organischen Säuren im Xylemsaft etwas erhöht.

4.4 Einfluß eines kurzfristig niedrigen Al-Angebots auf die Induktion von Al-Resistenz

Durch die Vorbehandlung mit einer niedrigen Al-Konzentration ließ sich die Al-Toleranz von Weizenkeimlingen erheblich steigern. Aniol (1984) fand Hinweise, daß als Ursache für diesen Effekt die Al-induzierte Synthese eines Al-bindenden Proteins in Frage kommt. Für die Induzierbarkeit von Al-Resistenz sprechen auch Beobachtungen von Horst *et al.* (1983), die nach 18stündiger Al-Behandlung ein Wiedereinsetzen der Zellteilung bei Cowpea (*Vigna unguiculata*) feststellten, ebenso wie die Tatsache, daß die höchste Al-Resistenz bei Buschbohne (*Phaseolus vulgaris*) erst mit Verzögerung erreicht wurde (Cumming und Tomsett, 1992). In Zusammenhang mit der Induktion von Al-Resistenz wurden die Induktion von cytosolischen und membrangebundenen Proteinen (Ownby und Hruschka, 1991; Basu *et al.*, 1994c; Taylor *et al.*, 1997), die Exsudation von Polypeptiden (Basu *et al.*, 1994b; 1999), die Expression eines Gens für ein metallothionein-ähnliches Protein (Snowden *et al.*, 1995) und die Bildung Al-unempfindlicher Enzyme (Ślaski, 1989) beobachtet. Bei Roggen schien eine Umsteuerung des Stoffwechsels Voraussetzung für die Exsudation von organischen Säuren zu sein (Li *et al.*, 2000). Ob auch bei Hortensienstecklingen eine Induktion von Al-Resistenz durch eine Vorbehandlung bei niedriger Al-Konzentration gelingt, sollte in diesem Versuch überprüft werden. Falls die 7tägige Vorbehandlung mit 25 bzw. 50 μM Al eine Induktion von Al-Resistenz bewirken sollte, wäre in den vorbehandelten Varianten ein stärkeres Wurzelwachstum als in der nicht vorbehandelten Variante (0/500) zu erwarten. Aber weder nach 4 noch nach 7 Tagen anschließend, hohem Al-Angebot konnte anhand dieses Parameters eine Erhöhung der Resistenz durch die Vorbehandlung nachgewiesen werden (Abb. 3.31B). Geringere Kallosegehalte in den mit Al vorbehandelten Wurzelspitzen nach 24stündigem hohem Al-Angebot wiesen jedoch auf eine kurzfristige Verminderung der Al-Sensitivität hin (Abb. 3.32D), insbesondere da der Al-Gehalt der Wurzelspitzen nach Vorbehandlung mit 50 μM Al sogar erhöht war (Abb. 3.32C). Nach einem verlängerten hohen Al-Angebot von 500 μM für 7 Tage ließ sich jedoch auch anhand des Parameters Kallose keine Vermin-

derung der Sensitivität durch die Vorbehandlung mehr nachweisen (Abb. 3.33B). Ebenso unterschieden sich die Al-Gehalte der Wurzelspitzen nicht mehr in Abhängigkeit von der Vorbehandlung (Abb. 3.33A). Die Vorbehandlung scheint also zumindest kurzfristig eine Induktion von Al-Resistenz zu bewirken, diese führt aber nicht zu einer langfristigen Verbesserung des Wurzelwachstums und Erhöhung der Al-Resistenz.

Im Sortenvergleich schienen die tendenziell höheren Kallosegehalte der Wurzelspitzen von 'Blauer Ball' trotz ihrer signifikant niedrigeren Al-Gehalte auf eine höhere Al-Sensitivität im Vergleich zur Sorte 'Renate Steiniger' hinzudeuten. Im Versuch zum Einfluß der Al-Form auf Al-Aufnahme, -Verlagerung und -Toxizität hatte sich diese Tendenz bei Angebot von Al-Chlorid jedoch nicht gezeigt (Abb. 3.24).

Die Vorbehandlung mit den niedrigen Al-Konzentrationen selbst wirkte nicht toxisch, sie verminderte das Wurzelwachstum nicht (Abb. 3.31A). Vielmehr war der Kallosegehalt der Wurzelspitzen nach der Vorbehandlung trotz der signifikant erhöhten Al-Gehalte (Abb. 3.32A) sogar signifikant verringert (Abb. 3.32B). Dieser Effekt läßt sich bei dem niedrigen pH-Wert von 4,3 durch eine Melioration der Protonentoxizität durch die niedrigen Al-Konzentrationen erklären (Grauer und Horst, 1992; Blamey *et al.*, 1992; Kinraide *et al.*, 1992; Kinraide, 1993). Nach den in der zuvor genannten Literatur beschriebenen Modellen wird die Toxizität von Al und H^+ durch die Bindung von Al und von konkurrierenden Kationen wie H^+ an sensitive Kationenaustauschplätze im Apoplasten bzw. durch die Aktivität der Kationen an der Oberfläche der Wurzelzellen bestimmt.

Die beobachtete kurzfristige Verminderung der Al-Toxizität durch die Vorbehandlung ist keinesfalls auf eine verminderte Al-Aufnahme in die Wurzelspitzen oder die gesamte Wurzel zurückzuführen. Im Gegenteil, übereinstimmend mit den Ergebnissen von Aniol (1984), wiesen auch Wurzelspitzen, Wurzel und Sproß der Hortensienstecklinge nach Vorbehandlung und einem Tag bei hohem Angebot höhere Al-Gehalte auf als ohne Vorbehandlung. Zum Teil waren die erhöhten Al-Gehalte nicht allein auf Al-Aufnahme während der Vorbehandlung zurückzuführen, sondern ließen sich nur durch eine erhöhte Aufnahmerate während des hohen Al-Angebots erklären. Insbesondere traf dies auf Wurzelspitzen der Sorte 'Renate Steiniger' nach Vorbehandlung mit 50 μM Al und einem Tag bei hohem Al-Angebot (Abb. 3.32C) und für die Verlagerung von Al in den Sproß der Sorte 'Blauer Ball' (Abb. 3.34B) zu. Wäre der stark erhöhte Al-Gehalt im Sproß in den vorbehandelten Varianten allein auf die Aufnahme während der Vorbe-

handlung zurückzuführen, dann hätte die zusätzlich zur Aufnahme der nicht vorbehandelten Variante (0/500) aufgenommene Al-Menge in der Variante 50/500 deutlich höher als in der mit 25 μM vorbehandelten Variante ausfallen müssen. Die verstärkte Al-Verlagerung in den Sproß nach der Vorbehandlung stimmt gut mit der in Kap. 4.3 aufgestellten Hypothese überein, daß eine stärkere Al-Akkumulation im Sproß erst nach der Absättigung der Al-Bindungsplätze in der Wurzel erfolgt.

Aufgrund der Erfahrung mit den beiden Parametern Al-induzierte Kallozesynthese und Hemmung des Wurzelwachstums in diesem und den vorangegangenen Versuchen soll ihre Eignung zur Charakterisierung der Al-Toxizität bei Hortensienstecklingen beurteilt werden. Die Ergebnisse dieses Versuchs wie auch des Versuchs 3.3 sprechen für eine überlegene Empfindlichkeit der Kalloseinduktion zur Erfassung der Al-Toxizität im Vergleich zum Wurzelwachstum. Aufgrund des geringen Wurzelwachstums der Hortensienstecklinge im Vergleich zu anderen Pflanzenarten, der beschränkten Genauigkeit der Tauchwägung und der uneinheitlichen, relativ geringen Größe der Stecklinge war das durch Tauchwägung ermittelte Wurzelwachstum nur zur Erfassung größerer Wachstumsunterschiede (hier nach 7tägigem Angebot von 500 μM Al) geeignet, während sich mittels Kalloseinduktion auch geringere und kurzfristige Effekte charakterisieren ließen (hier nach 1tägigem Angebot von 500 μM oder 7 Tagen bei 25 μM). Die Al-induzierte Kallozesynthese scheint sich jedoch zur Beurteilung langfristiger Al-Effekte bei verschiedenen Pflanzenarten unterschiedlich gut zu eignen. Zhang *et al.* (1994) beobachteten während eines 48stündigen Al-Angebots bei Weizen zwar einen stetigen Anstieg der Kallosegehalte, bei verschiedenen Maissorten hingegen nahmen die Al-induzierten Kallosegehalte trotz andauernder Al-Behandlung bereits nach wenigen Stunden wieder stark ab (Collet, 2001). Die nach einem Tag hohem Al-Angebot etwas höheren Kallosegehalte als nach sieben Tagen sprechen für eine Abnahme der Al-induzierten Syntheserate von Kallose auch bei Hortensie. Die Bestimmung des Wurzelwachstums durch Tauchwägung wurde bevorzugt, weil das Wurzelsystem der Hortensien für die routinemäßige Erfassung des Wurzelwachstums durch Messung des Wurzellängenwachstums im Vergleich zu dem einfachen Wurzelsystem von Keimlingen wie z. B. von Mais schlecht geeignet ist. Gründe hierfür sind die dünnen, verletzungsempfindlichen und langsam wachsenden Hortensienwurzeln und die Komplexität des Wurzelsystems, bei dem sich Haupt- und Nebenwurzeln mit dem bloßen Auge nicht unterscheiden lassen (vergl. Kap. 4.2).

Für die Kultur von blauen Hortensien in der Praxis lassen sich aus dem vorliegenden Versuch folgende Schlußfolgerungen ziehen. Bei Applikation einer für die Hortensienpflanzen potentiell letalen Dosis könnte einer Verminderung der Sensitivität durch Vorbehandlung eine entscheidende Bedeutung zukommen: Wie Aniol (1984) beobachtete, überlebten nach Vorbehandlung 70 bis 80 % zweier Sorten von Weizenkeimlingen die Behandlung mit einer sonst letal wirkenden Al-Dosis. Möglicherweise können also Al-Behandlungen während der Vorkultur die Verträglichkeit von Al-Behandlungen während der Treiberei verbessern. Zusätzlich könnte sich der nach der Vorbehandlung beobachtete Effekt einer verstärkten Al-Verlagerung in den Sproß positiv auf die Al-Verlagerung in die Blüte und somit auf die Blaufärbung auswirken.

4.5 Einfluß von Al auf die Exsudation organischer Säureanionen durch die Wurzel

Die Al-Resistenz wurde bei verschiedenen Pflanzenarten und -sorten mit der Fähigkeit ihrer Wurzeln zur Ausscheidung von organischen Säuren in Verbindung gebracht (Miyasaka, 1991; de la Fuente *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1998a; Review: Jones, 1998). Die vorliegenden Untersuchungen sollten klären, inwieweit die Ausscheidung organischer Säuren zur außergewöhnlichen Al-Resistenz der Hortensie beitragen könnte.

Die beobachtete Erhöhung der Exsudationsrate von Citrat, Malat und Succinat nach Al-Behandlung (Abb. 3.35) läßt sich als Hinweis für eine Beteiligung dieser Säuren an der Detoxifizierung von Al interpretieren. Allerdings weisen weit weniger Al-resistente Pflanzenarten wie Rettich, Raps, Hafer oder Weizen ähnliche Exsudationsraten für Citrat und Malat auf (Zheng *et al.*, 1998b). Die außergewöhnliche Al-Resistenz der Hortensie läßt sich folglich nicht allein auf die Ausscheidung organischer Säuren zurückführen. Der Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit auf Trockengewicht basierenden Literaturangaben war möglich, indem die Exsudationsrate für die Umrechnung von g Frischgewicht auf g Trockengewicht als Bezugsbasis mit dem Faktor 11,8 multipliziert wurde.

Es stellt sich die Frage, inwieweit die von den Stecklingen in die Inkubationslösung exsudierten organischen Säureanionen in der Lage sind, Al zu komplexieren und zu detoxifizieren. Nach 44stündiger Behandlung mit 500 μM AlCl_3 und anschließender 2stündiger Exsudation in 500 mL CaCl_2 -Lösung betrug die Summe der Konzentrationen

an Citrat, Malat, Malonat und Succinat $4 \mu\text{M}$. Nach Berechnungen mit dem Spezifikationsprogramm GEOCHEM-PC könnten diese $4 \mu\text{M}$ von $500 \mu\text{M}$ Al nur 0,56 % komplexieren. Im Boden wäre jedoch eine stärkere Aufkonzentrierung der exsudierten organischen Säuren in der Rhizosphäre denkbar als in den 500 mL CaCl_2 -Lösung im Versuch. Beitragen könnten hierzu die geringere Diffusionsgeschwindigkeit im Boden im Vergleich zur Hydrokultur und eine verstärkte Exsudation durch eine höhere Konzentration an toxischem Al in der Rhizosphäre oder nach längerer Exsudationszeit. Außerdem reagierten bei Weizen und Mais insbesondere die Wurzelspitzen Al-empfindlich und wurden als entscheidende Exsudationsquelle für organische Säureanionen identifiziert (Ryan *et al.*, 1993; Delhaize *et al.*, 1993; Sivaguru und Horst, 1998; Horst *et al.*, 1999; Kollmeier *et al.*, 2000; 2001). Im folgenden soll deshalb die Komplexierung von Al durch organische Säureanionen unter der Voraussetzung berechnet werden, daß sie ausschließlich in die Rhizosphäre in bis zu $500 \mu\text{m}$ Entfernung von Wurzelspitzen ausgeschieden werden (vergl. Jones *et al.*, 1996). Wenn eine Pflanze durchschnittlich 40 Wurzelspitzen mit einer Länge von 1 cm und einem Durchmesser von $0,03 \text{ cm}$ hat, ergibt sich ein Rhizosphärenvolumen von ca. $0,5 \text{ cm}^3$. Würden die organischen Säuren also in ein Rhizosphärenvolumen von $0,5 \text{ mL}$ statt in 500 mL CaCl_2 exsudiert, entspräche das einer Konzentrationserhöhung der organischen Säuren um den Faktor 1000. Unter diesen Voraussetzungen wären von $500 \mu\text{M}$ Al 99 % mit organischen Säuren komplexiert, davon 42 % mit Citrat, 31 % mit Malonat und je 13 % mit Malat und Succinat. Theoretisch wäre durch die exsudierten organischen Säureanionen also eine Komplexierung des monomeren Al in der Rhizosphäre der Wurzelspitzen denkbar. Zur Beantwortung der Frage, ob dies unter realen Bedingungen der Fall ist, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Parker und Pedler (1998) bezweifeln, daß die Exsudation von Malat entscheidend zur Al-Toleranz von Weizen beitragen kann. Es ist zu berücksichtigen, daß organische Säuren im Boden schnell von Mikroorganismen abgebaut werden und nicht nur mit Al Komplexe bilden, sondern auch andere Bindungspartner der Bodenlösung und der festen Phase um die organischen Säuren konkurrieren (Jones, 1998 und Referenzen darin). Entgegen der verbreiteten Annahme, daß die Aktivität von Mikroorganismen im Bereich der Wurzelspitze gering ist, sprechen einige Untersuchungen für eine schnelle Besiedelung der Wurzelspitzen durch Mikroorganismen (Jones, 1998 und Referenzen darin). Die Gefahr einer zusätzlichen Mobilisierung von im Boden festgelegtem Al durch die ausgeschiedenen organischen Säuren besteht zwar, war in Untersuchungen

von Singh *et al.* (1997) jedoch vernachlässigbar. Da die Synthese der organischen Säuren energetisch aufwendig ist, stellt sich die Frage, ob sich Pflanzen eine Exsudation dauerhaft leisten können. Ob die hier nach Al-Behandlung erhöhte Exsudation allein auf der Öffnung von entsprechenden Anionen-Kanälen beruht oder eine Erhöhung des Gehalts an organischen Säuren durch Umsteuerung des Stoffwechsels Voraussetzung ist, läßt sich nicht sagen. Li *et al.* (2000) fanden bei Weizen Hinweise für eine erhöhte Exsudation durch Aktivierung eines Kanals. Bei Roggen hingegen sprachen ihre Ergebnisse für eine Umsteuerung des Stoffwechsels. Auch für Mais wurde ein Al-aktivierter Anionenkanal beschrieben (Piñeros und Kochian, 2001; Kollmeier *et al.*, 2001).

Bezüglich der Wirkung der Komplexierung von Al durch Citrat und Malat auf Al-Aufnahme, -Verlagerung und -Toxizität bei Hortensie wird auf die Diskussion in Kap. 4.3 verwiesen.

4.6 Al-Verlagerung in den Blütenstand und Blaufärbung in Nährlösungskultur

Als Ursache für die Sortenunterschiede in der Leichtigkeit der Blaufärbung kommen Unterschiede bei der Al-Verlagerung in die Blüte in Betracht. Der Vorteil der Nährlösungskultur besteht darin, daß das gesamte Wurzelsystem bei kontrolliertem pH-Wert mit einer definierten Al-Konzentration behandelt werden kann. Im Substrat hingegen kann die tatsächlich in der Rhizosphäre pflanzenverfügbare Al-Konzentration aufgrund der komplexen Wechselwirkungen mit dem Substrat selbst mit großem Aufwand nur näherungsweise bestimmt werden. Außerdem ist bei gleichem Al-Angebot in Substratkultur eine unterschiedliche Beeinflussung des pH-Werts und damit der Al-Verfügbarkeit durch verschiedene Sorten denkbar. Deshalb wurden Al-Verlagerung in die Blütenstände und die Blaufärbung der Sepalen auch in Nährlösungskultur untersucht.

Die Untersuchungen zur Al-Verlagerung in den Blütenstand lassen die Schlußfolgerung zu, daß für die leichtere Blaufärbbarkeit der Sorte 'Renate Steiniger' die Eigenschaft, bei gleichem Al-Angebot in kürzerer Zeit höhere Al-Gehalte in den Sepalen zu erreichen als die Sorte 'Adria' (Abb. 3.36), entscheidend ist. Bereits nach 5tägigem Al-Angebot von 500 μM AlCl_3 betrug der durchschnittliche Al-Gehalt in den Sepalen von 'Renate Steiniger' $0,74 \text{ mg (g TS)}^{-1}$, während die Sepalen von 'Adria' einen ähnlich hohen Al-Gehalt erst nach 15tägigem Al-Angebot aufwiesen. Die wesentlich schlech-

tere Blaufärbung von 'Blauer Ball' ist eindeutig auf die schlechtere Verlagerung in den Sproß und insbesondere in die Sepalen zurückzuführen (Abb. 3.36, Abb. 3.37). Die schlechtere Al-Verlagerung von 'Blauer Ball' in die Sproßspitze wurde übereinstimmend auch in Kapitel 3.3 (Abb. 3.26) beobachtet. Die Ergebnisse dieses Nährlösungsversuchs unterscheiden sich in folgendem Punkt von denen des Versuchs in Substratkultur (Kapitel 4.1). Während in Nährlösung die Sorte 'Blauer Ball' auch bei gleicher Al-Konzentration und gleichem pH-Wert niedrigere Al-Gehalte im Sproß aufwies, waren Al-Gehalte und Blaufärbung der Sepalen dieser Sorte im Substratversuch bei gleichem Substrat-pH-Wert ähnlich wie bei der Sorte 'Renate Steiniger'. Dies ließe sich dadurch erklären, daß der gleiche pH-Wert im Substrat bei der Sorte 'Blauer Ball' erst bei einem höheren Al-Angebot erreicht wird als bei 'Renate Steiniger'. Aus diesem Grund könnte die Al-Verfügbarkeit im Substrat der Sorte 'Blauer Ball' bei gleichem pH-Wert höher sein als bei der Sorte 'Renate Steiniger'. Diese Vermutung würde zutreffen, wenn im Substrat der Sorte 'Renate Steiniger' noch keine Al-Sättigung in der Bodenlösung erreicht wurde.

Als Ursache für die großen Unterschiede von Einzelpflanzen bei der Al-Verlagerung in die Sepalen kommen genetische Unterschiede in Betracht, da es sich bei den Hortensienarten nicht um isogene Linien handelt und die Stecklinge von verschiedenen Mutterpflanzen stammen. Eine große Bedeutung für die unterschiedliche Al-Verlagerung in die Sepalen von Einzelpflanzen scheint die sehr unterschiedliche Al-Akkumulation in den Blättern zu haben (Abb. 3.37). Während einige Einzelpflanzen in den basalen Blättern niedrige Al-Gehalte aufwiesen oder ähnliche wie die entsprechenden Internodien, übertrafen die Al-Gehalte bei anderen Einzelpflanzen auch in basalen Blättern die der Internodien um ein Vielfaches. Für die extremen Unterschiede der Al-Verlagerung in die Blätter können unterschiedliche Transpirationsraten der Blätter verantwortlich sein. Wie auf Abb. 3.38 zu sehen ist, waren die Blätter einiger Pflanzen vollständig vom Blütenstand überdeckt, während sie bei anderen seitlich darunter hervorragten. Nur Al, das nicht in die Blätter verlagert wurde, steht für den Weitertransport in die Sepalen zur Verfügung. Dieser Weitertransport wird von der Transpirationsrate der Sepalen beeinflußt (vergl. 4.7.3). Die im Vergleich zu den Blättern geringeren Unterschiede der Al-Gehalte in den Sepalen von Einzelpflanzen lassen sich entsprechend der zuvor aufgestellten Hypothese auf die gleichmäßigeren Transpirationsraten der freistehenden Blütenstände zurückführen. Möglicherweise verringern sich die Unterschiede der in die Blätter verlagerten Al-Mengen auch in der Summe über alle

Blätter. Die Ergebnisse zeigen, daß die in einzelnen Blättern bestimmten Al-Gehalte nicht unbedingt aussagekräftig für den Al-Gehalt des gesamten Sprosses oder der Sepalen sind.

Nach 15tägigem Al-Angebot wiesen die apikalen Blätter der meisten Pflanzen die stärkste Al-Akkumulation auf. Auch in den Sepalen der meisten Pflanzen fand eine starke Al-Akkumulation statt, allerdings lagen die Al-Gehalte im allgemeinen unter denen der apikalen Blätter. Die bevorzugte Al-Verlagerung in die apikalen Blätter und die Sepalen könnte auf eine besonders hohe Transpirationsrate dieser Pflanzenteile zurückzuführen sein. Die höhere Transpirationsrate der apikalen Pflanzenteile im Vergleich zu der der älteren basalen Pflanzenteile könnte auf eine mit zunehmendem Blattalter verminderte cuticuläre Transpiration zurückzuführen sein (Whitehead und Singh, 1995; Sase *et al.*, 1998; Hauke und Schreiber, 1998). Wie in diesem Versuch wurde auch in Kapitel 3.3 (Abb. 3.26) eine bevorzugte Al-Verlagerung in die Sproßspitze beobachtet. Während es sich dort jedoch um eine vegetative Sproßspitze mit schnell wachsenden jungen Blättern handelte, in die ein Al-Transport im Phloem denkbar wäre, waren die apikalen Blätter der Blütenstecklinge in diesem Versuch bereits vollständig ausgewachsen. Somit scheint hier ein Al-Transport mit dem Transpirationsstrom im Xylem wahrscheinlicher als im Phloem zu sein. Nach Canny (1995) akkumulieren sich im Xylemsaft gelöste Substanzen, die langsamer als Wasser in den Symplast eindringen, in den schmaler werdenden Gefäßen in transpirierenden Blättern und Sproßspitzen. Hinweise auf eine Transpirationsabhängigkeit der Al-Verlagerung in den Sproß von Hortensien geben die in Kapitel 4.7.3 diskutierten Versuchsergebnisse. Die im Vergleich zu den apikalen Blättern geringeren Al-Gehalte in den Sepalen sind vermutlich auf einen wachstumsbedingten Verdünnungseffekt zurückzuführen.

Im Vergleich zur Substratkultur erfolgten Al-Verlagerung in die Sepalen und deren Blaufärbung in Nährlösungskultur in wesentlich kürzerer Zeit. Erfahrungsgemäß werden in Substratkultur ein Al-Gehalt von über 1 mg (g TS)^{-1} und zufriedenstellende Blaufärbung nur bei rechtzeitiger Al-Behandlung und Absenkung des Substrat-pH-Werts erreicht. In der Praxis wird deshalb angestrebt, durch Al-Behandlung den Substrat-pH-Wert spätestens vier Wochen vor der Blüte auf 4,3 abgesenkt zu haben. Entsprechend der oben beschriebenen schnellen Al-Verlagerung in die Sepalen wurden im vorliegenden Versuch bei der Sorte 'Renate Steiniger' bereits nach 2tägigem Angebot von $500 \text{ }\mu\text{M}$ Al die ersten Anzeichen von Blaufärbung und nach 10 Tagen eine

zufriedenstellende Blaufärbung der Blütenstände beobachtet (nicht dargestellt). Ebenso wie in Substratkultur (Abb. 3.8) war die Blaufärbung über die drei Sorten signifikant mit dem Al-Gehalt der Sepalen korreliert (Abb. 3.39).

Die bessere Verlagerung von Al in die Sepalen in Nährlösungskultur ist vermutlich vor allem auf die bessere Verfügbarkeit von Al in Nährlösung aufgrund des konstant niedrigen pH-Werts von 4,3 zurückzuführen. Im Substrat ist hingegen keine gleichmäßige Al-Verteilung zu erzielen, so daß lokal vermutlich toxische Al- und Protonenkonzentrationen neben Bereichen mit hohem pH-Wert und somit mangelhafter Al-Verfügbarkeit auftreten. Im Vergleich zur Nährlösungskultur ist die für die Al-Aufnahme zur Verfügung stehende Wurzeloberfläche in Substratkultur vermindert, da hier Aufnahme nur an der mit der Bodenlösung in Kontakt stehenden Wurzeloberfläche erfolgen kann. Außerdem wurde gezeigt, daß die Wurzeln vieler Pflanzenarten bei Luftkontakt in feuchter Umgebung, wie er auch in Substratkultur bei Kontakt mit der Bodenluft vorkommt, früher und häufiger eine suberinisierte und cutinisierte Exodermis ausbilden als in Nährlösung und dadurch die Ionenaufnahme beeinträchtigt wird (Enstone und Peterson, 1998; Zimmermann und Steudle, 1998; Zimmermann *et al.*, 2000; Gierth, 2000). Zusätzlich könnten hohe Al-Gehalte in den in diesem Versuch verwendeten eintriebigen Blütenstecklingen generell schneller erreicht werden als in mehrtriebigen Pflanzen, wie sie in dem Versuch in Substratkultur verwendet wurden.

4.7 Einflußfaktoren auf die Al-Verlagerung in die Sepalen

4.7.1 Blütenstandsgröße

Bei nicht frühzeitig in der Treiberei beginnender Al-Behandlung kann nach Beobachtungen aus der Praxis häufig keine zufriedenstellende Blaufärbung der Hortensien mehr erzielt werden. Ob die Phase zu Beginn der Entwicklung der Blütenstände von Hortensien wichtiger für die Al-Aufnahme ist als spätere Phasen, sollte durch Untersuchung der Al-Verlagerung in Blütenstände von unterschiedlicher Größe überprüft werden.

Die lineare Korrelation zwischen der in die Blütenstände verlagerten Al-Menge und dem Trockengewicht bzw. der Fläche der Blütenstände sowie die Unabhängigkeit des Al-Gehalts vom Trockengewicht der Blütenstände sprechen nicht für eine besondere Bedeutung der frühen Entwicklungsphase der Blütenstände für die Al-Aufnahme (Abb. 3.40). Die in die Blütenstände verlagerte Al-Menge glich also bei Blütenständen mit einem Trockengewicht zwischen 0,21 g und 3,75 g bzw. einer Fläche zwischen 28

und 305 cm² die durch das Wachstum der Blütenstände bewirkte Verdünnung des Al-Gehalts aus. Wäre der Beginn der Entwicklung der Blütenstände besonders wichtig für die Al-Verlagerung in die Sepalen, hätten junge, kleine Blütenstände besonders hohe Al-Gehalte aufweisen müssen. Entgegen dieser Hypothese wiesen junge Blütenstände jedoch ähnliche, höchstens geringfügig höhere Al-Gehalte auf. Wichtig für die Erzielung hoher Al-Gehalte in den Sepalen und somit einer zufriedenstellenden Blaufärbung scheint eine kontinuierlich gute Al-Verfügbarkeit ab Beginn der Treiberei zu sein, damit die Al-Aufnahme über einen möglichst langen Zeitraum erfolgen kann.

4.7.2 Unterbrechung des Phloemtransports durch Ringelung

Da die Bedeutung des Phloemtransports relativ zum Xylemtransport für stark wachsende Gewebe größer ist als in älteren Geweben (Marschner, 1995), wäre es denkbar, daß der Al-Transport in die stark wachsenden Sepalen zum großen Teil im Phloem erfolgt. Inwieweit der Phloemtransport zur Al-Verlagerung in die Blütenstände beiträgt, sollte durch Abtötung der Phloemzellen unterhalb des Blütenstands mittels heißen Wasserdampfes, der sogenannten Ringelung, abgeschätzt werden. In Substratkultur war der Al-Gehalt in Sepalen und Rispenästen 7 Tage nach der Ringelung nur tendenziell, aber nicht signifikant niedriger als in ungeringelten Blütenständen (Abb. 3.41). Sowohl das Wachstum als auch die Al-Aufnahme der geringelten Blütenstände waren durchschnittlich um circa 30 % geringer als bei den nicht geringelten Blütenständen. Die tendenziell verminderte Al-Aufnahme könnte auf die Unterbrechung des Phloemtransports zurückzuführen sein. Aber da die Blütenstandsgröße vermindert war, kommt auch eine aufgrund der kleineren Oberfläche verminderte Transpiration als Ursache in Frage. Zusätzlich könnte die Unterbrechung des Phloemtransports die turgorgesteuerte Spaltöffnungsbewegung beeinträchtigen, die durch den Saccharose-Konzentrationsgradienten zwischen Sym- und Apoplast der Schließzellen reguliert wird (Outlaw and Vlieghere-He, 2001), und dadurch die Transpirationsrate in den geringelten Blütenständen negativ beeinflussen.

Es ist zu vermuten, daß die während der 7 Tage nach der Ringelung aufgenommene Al-Menge im Vergleich zur bereits zuvor aufgenommenen Al-Menge relativ gering war. Nicht geringelte Blütenstände verdoppelten ihre Fläche während der 7tägigen Versuchsdauer nahezu. Da in Kap. 3.7.1 (Abb. 3.40B) eine lineare Korrelation zwischen Blütenstandsfläche und Al-Aufnahme nachgewiesen wurde, läßt sich berechnen, daß die Hälfte der in die nicht geringelten Blütenstände aufgenommenen Al-Menge, nämlich

0,3 mg, bereits vor dem Termin der Ringelung aufgenommen wurde. Folglich wären durch die geringelten Blütenstände während der 7 Tage nur 25 % zusätzlich aufgenommen worden. Da also sowohl die Al-Aufnahme als auch das Wachstum der geringelten Blütenstände relativ gering waren, kann aus dem ohne und mit Ringelung ähnlichen Al-Gehalt nicht der Schluß gezogen werden, daß Phloemtransport keine Rolle für die Al-Verlagerung in die Blütenstände spielt. Eine Vorbehandlung des Substrats mit Al bereits vor der Ringelung erschien notwendig, da eine meßbare Al-Verlagerung in die Blütenstände innerhalb von 7 Tagen nach Al-Behandlung des Substrats als unwahrscheinlich einzuschätzen ist. Eine längere Versuchsdauer ist nicht möglich, da bereits nach 7 Tagen die ersten Anzeichen abnehmender Turgeszenz der Blütenstände erkennbar waren.

Anders als in Substratkultur können in Nährlösungskultur Al-Angebot und pH-Wert und damit die Al-Verfügbarkeit besser gesteuert werden. Außerdem wurde bereits eine ausreichend schnell meßbare Al-Verlagerung in die Blütenstände beobachtet (3.6.1, Abb. 3.36). Deshalb wurde ein ähnlicher Versuch mit blühenden Hortensienstecklingen in Nährlösung durchgeführt, bei dem erst nach der Ringelung mit der Al-Behandlung begonnen wurde. Nach 5tägigem Angebot von 500 μM AlCl_3 unterschieden sich die Al-Gehalte in den Sepalen von geringelten und nicht geringelten Blütenständen der Sorten 'Renate Steiniger', 'Adria' und 'Blauer Ball' nicht signifikant (Abb. 3.42). Tendenziell wiesen die Sorten 'Adria' und 'Blauer Ball' jedoch nach der Ringelung einen um 47 % geringeren Al-Gehalt auf. Für die in die Sepalen verlagerten Al-Mengen ergab sich ein ähnliches Bild wie für die Al-Gehalte (nicht dargestellt). Diese Ergebnisse lassen die Schlußfolgerung zu, daß die Al-Verlagerung in die Sepalen zu mindestens 50 % nicht im Phloem, sondern im Xylem erfolgt. Phloemtransport könnte jedoch bei 'Adria' und 'Blauer Ball' zu knapp 50 % an der Al-Verlagerung in die Sepalen beteiligt sein. Die nach der Ringelung beobachteten verminderten Al-Gehalte könnten jedoch, wie für den Versuch in Substratkultur diskutiert, auch auf eine geringere Transpiration in dieser Variante zurückzuführen sein.

Allerdings sind die Ergebnisse dieses Nährlösungsversuchs mit Vorsicht zu betrachten, da die Versuchspflanzen vier Tage vor der Ringelung aufgrund eines Defekts der Klimakammer für einige Stunden einer Temperatur von über 50 °C ausgesetzt waren. Dieser Hitzeschock führte bei einigen Versuchspflanzen zu leichten Nekrosen an Blättern und Sepalen. Im Vergleich zu den in Kapitel 3.6 beschriebenen Ergebnissen

(Abb. 3.36) war der Al-Gehalt in den Sepalen der Sorte 'Renate Steiniger' in diesem Versuch nach 5tägigem Al-Angebot durchschnittlich wesentlich geringer. Während einige Einzelpflanzen ähnliche Al-Gehalte wie im vorigen Versuch aufwiesen, schien bei einigen die Al-Verlagerung in die Sepalen durch den Hitzeschock gestört zu sein. Auch zwei nicht sichtbar geschädigte Blütenstände der Sorte 'Renate Steiniger' wiesen ungewöhnlich niedrige Al-Gehalte auf. Wahrscheinlich ist die hohe Standardabweichung auf den Hitzeschock zurückzuführen. Der Wert der Beobachtung, daß Al-Transport in die Sepalen trotz Ringelung unterhalb des Blütenstandes stattfindet, wird durch den Hitzeschock nicht gemindert. Deshalb und wegen der sehr zeit- und arbeitsintensiven Anzucht von blühenden Stecklingen in Nährlösungskultur wurde dieser Versuch hier trotz des nicht optimalen Versuchsablaufs dokumentiert.

4.7.3 Transpiration

Der Einfluß der Transpiration auf die Al-Verlagerung in Pflanzen ist bisher wenig untersucht. Bei einigen Al-akkumulierenden Pflanzenarten deuten einzelne Untersuchungen jedoch auf eine Abhängigkeit der Al-Aufnahme und -Verlagerung von der Transpiration hin: Wagatsuma (1984) folgerte aufgrund der unterschiedlichen Al-Verlagerung während der Nacht- bzw. Tagphase, daß die Al-Verlagerung in den Sproß bei dem Al-Akkumulator *Raphanus sativus* L. (Japanischer Rettich) von der Transpiration abhängt, beim Al-Akkumulator *Fagopyrum esculentum* Moench (Buchweizen) hingegen vom Wurzeldruck. Neue Untersuchungen belegen jedoch, daß die Al-Verteilung in Blättern bei *Fagopyrum esculentum* von der Transpirationsrate und dem Blattalter bzw. der Dauer, während der die Transpiration wirkte, abhängt (Shen und Ma, 2001). Auch für die höhere Al-Aufnahme von Wurzeln intakter Pflanzen im Vergleich zu abgeschnittenen Wurzeln machten Watanabe *et al.* (2001) beim Al-Akkumulator *Melastoma malabathricum* L. die Abhängigkeit der Al-Verlagerung von der Transpiration verantwortlich.

Um den Einfluß der Transpirationsrate auf die Al-Verlagerung in die Blütenstände von Hortensien zu untersuchen, wurde die Luftfeuchtigkeit variiert (3.7.3). Durch Eintüten der Blütenstände sollte die Luftfeuchtigkeit im Vergleich zu Blütenständen ohne Tüten erhöht und somit die Transpirationsrate herabgesetzt werden. Eine Zugabe von Silikagel sollte eine Verminderung der Luftfeuchtigkeit in der Tüte und eine Erhöhung der Transpirationsrate bewirken. Wenn der Al-Transport von der Transpiration abhängt, wäre bei erhöhter Transpirationsrate eine erhöhte Al-Verlagerung in die Blütenstände zu

erwarten. Tatsächlich wiesen Blütenstände nach drei Wochen in Tüten mit Silikagel gemittelt über die Sorten 'Renate Steiniger' und 'Adria' übereinstimmend mit dieser Hypothese um 13 % signifikant höhere Al-Gehalte auf als Blütenstände mit Tüte ohne Silikagel (Abb. 3.43). Zwischen der Variante mit und ohne Tüte unterschieden sich die Al-Gehalte allerdings nicht signifikant. Erklären ließen sich die Beobachtungen durch die Annahme, daß in der Tüte mit Silikagel eine geringere Luftfeuchtigkeit erreicht wurde als in der Tüte ohne Silikagel, während der Luftfeuchtigkeitsunterschied zwischen der Variante ohne und mit Tüte weniger groß war. Da alle untersuchten Blütenstände der beiden Sorten jeweils von einer Pflanze stammten, ist keine Aussage über die Signifikanz von Sortenunterschieden möglich. Köhl *et al.* (1996) vermuteten, daß die starke Al-Akkumulation in Blättern verschiedener Baumarten des Laurelwaldes der Kanarischen Inseln eine Konsequenz der schlechten Transpirationskontrolle ihrer phylogenetisch ursprünglichen Blätter sei. Die Ergebnisse des vorliegenden Versuchs sprechen dafür, daß auch die Al-Verlagerung der Hortensie transpirationsabhängig und die Al-Akkumulation in den Sepalen die Konsequenz einer hohen Transpirationsrate und folglich hohen Wasseraufnahme ist.

4.8 Bestimmung der Al-Konzentration im Vakuolensaft von Sepalen

In blaugefärbten Sepalen werden Gehalte von über 1 mg Al (g Trockensubstanz)⁻¹ erreicht. Die Kompartimentierung von Al in Vakuolen könnte dazu beitragen, die Al-Konzentration im Cytoplasma niedrig zu halten und so negative Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel zu minimieren. Nachdem die EELS und ESI-Untersuchungen der Wurzeln Hinweise für die Al-Akkumulation in Vakuolen von Cortexzellen geliefert haben (4.2), sollte überprüft werden, ob dieser Mechanismus auch in Sepalen eine Rolle spielt. Verschiedene Al-akkumulierende Pflanzenspezies aus einem Nebelwald in Venezuela wiesen in Blattpreßsäften Al-Konzentrationen von nicht nachweisbar bis 177 mM auf (Cuenca *et al.*, 1990). Allerdings zeigten EDX-Untersuchungen zur Al-Verteilung in Blättern von Tee (*Camellia sinensis*) Al-Akkumulationen in den Zellwänden der Epidermis (Memon *et al.*, 1981). Sowohl bei *Camellia sinensis* (Echlin, 1996a) als auch bei *Richeria grandis* (Cuenca *et al.*, 1991) wurde mittels EDX-Analyse in epidermalen Zellwänden mehr Al nachgewiesen als in epidermalen Vakuolen. Da bei der Gewinnung von Blattpreßsaft bei hohem Al-Gehalt der Zellwände vermutlich eine Kontamination des Vakuolensafts stattfindet, wurde in der vorliegenden Arbeit Vakuo-

lensaft mittels Glaskapillaren und modifizierter Druckmeßsondentechnik aus einzelnen Sepalenzellen entnommen (2.2.8). Eigene Voruntersuchungen mittels EDX-Analyse ergaben Hinweise für eine besonders hohe Al-Akkumulation in der adaxialen Subepidermis und geringere Al-Akkumulationen in der Epidermis und der ersten unter der Subepidermis liegenden Mesophyllzellschicht, in der zweiten und dritten Mesophyllzellschicht war hingegen kein Al nachweisbar (nicht dargestellt). Neben der hohen Al-Konzentration scheint auch das Vorkommen des Sepalenfarbstoffs insbesondere in den Subepidermiszellen (Allen, 1943 und eigene nicht dargestellte lichtmikroskopische Untersuchungen) auf eine besondere Bedeutung dieser Zellschicht für die Blaufärbung und möglicherweise auch für die Entgiftung von Al in den Sepalen hinzuweisen. Deshalb sollte Vakuolensaft aus dieser Zellschicht entnommen werden. Da Vakuolensaft von rosa Sepalen deutlich rosa und von blauen Sepalen deutlich blau gefärbt war, ist davon auszugehen, daß der analysierte Vakuolensaft wie beabsichtigt vor allem aus Subepidermiszellen stammte.

Die mittels modifizierter Druckmeßsondentechnik gewonnenen Flüssigkeiten aus der Subepidermis von Sepalen der Sorte 'Renate Steiniger' wiesen nach Al-Angebot von $6 \text{ g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O (L Substrat)}^{-1}$ eine durchschnittliche Al-Konzentration von 6,5 mM auf (Abb. 3.45). Erfahrungsgemäß weisen blaue Sepalen mit einer Farbboniturnote von 5 bis 5,5, wie sie hier erreicht wurden, Al-Gehalte von etwa 1 bis 1,5 mg (g TS)⁻¹ auf, was 4,4 bis 6,6 mmol (kg Frischgewicht)⁻¹ oder gelöst in 1 L einer Konzentration von 4,4 bis 6,6 mM entspräche. Die gemessenen Al-Konzentrationen liegen somit in einem Bereich, der eine starke Verlagerung von Al in die Vakuole voraussetzt. Die hohe Al-Konzentration läßt vermuten, daß die Kompartimentierung von Al in Vakuolen zur Al-Toleranz von Subepidermiszellen und wahrscheinlich auch von Sepalen und Blättern insgesamt beiträgt. Durch die Komplexbildung von Al mit dem Farbstoff Delphinidin könnte die Al³⁺-Konzentration im Vakuolensaft niedrig gehalten und ein Transport bzw. Rücktransport ins Cytoplasma verhindert werden. Auf welche Art ein Al-Transport durch das Cytoplasma in die Vakuole erfolgen könnte, wurde bereits für die Wurzel diskutiert (4.2) und dürfte im Blatt ähnlich sein. Ob darüber hinaus auch eine Al-Akkumulation in den Zellwänden erfolgt, wie sie bei Tee (*Camellia sinensis*) und *Richeria grandis* beobachtet wurde (Memon *et al.*, 1981; Echlin, 1996a; Cuenca *et al.*, 1991), erscheint fraglich. Die bei *Hydrangea* in eigenen orientierenden EDX-Untersuchungen gefundenen Hinweise für höhere Al-Gehalte in subepidermalen Vakuolen als in epidermalen Vakuolen stehen im Einklang mit der

Beobachtung bei *Camellia sinensis*, daß Vakuolen aus Palisadenparenchymzellen höhere Al-Konzentrationen als epidermale Vakuolen aufwiesen (Echlin, 1996a). Möglicherweise wird der Weitertransport von Al zu den epidermalen Vakuolen bei *Hydrangea* durch eine starke Al-Akkumulation in den Vakuolen der Subepidermis durch Komplexierung mit dem Farbstoff Delphinidin beschränkt. In subepidermalen Vakuolen der Blätter von *Camellia sinensis* könnten andere Phenole eine ähnliche Rolle spielen. Dort wurden elektronendichte Einlagerungen nachgewiesen, für deren phenolischen Charakter ihre stark eisenbindenden Eigenschaften sprechen (Baß, *et al.*, 1997).

Das Verhältnis von Al-Gehalt in Hortensienblättern und Al-Konzentration im Preßsaft dieser Blätter war ähnlich wie oben für die Sepalen berechnet. Ma *et al.* (1997) fanden im Preßsaft von Hortensienblättern mit einem im Vergleich zu den Sepalen deutlich höheren Al-Gehalt von $15,66 \text{ mmol (kg Frischgewicht)}^{-1}$ auch entsprechend höhere Al-Konzentrationen von 13,70 mM.

Neben dem generellen Nachweis von vakuolärem Al war ein weiteres Ziel des vorliegenden Versuchs, einen ersten Eindruck vom Einfluß des Al-Angebots und der Hortensienorte zu gewinnen. Die Al-Konzentration in den analysierten Vakuolensäften der Sorte 'Blauer Ball' war mit 3,5 mM bei identischem Al-Angebot von $6 \text{ g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O (L Substrat)}^{-1}$ nur etwa halb so hoch wie bei 'Renate Steiniger'. Diese Beobachtung steht im Einklang zu den geringeren Al-Gesamtgewebegehalten der Sepalen und zu der bei gleichem Al-Angebot schlechteren Blaufärbung von 'Blauer Ball' im Vergleich zu 'Renate Steiniger' (3.1). 'Renate Steiniger' erreichte ähnliche Al-Gehalte in den analysierten Vakuolensäften bereits bei einem wesentlich niedrigerem Al-Angebot von $2 \text{ g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O (L Substrat)}^{-1}$. Ebenso wie die Gesamtgewebegehalte der Sepalen an Al (Abb. 3.8) war auch die Al-Konzentration des Vakuolensafts signifikant positiv mit der Blaufärbung der Sepalen korreliert (Abb. 3.46). Dabei wiesen Sepalen von 'Blauer Ball' und 'Renate Steiniger', deren Vakuolensäfte ähnliche Al-Konzentrationen hatten, eine ähnliche Blaufärbung auf. Die unterschiedliche Blaufärbung der Sorten scheint auf unterschiedlicher Al-Verlagerung in die Sepalen und unterschiedlichen Al-Gehalten zu beruhen, bei gleichem Al-Gesamtgewebegehalt scheint die Al-Verlagerung in die Vakuole jedoch bei beiden Sorten identisch zu sein.

Die unterschiedliche Anzahl an Wiederholungen sollte eine Orientierung über die Variabilität der vakuolären Al-Konzentration von verschiedenen Einzelpflanzen,

Sepalen einer Pflanze und verschiedenen Proben aus derselben Sepale ermöglichen. Eine repräsentative Probennahme zum Nachweis des Einflusses von Al-Angebot und Sorte hätte den geplanten materiellen und zeitlichen Rahmen der Kooperation mit der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit der Justus-Liebig-Universität Gießen (Koyro) und dieser Arbeit überschritten.

Die Nachweisgrenze für die EDX-Analyse lag nach Marienfeld (1992) bei einer Konzentration von 13,7 mM Al und kann bei *in situ* Messungen durch Aufkonzentrierung der Elemente beim Ätzen der Gewebeoberfläche um den Faktor sechs herabgesetzt werden. Bei der hier angewendeten Methode wurde durch die Trocknung der Tropfen (10 pL) vor der EDX-Messung schätzungsweise eine Aufkonzentrierung um einen Faktor von mehr als zehn erreicht. Dadurch konnte die Al-Konzentration auf Werte oberhalb der Nachweisgrenze erhöht werden. Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit der Methode waren zum eindeutigen Nachweis von Al in den Vakuolensäften bereits ausreichend, lassen sich für zukünftige Untersuchungen jedoch noch verbessern, z. B. durch Erhöhung des Probenvolumens, Veränderung der Meßzeit oder weiterer Meßparameter. Die Beeinflussung der EDX-Messung durch möglicherweise unterschiedliche osmotische Drücke in Vakuolensaftproben und Standards mit 200 mM Saccharose wurde hier nicht berücksichtigt.

Im Gegensatz zur *in situ* Bestimmung besteht bei dieser Methode nicht die Gefahr, benachbartes Cytoplasma oder Zellwand mitzumessen. Eine Kontamination der gewonnenen Vakuolenflüssigkeit durch Al aus Zellwänden und Cytoplasma erscheint vernachlässigbar, da das aus diesen Kompartimenten entnommene Flüssigkeitsvolumen aufgrund des großen Anteils der Vakuole am Gesamtvolumen der Zelle von etwa 80 bis 99 % vernachlässigbar sein sollte (vergl. Malone *et al.*, 1991). Die Al-Konzentration im Cytoplasma sollte zudem deutlich niedriger liegen.

Aufgrund der geringen Al-Aufnahme, -Verlagerung und -Toleranz der Mehrzahl der Pflanzenarten und der beschränkten Empfindlichkeit und räumlichen Auflösung der verfügbaren Meßmethoden für Al (vergl. Rengel, 1996) sind bislang nur sehr wenige quantitative Bestimmungen bezüglich Al-Aufnahme in die Vakuole und Al-Konzentration des Vakuolensafts erfolgreich gewesen. Mittels des seltenen Elements ^{26}Al und Beschleunigungs-Massenspektrometrie ermittelten Taylor *et al.* (2000) nach einer 30minütigen Lag-Phase einen Anstieg der Aufnahme rate auf bis zu $46 \text{ ng Al m}^{-2} \text{ min}^{-1}$ in die Vakuole einzelner Zellen der Alge *Chara corallina*, wobei sie die Vakuole vor

der Al-Bestimmung mechanisch aus dem Protoplast herauspräparierten. Echlin (1996b) fand in Voruntersuchungen mittels Low-Voltage EDX-Analyse etwas höhere Al-Gehalte in Epidermiszellwänden von Blättern bei Tee (*Camellia sinensis*) als in der Vakuole. In der Zellwand konnte er nach Al-Behandlung Al-Gehalte von 3295 ppm Al (± 597 , n = 32) quantifizieren (Echlin, 1999).

Die vorliegende Untersuchung ist in der mir zugänglichen Literatur die erste, in der Al im Vakuolensaft von Hortensiensepalen quantifiziert werden konnte. Die Ergebnisse dieses Versuchs sprechen dafür, daß das vakuoläre Al einen bedeutenden Anteil am Al-Gesamtgewebegehalt der Sepalen darstellt und für die Blaufärbung verantwortlich ist. Dabei ist zu betonen, daß die Angabe der Al-Konzentration aufgrund der geringen Anzahl an Wiederholungen und des hohen Variationskoeffizienten der Parallelmessungen in einer Vakuolensaftprobe einen „semiquantitativen“ Charakter hat.

5 SCHLUSSBETRACHTUNG UND AUSBLICK

Im folgenden soll anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und weiterer Literatur ein zusammenhängendes, teilweise noch hypothetisches Bild entworfen werden, wie Al in die Wurzelspitze bzw. das gesamte Wurzelsystem aufgenommen und in der Hortensienpflanze von der Wurzel in den Sproß und die Blütenstände verlagert wird. Dabei wird den Ursachen für die außergewöhnliche Al-Toleranz der Hortensie und den Faktoren, die die Blaufärbung beeinflussen und für Sortenunterschiede verantwortlich sind, besondere Beachtung geschenkt.

Sofern Al bei niedrigem pH-Wert in gelöster Form in der Boden- oder Nährlösung vorliegt, wird es von der Hortensie aufgenommen. Aufgrund der Tatsache, daß Al in Vakuolen von Cortezzellen der Wurzelspitze gefunden wurde, ist zu vermuten, daß die Verlagerung von Al von der Rhizodermis zum Zentralzylinder nicht nur auf apoplastischem, sondern auch auf symplastischem Weg erfolgt. Al-Behandlung und -Aufnahme in die Wurzel wurden begleitet von morphologischen Veränderungen, die insbesondere die Wurzelspitze betrafen. Zu beobachten waren eine Vergrößerung der Zellen im Randbereich der Wurzelspitze, verbunden mit einer deutlichen Zunahme der Anzahl und Größe von Vakuolen und Vesikeln, und der Beginn der Zellstreckung in geringer Entfernung von der Wurzelspitze. Diese Veränderungen können auf Al-bedingten Störungen des Membranabbaus oder des Vesikeltransport-Kreislaufs vom Endoplasmatischen Retikulum (ER), zu den Dictyosomen, der Plasmamembran und den Vakuolen (Membranfluß, engl.: membrane cycling) beruhen, die zur Störung der Zellteilung und Hemmung des Wurzelwachstums führen. Da ähnliche morphologische Veränderungen bei weniger Al-resistenten Pflanzenarten bereits bei wesentlich niedrigerem Al-Angebot oder kürzerer Behandlungsdauer auftraten, muß die Hortensie über effektive Resistenzmechanismen verfügen.

Die bei Al-Angebot stimulierte Exsudation organischer Säureanionen kann als Mechanismus zur Detoxifizierung des stark toxischen freien Al^{3+} bereits vor der Aufnahme durch die Wurzel interpretiert werden. Allerdings waren Al-Aufnahme und -Verlagerung bei Angebot von komplexiertem Al im Vergleich zu monomerem Al bei der Hortensie anders als beim Al-Akkumulator Buchweizen (Ma und Hiradate, 2000) oder dem Al-sensitiven, Al-Exkluder Mais (Bartlett und Riego, 1972) nicht vermindert. Möglicherweise exsudiert die Hortensie bei Angebot von monomerem Al ausreichend organische Säureanionen und kann diese Al-Komplexe im Unterschied zu den anderen

Pflanzenarten auch aufnehmen. Eine Al-Aufnahme ausschließlich in komplexierter Form würde erklären, weshalb bei Angebot von Al-Chlorid, -Malat und -Citrat die gleiche Al-Menge aufgenommen wurde. Die oben beschriebenen Unterschiede der drei Pflanzenarten bei der Aufnahme von komplexiertem Al im Vergleich zu monomerem Al können auf unterschiedlicher Ladung der Komplexe beruhen, insbesondere wenn verschiedene organischen Säuren verglichen werden. Bei Buchweizen wurde zum Beispiel Al-Oxalat angeboten. Außerdem kann sich die Permeabilität der Zellwände und Membranen unterschiedlicher Pflanzenarten für Al-Komplexe mit derselben Ladung unterscheiden. Da wesentlich Al-empfindlichere Pflanzenarten ähnliche Exsudationsraten für organische Säureanionen aufweisen, ist davon auszugehen, daß für die Al-Toleranz der Hortensie nicht allein die Menge der exsudierten organischen Säureanionen entscheidend ist. Von maßgeblicher Bedeutung für die Al-Toleranz dürfte die Al-Verlagerung in die Vakuolen von Wurzelzellen sein, wodurch eine niedrige Al-Konzentration im Cytoplasma und somit eine geringe Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels gewährleistet werden kann. Auch der schnelle Weitertransport von Al in den Zentralzylinder und den Sproß könnte dazu beitragen, die Al-Gehalte in der Wurzel und speziell in der bei anderen Pflanzenarten als besonders Al-empfindlich charakterisierten Wurzelspitze möglichst niedrig zu halten. Tatsächlich wies die Al-sensitive Pflanzenart Mais nach 4tägigem Angebot von 25 μM Al mit $0,3 \mu\text{g}$ (1 cm Wurzelspitze)⁻¹ (Collet, 2001) einen höheren Al-Gehalt auf als Hortensie mit $0,2 \mu\text{g}$ (1 cm Wurzelspitze)⁻¹ nach 7tätiger Behandlung (Abb. 3.32A).

Der Al-Transport von der Wurzel in den Sproß erfolgt in hoher Konzentration im Xylem, höchstwahrscheinlich komplexiert mit organischen Säureanionen. Die größte Rolle spielt hierbei wahrscheinlich die Komplexierung mit Citrat, gefolgt von Malonat und Malat. Bei einem pH-Wert um 6 im Xylemsaft können organische Säuren zur Löslichkeit von Al beitragen, indem sie die Ausfällung von $\text{Al}(\text{OH})_3$ verhindern. Nach 2tägigem Angebot von 500 μM Al in der Nährlösung wurden im Xylemsaft zum Teil ähnliche Al-Konzentrationen und zum Teil sogar eine Aufkonzentrierung um bis zu 35 % nachgewiesen. Eine solche Aufkonzentrierung wäre denkbar, wenn Wasser mit schnellerer Rate aus den Xylemgefäßen austräte als Al. Dann wäre vor allem in sich verjüngenden Xylemgefäßen und bei starker Transpiration eine Al-Akkumulation zu erwarten (Canny, 1995). Tatsächlich akkumulierte Al nach 2- bis 15tägigem Angebot in den apikalen Blättern der Pflanze, die sich verjüngende Gefäße besitzen und deren Transpirationsrate hoch ist. Durch experimentelle Variation der Transpirationsrate

konnte die Vermutung, daß die Transpiration die treibende Kraft für die Al-Verlagerung in der Hortensie ist, erhärtet werden. Zur außergewöhnlich hohen Al-Akkumulation im Sproß der Hortensie könnte eine mangelhafte Transpirationskontrolle von Blättern phylogenetisch ursprünglicher Pflanzen beitragen (vergl. Köhl *et al.*, 1996).

Die Al-Verteilung im Pflanzengewebe wird anscheinend hauptsächlich durch den Al-Eintrag mit dem Xylemstrom bestimmt. Al-Gewebegehalte wären somit wie bei dem Al-Akkumulator Buchweizen (Shen und Ma, 2001) abhängig von der Dauer des Xylemeinstroms (Blattalter), dessen Stärke (Transpirationsrate) und von der Wachstumsrate des Gewebes. Die beobachteten niedrigeren Al-Gehalte in Sepalen verglichen mit apikalen Blättern sind demnach auf die spätere Entwicklung der Blütenstände und die somit kürzere Einstromdauer und auf die noch bis kurz vor der Ernte hohen Wachstumsraten zurückzuführen. Die Vermutung, die frühe Entwicklungsphase der Blütenstände könnte eine besondere Bedeutung für die Al-Verlagerung haben, wurde nicht bestätigt. In jungen genauso wie in alten Blütenständen glich die aufgenommene Al-Menge nur die wachstumsbedingte Verdünnung aus, so daß die Al-Gehalte unabhängig von der Entwicklungsphase konstant blieben. Trotzdem ist zur Verminderung des Risikos bei der Blaufärbung eine kontinuierlich hohe Al-Verfügbarkeit ab Beginn der Treiberei sicherlich empfehlenswert, damit die Al-Aufnahme über einen möglichst langen Zeitraum erfolgen kann. Je besser die Al-Verfügbarkeit gesteuert wird und dabei rhizotoxische Al- und Protonenkonzentrationen vermieden werden können, in desto kürzerer Zeit sollte eine für gute Blaufärbung ausreichende Al-Menge in die Sepalen verlagert werden. Diese Hypothese läßt sich aus der Beobachtung ableiten, daß in Nährlösungskultur eine zufriedenstellende Blaufärbung bereits nach einem nur 10tägigem Angebot von 500 μM Al bei einem pH-Wert von 4,3 erreicht werden konnte. Durch Ringelung des Sprosses unterhalb der Blütenstände konnte gezeigt werden, daß der Al-Transport im Phloem in die Blütenstände, wenn überhaupt, höchstens eine untergeordnete Rolle spielt.

Spätestens bei Übergang aus dem Xylem in den Blattapoplasten und der bei dortiger Akkumulation unvermeidlichen Aufnahme in den Symplast von Mesophyll und Epidermis sollte sich der Transport von Al im Komplex mit organischen Säureanionen durch die schwächer cytotoxischen Eigenschaften im Vergleich zu monomerem Al positiv auswirken. In der vorliegenden Arbeit gelang erstmals ein direkter Nachweis für die Al-Verlagerung in Vakuolen von Hortensien durch die Gewinnung von

Vakuoleninhalt aus Subepidermiszellen von blauen Sepalen und die Bestimmung der Al-Konzentration mittels EDX-Analyse. Die blaue Farbe des extrahierten Vakuoleninhalts ist auf das Vorliegen von Al im Komplex mit dem Sepalenfarbstoff Delphinidin (Takeda *et al.*, 1985; 1990) zurückzuführen. Ebenso wie in Sepalen und Wurzel erfolgt wahrscheinlich in Blättern eine Al-Verlagerung in die Vakuolen von Epidermis- und Mesophyllzellen, wobei hier eher von einer Komplexierung mit Citrat auszugehen ist. Diese Annahme beruht auf Untersuchungen von Ma *et al.* (1997), die durch Bestimmung der Konzentrationen von Al und Citrat in Blattpreßsäften sowie NMR-Untersuchungen von intakten Blättern und Blattpreßsaft Hinweise für die Bildung eines 1:1 Al-Citrat-Komplexes fanden. Eine Verlagerung von Al in die Vakuole durch endocytotischen Transport ist zwar theoretisch denkbar, jedoch sprechen die vermutlich hohen Al-Konzentrationen in der Zellwand und die nachweislich hohen Al-Konzentrationen in der Vakuole dafür, daß aufgrund der hohen Konzentrationsgradienten eine Al-Aufnahme in das Cytoplasma stattfinden muß. Wenngleich bei dem etwa neutralen pH-Wert des Cytoplasmas die Konzentration an freiem Al^{3+} aufgrund der Bildung von unlöslichem $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Gibbsit) unter 10^{-10} M liegen sollte, wäre auch eine solche niedrige Konzentration als phytotoxisch einzustufen (Martin, 1986; Ma *et al.*, 2001). Da die Stabilitätskonstanten für den Al-Citrat-Komplex größer als für den Al-ATP-Komplex sind, könnte eine hohe Citratkonzentration die freie Al^{3+} -Konzentration im Cytoplasma so effektiv reduzieren, daß der Zellstoffwechsel nicht beeinträchtigt wird (Ma *et al.*, 2001).

Die Versuchsergebnisse sprechen dafür, daß Sortenunterschiede in der Blaufärbbarkeit der Sepalen auf sortenspezifischer Beeinflussung des Substrat-pH-Werts, z. B. durch Ausscheidung von organischen Säureanionen, und somit der Al-Verfügbarkeit beruhen können. Auch bei gleicher Al-Verfügbarkeit kann Al in Pflanzen verschiedener Sorten unterschiedlich stark aufgenommen und verlagert werden. Außerdem können sich Sorten in ihrer Blaufärbung bei gleichen Al-Gehalten der Sepalen unterscheiden. Die sortenspezifische Blaufärbbarkeit wird durch die Form des Blütenstands und wahrscheinlich durch die Al-Resistenz der Wurzeln bzw. das Sproßwachstum und die P-Verlagerung in die Sepalen beeinflusst. Dabei scheint Faktoren, die die Al-Aufnahme durch die Wurzel beeinflussen, eine größere Bedeutung zuzukommen als der Fähigkeit zur Verlagerung in der Pflanze. Ein Al-Gehalt von über 1 mg (g TS)^{-1} reichte bei allen Sorten mindestens für eine zufriedenstellende Blaufärbung aus. Die Fähigkeit zur Synthese ausreichender Mengen an Citrat spielt offenbar keine Rolle für die bessere Al-

Verlagerung und Blaufärbung der Sorte 'Renate Steiniger' im Vergleich zu 'Blauer Ball'. Die niedrigere Malonatkonzentration im Xylemsaft von 'Blauer Ball' als von 'Renate Steiniger' und 'Adria' spricht dafür, daß Malonat als Ursache für Sortenunterschiede bei der Al-Verlagerung im Xylem in Frage kommt.

Die praxisnahen Versuche in Substratkultur mit verschiedenen Hortensiensorten zeigten, daß sich eine vor Kulturbeginn ermittelte Al-Pufferkurve gut zur Abschätzung der Al-Sulfatmenge eignet, die zur Absenkung des pH-Werts im Substrat benötigt wird. Kontrollen des Substrat-pH-Werts im Kulturverlauf sind empfehlenswert. In Substraten mit ausreichender Pufferkapazität führte eine Absenkung des Substrat-pH-Werts auf 4,5 bis 4,2 durch Behandlung mit 5 bis 12 g $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{H}_2\text{O}$ (L Substrat)⁻¹ bei fast allen Sorten mindestens zu zufriedenstellender, im allgemeinen zu guter bis sehr guter Blaufärbung und guter Pflanzenqualität. Ein Substrat mit entsprechender Pufferkapazität ist folglich empfehlenswert. Bei einem Substrat mit geringer Al-Pufferkapazität, bei dem eine Al-Behandlung von weniger als 4 g $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{H}_2\text{O}$ (L Substrat)⁻¹ zu einer pH-Wertabsenkung unter 4,0 führte, konnte eine Verbesserung der Blaufärbung nur durch ein höheres Al-Angebot und eine Absenkung des pH-Werts auf 3,8 erzielt werden. Allerdings nimmt bei so niedrigen pH-Werten die Gefahr von Wurzelschäden durch Protonentoxizität zu. Es ist zu vermuten, daß eine Anhebung des pH-Werts der Al-Sulfatlösung auf 4,0 bis 4,3 eine geringere pH-Wert Absenkung des Substrats bewirken würde. Das würde geringere Protonentoxizität bedeuten und zu besserer Pflanzenqualität führen. Eine solche Einstellung des pH-Werts der Al-Lösung auf 4,0 wird zum Beispiel bei der Blaufärbung von Hortensien nach dem „Wolbecker System“ empfohlen (Richter, 2000).

Aus der vorliegenden Arbeit ergeben sich zahlreiche Ideen für weiterführende Untersuchungen. Erste Untersuchungen mittels EDX-Analyse haben ergeben, daß die Al-Bestimmung in Wurzel und Sproß aufgrund der hohen Al-Gewebegehalte, die auch unter praxisüblichen Kulturbedingung zur Produktion blauer Hortensien erzielt werden, möglich ist. Anders als bei nicht Al akkumulierenden Pflanzen müssen hier nicht „unnatürlich“ hohe Al-Konzentrationen eingesetzt werden, um Al-Gehalte oberhalb der Nachweisgrenze zu erreichen. Die Hortensie ist deshalb ein vielversprechendes System zur differenzierten Untersuchung der Kinetik der Al-Verlagerung in der Wurzel. Um eine Al-Verlagerung während der Präparation auszuschließen, sollte schockgefrorenes Pflanzenmaterial verwendet werden. Möglicherweise erweist sich die Hortensie sogar

als geeignetes System um apoplastischen von symplastischem Al-Transport zu unterscheiden. Auch die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie in Kombination mit Al-spezifischen Farbstoffen sollte bei der Untersuchung der Al-Aufnahme und -Verlagerung in der Wurzel von Nutzen sein. Wichtig wäre zu klären, wie relevant apoplastischer Al-Transport von der Rhizodermis bis in den Zentralzylinder, insbesondere in der Wurzelspitze, für die Al-Verlagerung in den Sproß ist.

Trotz der außergewöhnlichen Al-Toleranz der Hortensie waren nach Al-Behandlung ganz ähnliche morphologische Wurzelveränderungen zu beobachten, wie bei wesentlich Al-sensitiveren Pflanzenarten bereits bei geringeren Al-Konzentrationen auftreten. Das gibt Anlaß zu der Vermutung, daß an Al-Akkumulatoren gewonnene Erkenntnisse über die toxische Wirkung von Al in stärkerem Maß zum besseren Verständnis der Al-Toxizität bei anderen Pflanzenarten beitragen könnten, als bisher angenommen.

Die selbst in Nährlösungskultur oft beobachtete starke Anhäufung von Wurzelhaubenzellen legt die Vermutung nahe, daß Mucilage und Wurzelhaubenzellen, wie bei anderen Pflanzenarten beobachtet (Horst *et al.*, 1982; Ryan *et al.*, 1993; Miyasaka und Hawes, 2001), einen Beitrag zur Al-Resistenz der Hortensie leisten. Dieser könnte einerseits in einer Akkumulation von Al im Mucilage und dadurch verminderter Al-Verlagerung in die Wurzel bestehen oder andererseits die Wirksamkeit der exsudierten organischen Säuren erhöhen, indem eine schnelle Verdünnung durch Diffusion verhindert und der Abbau durch Mikroorganismen erschwert werden.

Auch die Induktion von Phenolen durch Al wird zunehmend als Resistenzmechanismus diskutiert. Catechine wurden z. B. mit der Detoxifizierung von Al in Teeblättern (*Camellia sinensis*) und in Wurzelexsudaten bei Mais in Verbindung gebracht (Nagata *et al.*, 1992; 1993; Kidd *et al.*, 2001). Eine Al-induzierte Lignifizierung von Zellwänden in den äußeren Zellschichten des Cortex bei Weizen beobachteten zum Beispiel Sasaki *et al.* (1996; 1997). Sowohl aufgrund der nach Al-Behandlung beobachteten näher an der Wurzelspitze beginnenden Zellstreckung als auch durch direkte Al-Induktion wäre eine stärkere und näher hinter der Wurzelspitze auftretende Lignifizierung denkbar. Eine solche Lignifizierung könnte die Permeabilität der Zellwände vermindern. Sie ließe sich mikroskopisch im UV-Licht aufgrund der starken Autofluoreszenz einfach erkennen.

Da viele Hinweise für einen entscheidenden Einfluß der Transpiration auf die Al-Verlagerung in der Hortensie sprechen, würden weitere Versuche in dieser Richtung

sicherlich zum besseren Verständnis der Al-Verlagerung beitragen. Insbesondere Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen zum Einfluß der bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit veränderten Transpirationsrate auf die Al-Verlagerung wären sicher aufschlußreich. Möglicherweise spielt die Transpirationsrate auch eine Rolle für sorten- und gewebespezifische (Sepalen/Blätter) Unterschiede in der Al-Verlagerung.

Zur Identifizierung der im Xylemsaft verlagerten Al-Spezies schlägt Busch (2001) eine Fraktionierung mittels ionenchromatographischer Auftrennung und Bestimmung der Liganden mittels Elektrospray Interface Massenspektrometrie oder mittels HPLC (2.3.9) vor.

Als mögliche Liganden von Al im Vakuolensaft von Blättern kommen organische Säuren, insbesondere Citrat, in Betracht. Die Konzentration organischer Säuren sollte in extrahiertem Vakuolensaft mittels spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe und bildanalytischer Methoden quantifizierbar sein.

Neben unterschiedlichen Al-Gehalten der Sepalen könnten für die Sortenunterschiede in der Blaufärbbarkeit der Gehalt an Delphinidin und anderen roten Farbstoffen, die mit Al keinen blauen Komplex bilden, eine Rolle spielen. Auch eine unterschiedliche Anzahl an Farbstoff enthaltenden Zellschichten könnte die Blaufärbbarkeit verschiedener Sorten beeinflussen.

Für die Produktion von Hortensienpflanzen mit erstklassiger Blaufärbung und Pflanzenqualität sind folgende Richtwerte von Interesse: 1. Welche Mindestmengen an Al bzw. welche Pufferkapazität des Substrats sind für eine erfolgreiche Blaufärbung bei guter Al-Verfügbarkeit (Substrat-pH-Wert ca. 4,3) erforderlich? 2. Mit welcher Al-Menge bzw. bei welcher Pufferkapazität des Substrats läßt sich die beste Pflanzenqualität produzieren? Beide Fragen können durch Steigerung der Al-Pufferkapazität eines Substrats durch Erhöhung des Kalkgehalts und anschließende Absenkung des Substrat-pH-Werts auf 4,3 mittels entsprechender Al-Sulfatbehandlung im Kulturverlauf beantwortet werden.

Außerdem stellt sich die Frage, inwieweit durch eine Anhebung des pH-Werts in der Al-Sulfatlösung auf 4,0 bis 4,3 die starke Absenkung des Substrat-pH-Werts vermindert wird. Eine geringere Absenkung des Substrat-pH-Werts durch definierte Al-Sulfatgaben wäre insbesondere bei Substraten mit geringer Pufferkapazität wünschenswert. Zu überprüfen wäre des weiteren, ob eine Anhebung des pH-Werts in der Al-Sulfatlösung

auch bei Substraten mit hoher Pufferkapazität sinnvoll ist. Hier besteht die Gefahr, daß bei ungenügender Absenkung eines hohen Substrat-pH-Werts das Al nach der Al-Behandlung schnell ausfällt und auch bei häufiger Al-Behandlung eine ausreichende Al-Verfügbarkeit nicht für eine ausreichende Zeitdauer gewährleistet werden kann.

Da in Nährlösungskultur eine Blaufärbung in deutlich kürzerer Zeit als in Substratkultur zu erreichen war, wäre zu klären, wie dies auch in Substrat möglich wird. Wenn eine geringere Al-Verfügbarkeit im Substrat die Ursache ist, könnte eine gleichmäßigere Al-Verteilung im Topf eine Verbesserung der Al-Aufnahme bewirken. Aufgrund der geringen Mobilität von Al im Substrat ist es denkbar, daß sich durch wiederholtes Tauchen in einer 500 μM Al-Lösung mit einem pH-Wert von 4,3 eine bessere Al-Verteilung im Topf erzielen ließe als durch Gießen der Al-Lösung von oben in den Topf oder durch Al-Zufuhr mittels Anstaubewässerung von unten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Hortensie (*Hydrangea macrophylla*) ist im Vergleich zu anderen Pflanzenarten außergewöhnlich Al-resistent. Bei entsprechender Al-Verfügbarkeit verlagert diese Al-Akkumulatorpflanze große Al-Mengen in den Sproß und die Blütenstände. Deren Blaufärbbarkeit durch Komplexbildung des ursprünglich rosa Farbstoffs Delphinidin mit Al trägt entscheidend zum ökonomischen Wert dieser Zierpflanze bei. Schwierigkeiten bei der Blaufärbung beruhen darauf, daß nur pH-Werte zwischen 4,7 und 4,0 im Substrat eine gute Al-Verfügbarkeit, Blaufärbung und Pflanzenqualität gewährleisten. Die erforderlichen Al-Sulfatmengen zur Absenkung des pH-Werts können jedoch je nach Al-Pufferkapazität des Substrats sehr unterschiedlich sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden Al-Aufnahme und -Verlagerung bei der Hortensie in Beziehung zu Blaufärbung und Al-Toleranz untersucht. Ein besseres Verständnis dieser Zusammenhänge sollte zum einen das Risiko bei der Produktion blauer Hortensien vermindern und zum anderen neue Möglichkeiten bei der Züchtung Al-resistenter Nutzpflanzen eröffnen. Die folgende Unterteilung dieser Zusammenfassung entspricht den acht Versuchskomplexen der vorliegenden Arbeit. Die Numerierung erlaubt die Zuordnung zu den Versuchsdurchführungen (2.2.1* - 2.2.8*), Ergebnissen (3.1* - 3.8*) und Diskussionen (4.1* - 4.8*) der acht Versuchskomplexe.

1* In praxisnahen Substratkulturversuchen mit verschiedenen Hortensiensorten konnte gezeigt werden, daß sich die zur Absenkung des pH-Werts im Substrat benötigte Al-Sulfatmenge vor Kulturbeginn mit einer Al-Pufferkurve abschätzen läßt. Nach der Behandlung mit definierten Al-Sulfatmengen wurden die angestrebten pH-Werte im Substrat gemittelt über die Sorten um 0,3 bis 0,4 pH-Werteinheiten übertroffen. Durch eine pH-Wert-Kontrolle über alle Sorten im Kulturverlauf (z. B. vor Beginn der Treiberei) ist eine solche Abweichung rechtzeitig erkennbar und läßt sich durch Anpassung der Al-Behandlung leicht korrigieren. Alle Sorten erreichten bei dem höchsten Al-Sulfatangebot von 12 g (L Substrat)⁻¹ und einem sortenspezifisch unterschiedlichen Substrat-pH-Wert zwischen 4,1 und 4,7 eine zufriedenstellende Blaufärbung. Dabei gewährleisteten Al-Gehalte über 1 mg (g TS)⁻¹ in den Sepalen bei allen Sorten eine zufriedenstellende oder bessere Blaufärbung. Zur Bewertung der Blaufärbung eigneten sich die Methoden Farbbonitur und Farbmessung. In diesem und ähnlichen Versuchen erwies sich eine Absenkung des Substrat-pH-Werts auf 4,5 bis 4,3 durch Al-Behandlungen mit 5 bis 12 g Al₂(SO₄)₃ x 18 H₂O

(L Substrat)⁻¹ für verschiedene Sorten als geeignet, um eine gute Blaufärbung und Pflanzenqualität zu erzielen. Das Substrat sollte eine ausreichende Al-Pufferkapazität aufweisen. Mit besonders leicht blau zu färbenden Hortensiensorten wie 'LK 15', 'Blaumeise' und 'Renate Steiniger' war eine zufriedenstellende Blaufärbung bei ausreichendem Al-Angebot bereits bei höheren pH-Werten von bis zu 5,0 erreichbar. Um eine optimale Färbung von bekanntlich schwierig zu bläuenden Sorten wie 'Blauer Ball' sicherzustellen, ist eine sortenspezifische Kontrolle des Substrat-pH-Werts empfehlenswert. Bei geringer Al-Pufferkapazität des Substrats und Al-Angebot von weniger als 4 g Al₂(SO₄)₃ x 18 H₂O (L Substrat)⁻¹ konnte durch Erhöhung des Al-Angebots und stärkere Absenkung des Substrat-pH-Werts auf 3,8 eine Verbesserung der Blaufärbung erzielt werden. Allerdings erhöht sich bei so niedrigen Substrat-pH-Werten das Risiko von Wurzelschäden.

Die bei dem höchsten Al-Sulfatangebot von 12 g beobachtete 14 %ige Verminderung des Frischgewichts im Vergleich zur Kontrolle war vor allem auf induzierten Ca-Mangel zurückzuführen. Bei geringem bis mittelmäßigem Sproßwachstum bzw. entsprechender Al-Resistenz scheint eine positive Korrelation zur Blaufärbung der Sepalen zu bestehen. Besonders niedrige Al-Gehalte in den Sepalen bei besonders hohem Wachstum bzw. hoher Al-Resistenz deuten darauf hin, daß eine Al-bedingte Schädigung der Wurzel Voraussetzung für die Al-Aufnahme sein könnte. Sie ließen sich jedoch auch allein auf einen wachstumsbedingten Verdünnungseffekt zurückführen.

Für die Al-Verlagerung in der Hortensie ist der Al-Transport im Xylem von entscheidender Bedeutung. Dies zeigten erstens die hohen Al-Konzentrationen im Xylemsaft von bis zu 0,57 mM nach Al-Behandlung des Substrats. Zweitens ähnelte das relative Verhältnis der Al-Konzentrationen der drei Sorten bei unterschiedlichem Al-Angebot in zur Blütezeit gesammelten Xylemsäften stark den Al-Gehalten der Sepalen, die das Ergebnis der gesamten Vegetationsperiode sind. Nach Berechnungen mit GEOCHEM-PC liegt Al im Xylemsaft im Komplex mit organischen Säuren vor. Dabei scheint Citrat die größte Bedeutung zuzukommen, gefolgt von Malonat und Malat. Nach ionenchromatographischen Spezierungen (Busch 2001) lag die Konzentration an freiem Al³⁺ in Xylemsäften auch nach Al-Behandlung der Pflanzen in der Nähe der Nachweisgrenze. Der Anteil positiv geladener und neutraler Al-Ligand-Systeme betrug höchstens 10 % der gesamten

Al-Konzentration, wobei die Ergebnisse auf das Vorliegen eines neutralen Al-Citrat-Komplexes hindeuten. Durchschnittlich mehr als 50 % lagen als Al-Ligand-Systeme mit einer Ladung zwischen 0 und -1 vor. Höher negativ geladene Spezies spielten mit weniger als 5 % eine untergeordnete Rolle.

Sortenunterschiede in der Blaufärbbarkeit der Sepalen können auf sortenspezifischer Beeinflussung des Substrat-pH-Werts, z. B. durch Exsudation organischer Säureanionen, und somit der Al-Verfügbarkeit beruhen. Auch bei gleicher Al-Verfügbarkeit kann die Al-Verlagerung in der Pflanze bei verschiedenen Sorten unterschiedlich sein. Zudem können sich Sorten bei gleichen Al-Gehalten der Sepalen in ihrer Blaufärbung unterscheiden. Faktoren, die die Al-Aufnahme durch die Wurzel beeinflussen, spielen insgesamt anscheinend eine größere Rolle für die Blaufärbung als die Fähigkeit zur Verlagerung in der Pflanze. Die deutlich schlechtere Blaufärbung der Sorte 'Blauer Ball' im Vergleich zu 'LK 15' und 'Renate Steiniger' ließ sich zum großen Teil auf den bei gleichem Al-Angebot höheren Substrat-pH-Wert und die dadurch geringere Al-Verfügbarkeit zurückführen. Die trotz niedrigem Substrat-pH-Wert unterdurchschnittliche Al-Verlagerung in die Sepalen und Blaufärbbarkeit der Sorte 'Elbtal' scheint hingegen mit dem überdurchschnittlichen Frischgewicht dieser Sorte zusammenzuhängen. Als Ursache wären eine besonders hohe Al-Resistenz verbunden mit geringer Al-Aufnahme oder -Verlagerung bzw. ein wachstumsbedingter Verdünnungseffekt denkbar. Während für Sortenunterschiede bei der Al-Verlagerung im Xylemsaft die Fähigkeit zur Synthese ausreichender Citratmengen offenbar keine Rolle spielt, kommen Unterschiede in der Malonatkonzentration hingegen als Ursache in Betracht. Die trotz ihres besonders hohen Al-Gehalts nur mittelmäßige Blaufärbung der Sorte 'Adria' könnte eine Folge des hohen P-Gehalts in den Sepalen sein und auf der Konkurrenz zwischen Phosphat und Delphinidin um die Bindung mit Al beruhen. Die beiden Tellerhortensiensorten 'Bläuling' und 'Blaumeise' wiesen nach der Ballhortensien-sorten 'Adria' die höchsten Al-Gehalte auf. Möglicherweise erfolgt bei Tellerhortensien aufgrund der geringeren Anzahl an Sepalen eine stärkere Al-Akkumulation als bei Ballsorten.

- 2* Trotz der außergewöhnlichen Al-Resistenz der Hortensie führte eine 3tägige Behandlung mit 500 μM AlCl_3 zu ähnlichen morphologischen Veränderungen an Wurzelspitzen, wie bei Al-empfindlicheren Pflanzen bereits bei niedrigeren Al-

Konzentrationen oder nach kürzerer Behandlungsdauer zu beobachten waren. Die Zellen im Randbereich der Wurzelspitze waren erheblich vergrößert. Die Zellstreckung begann in geringerer Entfernung von der Wurzelspitze. Anzahl und Größe von Vakuolen und Vesikeln nahmen in den äußeren Zellschichten der Wurzelspitze deutlich zu. In diesen Vesikeln und Vakuolen waren nach Al-Behandlung der Wurzeln häufiger und größere elektronendichte Strukturen erkennbar, in denen nur nach Al-Behandlung Al, P und S mittels EELS und ESI nachgewiesen werden konnte. Al-Verlagerung in die Vakuole dürfte entscheidend zur Al-Toleranz der Hortensie beitragen.

- 3* Die Versuchsergebnisse unterstützen die Hypothese, daß Al-Toxizität durch Komplexierung mit organischen Säureanionen vermindert wird, und zwar aufgrund der höheren Komplexbildungskonstante durch Citrat in stärkerem Maß als durch Malat. Der Kallosegehalt der Wurzelspitzen war dementsprechend bei Angebot von Al-Malat tendenziell und von Al-Citrat deutlich niedriger als bei Angebot von Al-Chlorid. In scheinbarem Widerspruch zur Hypothese führte die 2tägige Behandlung mit Al-Malat (pH 4,3) und Al-Citrat (pH 4,3) im Vergleich zu Al-Chlorid nicht zu stärkerem Wurzelwachstum. Allerdings ließ sich eine Hemmung des Wurzelwachstums durch 500 µM AlCl₃ nach 2 Tagen generell noch nicht nachweisen.

Konträr zu bisherigen Untersuchungen an anderen Pflanzenarten führte ein Angebot von Al in Form von Chlorid, Malat oder Citrat bei niedrigem pH-Wert (4,3) weder zu unterschiedlichen Al-Gehalten des gesamten Wurzelsystems noch zu unterschiedlicher Al-Verlagerung in die Sprosse der Hortensie. Bei Angebot von Al-Malat und einem pH-Wert von 6,0 waren die Al-Gehalte in der Wurzelspitze und dem gesamten Wurzelsystem deutlich höher als bei niedrigerem pH-Wert. Auch die Kallosegehalte der Wurzelspitze lagen dementsprechend deutlich höher. Erstaunlicherweise war das Wurzelwachstum jedoch verdoppelt, und die Al-Verlagerung in den Sproß betrug nur ca. ein Drittel. Eine signifikant erhöhte Al-Konzentration im Xylemsaft bei Angebot von Al-Malat (pH 4,3) und geringfügig erhöhte Malatkonzentrationen bei Al-Malatangebot und pH-Werten von 4,3 sowie 6,0 sprechen für eine Beteiligung von Malat an der Al-Aufnahme bzw. -Verlagerung im Xylemsaft. Allerdings scheint die Hortensie in der Lage zu sein, ausreichende Mengen an Malat selbst zu produzieren. Ein Angebot von Al-Citrat beeinflusste hingegen weder die Al- noch die Citratkonzentration im Xylemsaft.

Es wurde eine Al-Akkumulation in der Sproßspitze beobachtet, die bei der Sorte 'Renate Steiniger' stärker als bei 'Blauer Ball' ausfiel.

- 4* Eine Induktion von Al-Resistenz konnte kurzfristig (24 h) durch Vorbehandlung mit einer niedrigen Al-Konzentration (25 und 50 μM) erzielt werden. Dafür sprachen die geringeren Kallosegehalte in den vorbehandelten Wurzelspitzen nach 24stündigem, hohem Al-Angebot. Langfristig führte die Vorbehandlung jedoch nicht zu einer Verbesserung des Wurzelwachstums. Weder nach 4 noch nach 7 Tagen hohem Al-Angebot konnte mittels Wurzelwachstums eine Erhöhung der Resistenz durch die Vorbehandlung nachgewiesen werden.
- 5* Für eine Beteiligung der organischen Säureanionen Citrat und Malat an der Detoxifizierung von Al spricht die Erhöhung ihrer Exsudationsraten nach Al-Behandlung der Wurzel. Zur außergewöhnlichen Al-Resistenz der Hortensie müssen jedoch weitere Mechanismen beitragen, da wesentlich Al-empfindlichere Pflanzenarten ähnliche Exsudationsraten aufweisen.
- 6* Verantwortlich für die leichte Blaufärbbarkeit der Sorte 'Renate Steiniger' ist ihre Eigenschaft, schneller große Al-Mengen in die Sepalen verlagern zu können als 'Adria'. Die wesentlich schlechtere Blaufärbbarkeit von 'Blauer Ball' ist auf die schlechtere Verlagerung von Al in den Sproß und die Sepalen zurückzuführen, auch bei identischem pH-Wert und identischer Al-Verfügbarkeit in der Nährlösung. Eine besonders starke Akkumulation fand in der Regel in den apikalen Blättern statt. Auch innerhalb einer Sorte bestanden große Unterschiede zwischen Einzelpflanzen bei der Al-Verlagerung innerhalb der Pflanze. In Nährlösungskultur erfolgte die Al-Verlagerung in die Sepalen und die Blaufärbung der Sepalen deutlich schneller als in Substratkultur. Wahrscheinlich ist hierfür die bessere Al-Verfügbarkeit in Nährlösung aufgrund des konstant niedrigen pH-Werts verantwortlich.
- 7* Die Al-Verlagerung in die Blütenstände war unabhängig von ihrem Entwicklungszustand. Wichtig für gute Blaufärbung scheint eine kontinuierlich hohe Al-Verfügbarkeit ab Beginn der Treiberei zu sein, damit die Al-Aufnahme über einen möglichst langen Zeitraum erfolgen kann. Durch Dampfriegelung des Sprosses unterhalb des Blütenstands konnte die Hypothese erhärtet werden, daß Al vorwiegend im Xylemsaft in die Sepalen transportiert wird und Phloemtransport höchstens eine untergeordnete Rolle spielt. Die Transpiration beeinflusste die Al-Verlagerung in die Blütenstände. Die Al-Akkumulation in den Sepalen könnte die

Konsequenz einer hohen Transpirationsrate und folglich hohen Wasseraufnahme sein.

- 8* Abschließend wurden Untersuchungen zur Lokalisierung des Farbstoffs Delphinidin und von Al in Sepalen durchgeführt. Voruntersuchungen mittels Energiedispersiver Röntgenmikroanalyse ergaben Hinweise für eine Al-Akkumulation in adaxialen Subepidermiszellen. Auch das Vorkommen des Sepalenfarbstoffs Delphinidin vorwiegend in dieser Zellschicht deutet auf ihre besondere Bedeutung für die Blaufärbung hin. Der mittels modifizierter Druckmeßsondentechnik extrahierte Vakuolensaft aus blauen Sepalen war sichtbar blau gefärbt. Es ist also davon auszugehen, daß die Entnahme des analysierten Vakuolensafts, wie beabsichtigt, vorwiegend aus Subepidermiszellen erfolgte. In blau gefärbtem, extrahiertem Vakuolensaft wurden mittels EDX-Analyse so hohe Konzentrationen an Al nachgewiesen, daß eine massive Al-Verlagerung in die Vakuole vorauszusetzen ist. Es ist zu vermuten, daß eine Kompartimentierung, wie sie in Vakuolen von Subepidermiszellen beobachtet wurde, auch im übrigen Sepalen- und Blattgewebe entscheidend zur außergewöhnlichen Al-Toleranz der Hortensie beiträgt. Die Al-Konzentrationen im Vakuolensaft waren signifikant positiv mit der Blaufärbung der Sepalen korreliert. Dabei wiesen Sepalen der Sorten 'Renate Steiniger' und 'Blauer Ball' mit ähnlicher Al-Konzentration auch eine ähnliche Blaufärbung auf. Die sortentypisch unterschiedliche Blaufärbung ist auf unterschiedliche Al-Verlagerung in die Sepalen und somit unterschiedliche Al-Gehalte zurückzuführen. Bei gleichem Al-Gesamtgewebegehalt scheinen Al-Verlagerung in die Vakuole und Blaufärbung der beiden Sorten identisch zu sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Überblick über die Kinetik der Al-Verlagerung in der Hortensie gewonnen werden. Die Al-Verlagerung von der Wurzel in den Sproß und die Blütenstände erfolgt hauptsächlich im Xylem, die Al-Verteilung in der Pflanze wird entscheidend durch die Transpiration bestimmt. Als wahrscheinliche Ursache für die außergewöhnliche Al-Toleranz der Hortensie wurden die Komplexierung mit organischen Säureanionen und die Al-Kompartimentierung in Vakuolen erkannt. Aufgrund der hohen Al-Toleranz und folglich hohen Al-Gewebegehalte stellt die Hortensie ein vielversprechendes System zur weitergehenden, differenzierten Untersuchung der Al-Kinetik dar, das den Einsatz von Untersuchungsmethoden wie z. B. EDX-Analyse erlaubt, die bei weniger Al-resistenten Pflanzen an der Nachweisempfindlichkeit der

verfügbaren Methoden scheitern. Ähnliche morphologische Veränderungen der Wurzelspitze nach Al-Behandlung nähren die Hoffnung, daß die bei der Hortensie gewonnenen Ergebnisse, insbesondere bezüglich der toxischen Wirkung von Al, in größerem Maße auf weniger Al-resistente Pflanzenarten übertragbar sind als bislang vermutet.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Akeson, M. A., Munns, D. N. (1989): Lipid bilayer permeation by neutral aluminum citrate and by three α -hydroxy carboxylic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 984, 200-206.
- Akeson, M., Munns, D. N. (1990): Uptake of aluminum into root cytoplasm: Predicted rates for important solution complexes. *J. Plant Nutr.* 13, 467-484.
- Allen, R. C. (1943): Influence of aluminum on the flower color of *Hydrangea macrophylla* DC. *Contr. Boyce Thomp. Inst.* 13, 221-242.
- Aniol, A. (1984): Induction of aluminum tolerance in wheat seedlings by low doses of aluminum in the nutrient solution. *Plant Physiol.* 75, 551-555.
- Aniol, A., Gustafson, J. P. (1984): Chromosome location of genes controlling aluminium tolerance in wheat, rye and triticale. *Can. J. Genet. Cytol.* 26, 701-705.
- Baluška, F., Vitha, S., Barlow, P. W., Volkmann, D. (1997): Rearrangement of F-actin arrays in growing cells of intact maize root apex tissues: a major developmental switch occurs in postmitotic transition region. *Eur. J. Cell. Biol.* 72, 113-121.
- Bartlett, R. J., Riego, D. C. (1972): Effect of chelation on the toxicity of aluminum. *Plant Soil* 37, 419-423.
- Baß, C., Kunz, U., Lehmann, H. (1997): Lokalisierung phenolischer Inhaltsstoffe in Teeblättern mit Hilfe der ESI/EELS-Technik. *Europ. J. Cell. Biol.* 74, Suppl. 45, 108.
- Basu, U., Godbold, D., Taylor, G. J. (1994a): Aluminum resistance in *Triticum aestivum* associated with enhanced exudation of malate. *J. Plant Physiol.* 144, 747-753.
- Basu, U., Basu, A., Taylor, G. J. (1994b): Differential exudation of polypeptides by roots of aluminum-resistant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. in response to aluminum stress. *Plant Physiol.* 106, 151-158.
- Basu, A., Basu, U., Taylor, G. J. (1994c): Induction of microsomal membrane proteins in roots of an aluminum-resistant cultivar of *Triticum aestivum* L. under conditions of aluminum stress. *Plant Physiol.* 104, 1007-1013.
- Basu, U., McDonald-Stephens, J. L., Archambault, D. J., Good, A. G., Briggs, K. G., Taing-Aung, Taylor, G. J. (1997): Genetic and physiological analysis of doubled-haploid, aluminium-resistant lines of wheat provide evidence for the involvement of a 23 kD, root exudate polypeptide in mediating resistance. *Plant Soil* 196, 283-288.
- Basu, U., Good, A. G., Taing Aung, Slaski, J. J., Basu, A., Briggs, K. G., Taylor, G. J. (1999): A 23-kDa, root exudate polypeptide co-segregates with aluminum resistance in *Triticum aestivum*. *Physiol. Plant.* 106, 53-61.
- Batley, N. H., Blackbourn, H. D. (1993): The control of exocytosis in plant cells. *New Phytol.* 125, 307-338.
- Bennet, R. J., Breen, C. M., Fey, M. V. (1985): The primary site of aluminium injury in the root of *Zea mays* L. *South Afric. J. Plant Soil* 2, 8-17.
- Blamey, F. P. C., Edmeades, D. C., Wheeler, D. M. (1990): Role of root cation-exchange capacity in differential aluminum tolerance of *Lotus* species. *J. Plant Nutr.* 13, 729-744.
- Blamey, F. P. C., Edmeades, D. C., Wheeler, D. M. (1992): Empirical models to approximate calcium and magnesium ameliorative effects and genetic differences in aluminium tolerance in wheat. *Plant Soil* 144, 281-287.
- Blamey, F. P. C., Asher, C. J., Edwards, D. C., Kerven, G. L. (1993a): *In vitro* evidence of aluminum effects on solution movement through root cell walls. *J. Plant Nutr.* 16, 555-562.
- Blamey, F. P. C., Asher, C. J., Kerven, G. L., Edwards, D. G. (1993b): Factors affecting aluminium sorption by calcium pectate. *Plant Soil* 149, 87-94.
- Blamey, F. P. C., Ostatek-Boczynski, Z., Kerven, G. L. (1997): Ligand effects on aluminium sorption by calcium pectate. *Plant Soil* 192, 269-275.
- Blancaflor, E. B., Jones, D. L., Gilroy, S. (1998): Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiol.* 118, 159-172.
- Bostrom, T. E., Gyory, A. Z., Benson, D. C., Horgan, E., Nockolds, C. E., Beck, F. X., Cockayne, D. J. H. (1988): Energy-dispersive X-ray microanalysis of air-dried microdroplets containing a macromolecular solute. *J. Microsc.* 149, 217-232.

- Britez, R. M., Reissmann, C. B., Silva, S. M., Athayde, S. F., Lima, R. S., de Quadros, R. M. B. (1997): Chemical characterization of two forests on the coastal plains of the Ilha do Mel, Paraná, Brazil. In: Plant nutrition – for sustainable food production and environment. Ando, T. *et al.* (Hrsg.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande. 461-462.
- Budíková, S. (1999): Structural changes and aluminium distribution in maize root tissues. *Biol. Planta* 42, 259-266.
- Büscher, P., Koedam, N., van Speybroeck, D. (1990): Cation-exchange properties and adaptation to soil acidity in bryophytes. *New Phytol.* 115, 177-186.
- Busch, J. (1822): Letter to the Secretary, April 2, 1821. *Trans. Hort. Soc. London* 4, 568-569.
- Busch, M. (2001): Ionenchromatographische Elementspeziesanalyse des Aluminiums - Grundlagen und Anwendung am Beispiel der Hortensie (*Hydrangea macrophylla*). Dissertation Universität Hannover.
- Canny, M. J. (1995): Apoplastic water and solute movement: New rules for an old space. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 215-236.
- Carroll, A. D., Moyon, C., van Kesteren, W. J. P., Tooke, F., Battey, N. H., Brownlee, C. (1998): Ca^{2+} , annexins, and GTP modulate exocytosis from maize root cap protoplasts. *Plant Cell* 10, 1267-1276.
- Chafe, S. C., Durzan, D. J. (1973): Tannin inclusions in cell suspension cultures of white spruce. *Planta* 113, 251-262.
- Chenery, E. M. (1937): The problem of the blue hydrangea. *J. Roy. Hort. Soc.* 62, 304-320.
- Chenery, E. M. (1948): Aluminium in plants and its relation to plant pigments. *Ann. Bot.* 12, 121-136.
- Chenery, E. M., Sporne, K. R. (1976): A note on the evolutionary status of aluminium-accumulators among dicotyledons. *New Phytol.* 76, 551-554.
- Clarkson, D. T. (1966): Aluminium tolerance in species within the genus *Agrostis*. *J. Ecol.* 54, 167-178.
- Clarkson, D. T. (1996): Root structure and sites of ion uptake. In: *Plant roots - The hidden half*. 2. Aufl. Waisel, Y. *et al.* (Hrsg.). Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong. 483-510.
- Collet, L. (2001): Screening maize (*Zea mays* L.) for aluminium resistance - Contribution to the selection for adaptation to acid soils. Dissertation Universität Hannover.
- Colombo, M. I., Lenhard, J., Mayorga, L., Beron, W., Hall, H., Stahl, P. D. (1994): Inhibition of endocytic transport by aluminum fluoride implicates GTPases as regulators of endocytosis. *Mol. Mem. Biol.* 11, 93-100.
- Cuenca, G., Herrera, R., Medina, E. (1990): Aluminium tolerance in trees of a tropical cloud forest. *Plant Soil* 125, 169-175.
- Cuenca, G., Herrera, R., Mérida, T. (1991): Distribution of aluminium in accumulator plants by X-ray microanalysis in *Richeria grandis* Vahl leaves from a cloud forest in Venezuela. *Plant Cell Environ.* 14, 437-441.
- Cumming, J. R., Tomsett, A. B. (1992): Metal tolerance in plants: Signal transduction and acclimation mechanisms. In: *Biogeochemistry of trace metals*. Adriano, D. C. (Hrsg.). Lewis Publ., Boca Raton. 329-364.
- Curtis, W. (1799): *Hydrangea hortensis*. *Garden hydrangea*. *Bot. Mag.* 13, 438.
- Degenhardt, J., Larsen, P. B., Howell, S. H., Kochian, L. V. (1998): Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant alr-104 is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiol.* 117, 19-27.
- de la Fuente, J. M., Ramírez-Rodríguez, V., Cabrera-Ponce, J. L., Herrera-Estrella, L. (1997): Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276, 1566-1568.
- Delhaize, E., Ryan, P. R. (1995): Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* 107, 315-321.
- Delhaize, E., Ryan, P. R., Randall, P. J. (1993): Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* 103, 695-702.

- Echlin, P. (1996a): A comparison between one non-invasive and three invasive procedures used in the preparation of plant material for X-ray microanalysis. In: *Microscopy and Microanalysis 1996*. Bailey, G. W. *et al.* (Hrsg.). San Francisco Press, San Francisco. 80-81.
- Echlin, P. (1996b): Distribution of aluminium in the cells of developing leaves of the tea plant as measured by low-temperature X-ray microanalysis. *Scanning* 18, 197-198.
- Echlin, P. (1999): Low-voltage energy-dispersive X-ray microanalysis of bulk biological materials. *Microsc. Microanal.* 4, 577-584.
- Enstone, D. E., Peterson, C. A. (1998): Effects of humid air on epidermal viability and suberin deposition in maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Cell Environ.* 21, 837-844.
- Fitschen, J. (1990): *Gehölzflora. Ein Buch zum Bestimmen der in Mitteleuropa wildwachsenden und angepflanzten Bäume und Sträucher*. Quelle & Meyer Verlag, Heidelberg, Wiesbaden. 9. Aufl.
- Fluri, M. (1909): Der Einfluß von Aluminiumsalzen auf das Protoplasma. *Flora* 99, 81-126.
- Foy, C. D., Chaney, R. L., White, M. C. (1978): The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 511-566.
- Franklin-Tong, V. E. (1999): Signaling and modulation of pollen tube growth. *Plant Cell* 11, 727-738.
- Frantzios, G., Galatis, B., Apostolakos, P. (2001): Aluminium effects on microtubule organization in dividing root-tip cells of *Triticum turgidum*. II. Cytokinetic cells. *J. Plant res.* 114, 157-170.
- Gierth, M. (2000): Untersuchungen zur Funktion der Exodermis von Gerstenwurzeln (*Hordeum vulgare* L. cv. Alexis) im Hinblick auf den radialen Transport anorganischer Ionen im Apoplasten. Dissertation Universität Hannover.
- Godbold, D. L., Fritz, E., Hüttermann, A. (1988): Aluminum toxicity and forest decline. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3888-3892.
- Götze, B.-R. (1982): Untersuchungen zur Morphologie und Funktion von Hortensienblüten unter züchterischem Aspekt. *Arch. Züchtungsforsch.* 12, 391-397.
- Grabski, S., Schindler, M. (1995): Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. *Plant Physiol.* 108, 897-901.
- Grauer, U. E., Horst, W. J. (1992): Modeling cation amelioration of aluminum phytotoxicity. *Soil Sci. Am. J.* 56, 166-172.
- Grimme, H., Lindhauer, M. G. (1989): The effect of Al and Mg on the transpiration rate of young maize plants. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 152, 453-454.
- Guérin, V. (1998): Hortensia: coloration des inflorescences et aluminium. *PHM Rev. Hort.* 388, 42-46.
- Haridasan, M. (1982): Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil. *Plant Soil* 65, 265-273.
- Haridasan, M., Paviani, T. I., Schiavini, I. (1986): Localization of aluminium in the leaves of some aluminium-accumulating species. *Plant Soil* 94, 435-437.
- Hartwell, B. L., Pember, F. R. (1918): The presence of aluminium as a reason for the difference in the effect of so-called acid soil on barley and rye. *Soil Sci.* 6, 259-279.
- Hauke, V., Schreiber, L. (1998): Ontogenetic and seasonal development of wax composition and cuticular transpiration of ivy (*Hedera helix* L.) sun and shade leaves. *Planta* 207, 67-75.
- Hem, J. D. (1986): Geochemistry and aqueous chemistry of aluminum. *Kidney International* 29, Suppl. 18, 3-7.
- Hinde, P., Richardson, P., Koyro, H.-W., Tomos, A. D. (1998): Quantitative microanalysis of solutes in individual plant cells: A comparison of microdroplet and in situ frozen-hydrated data. *J. Microsc.* 191, 303-310.
- Horst, W. J. (1995): The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants: a review. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 158, 419-428.
- Horst, W. J., Weithmann, M. (1997): Blaufärbung, Grundlagen. In: *Hortensien*. Jennerich, L. (Hrsg.). Thalacker Medien, Bernhard Thalacker Verlag, Braunschweig. ISBN 3-87815-077-6. 42-46.
- Horst, W. J., Wagner, A., Marschner, H. (1982): Mucilage protects root meristems from aluminium injury. *Z. Pflanzenphysiol.* 105, 435-444.

- Horst, W. J., Wagner, A., Marschner, H. (1983): Effect of aluminium on root growth, cell-division rate and mineral element contents in roots of *Vigna unguiculata* genotypes. *Z. Pflanzenphysiol.* 109, 95-103.
- Horst, W. J., Asher, C. J., Cakmak, J., Szulkiewicz, P., Wissemeier, A. H. (1992): Short-term responses of soybean roots to aluminium. *J. Plant Physiol.* 140, 174-178.
- Horst, W. J., Grauer, U., Wild-Hallen, M., Zöll, M. (1993): Einfluß von Aluminiumgaben auf das Blau der Hortensien. *Gartenbau-Magazin* 5, 64-67.
- Horst, W. J., Schmohl, N., Kollmeier, M., Baluška, F., Sivaguru, M. (1999): Does aluminium affect root growth of maize through interaction with the cell wall - plasma membrane - cytoskeleton continuum? *Plant Soil* 215, 163-174.
- Hue, N. V., Craddock, G. R., Adams, F. (1986): Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Sci. Soc. Am.* 50, 28-34.
- Hunt, R. (1981): *Plant Growth Analysis*. Edward Arnold, London.
- Hyatt, A. D., Marshall, A. T. (1985): An alternative microdroplet method for quantitative X-ray microanalysis of biological fluids. *Micron. Microsc. Acta* 16, 39-44.
- Ikeda, H., Tadano, T. (1993): Ultrastructural changes of root tip cells in barley roots induced by a comparatively low concentration of aluminium. *Soil Sci. Plant Nutr.* 39, 109-117.
- Jensen, P., Pettersson, S., Drakenberg, T., Asp, H. (1989): Aluminium effects on vacuolar phosphorus in roots of beech (*Fagus sylvatica* L.). *J. Plant Physiol.* 134, 37-42.
- Johnson-Flanagan, A. M., Owens, J. N. (1985): Development of white spruce (*Picea glauca*) seedling roots. *Can. J. Bot.* 63, 456-462.
- Jones, D. L. (1998): Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant Soil* 205, 25-44.
- Jones, D. L., Prabowo, A. M., Kochian, L. V. (1996): Aluminium-organic acid interactions in acid soils. II. Influence of solid phase sorption on organic acid-Al complexation and Al rhizotoxicity. *Plant Soil* 182, 229-237.
- Kauss, H. (1989): Fluorometric measurement of callose and other 1,3- β -glucans. In: *Modern methods of plant analysis*. Volume 10, Plant Fibers. Linskens, H. F., Jackson, J. F. (Hrsg.). Springer-Verlag, Berlin. 127-137.
- Kerven, G. L., Edwards, D. G., Asher, C. J., Hallman, P. S., Kokot, S. (1989): Aluminium determination in soil solution. II. Short-term colorimetric procedure for the measurement of inorganic monomeric aluminium in the presence of organic acid ligands. *Aust. J. Soil Res.* 27, 91-102.
- Kidd, P. S., Poschenrieder, C., Barceló, J. (2001): Does root exudation of phenolics play a role in aluminium resistance in maize (*Zea mays* L.)? In: *Plant nutrition - Food security and sustainability of agro-ecosystems*. Horst, W. J. (Hrsg.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande. 504-505.
- Kinraide, T. B. (1991): Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant Soil* 134, 167- 178.
- Kinraide, T. B. (1993): Aluminum enhancement of plant growth in acid rooting media. A case of reciprocal alleviation of toxicity by two cations. *Physiol. Plant.* 88, 619-625.
- Kinraide, T. B. (1997): Reconsidering the rhizotoxicity of hydroxyl, sulphate, and fluoride complexes of aluminium. *J. Exp. Bot.* 48, 1115-1124.
- Kinraide, T. B., Parker, D. R. (1989): Assessing the phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminum. *Plant Cell Environ.* 12, 479-487.
- Kinraide, T. B., Ryan, P. R., Kochian, L. V. (1992): Interactive effects of Al^{3+} , H^{+} , and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential. *Plant Physiol.* 99, 1461-1468.
- Klepper, B. (1991): Root-shoot relationships. In: *Plant Roots – the Hidden Half*. Waisel, Y. *et al.* (Hrsg.). Marcel Dekker, New York. 265-286.
- Kochian, L. V. (1995): Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 237-260.
- Köhl, K., Lösch, R., González-Rodríguez, A. M., Jiménez, M. S., Morales, D. (1996): Foliar cation contents of laurel forest trees on the Canary Islands. *Flora* 191, 303-311.
- Kollmeier, M., Felle, H. H., Horst, W. J. (2000): Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? *Plant Physiol.* 122, 945-956.

- Kollmeier, M., Dietrich, P., Bauer, C. S., Horst, W. J., Hedrich, R. (2001): Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. *Plant Physiol.* 126, 397-410.
- Kwong, K. F. N. K., Huang, P. M. (1979): The relative influence of low-molecular-weight, complexing organic acids on the hydrolysis and precipitation of aluminum. *Soil Sci.* 128 (6), 337-342.
- Läuchli, A. (1976): Apoplasmic transport in tissues. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*. New series Vol. 2 Part B. Transport in Plants II. Part B: Tissues and organs. Lüttge, U., Pitman, M.G. (Hrsg.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 3-34.
- Lawrence, W. J. C., Price, J. R., Robinson, G. M., Robinson, R. (1938): A survey of anthocyanins. *V. Biochem. J.* 32, 1661-1667.
- Lazof, D. B., Goldsmith, J. G., Rufty, T. W., Linton, R. W. (1994): Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips. *Plant Physiol.* 106, 1107-1114.
- Lazof, D. B., Goldsmith, J. G., Rufty, T. W., Linton, R. W. (1996): The early entry of Al into cells of intact soybean roots. *Plant Physiol.* 112, 1289-1300.
- Lee, E. H., Foy, C. D. (1986): Aluminum tolerance of two snapbean cultivars related to organic acid content evaluated by high-performance liquid chromatography. *J. Plant Nutr.* 9, 1481-1498.
- Lees, G. L., Suttill, N. H., Gruber, M. Y. (1993): Condensed tannins in sainfoin. I. A histological and cytological survey of plant tissues. *Can. J. Bot.* 71, 1147-1152.
- Lees, G. L., Gruber, M. Y., Suttill, N. H. (1995): Condensed tannins in sainfoin. II. Occurrence and changes during leaf development. *Can. J. Bot.* 73, 1540-1547.
- Li, X. F., Ma, J. F., Matsumoto, H. (2000): Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rhy and wheat. *Plant Physiol.* 123, 1537-1543.
- Lindberg, S., Griffiths, G. (1993): Aluminium effects on ATPase activity and lipid composition of plasma membranes in sugar beet roots. *J. Exp. Bot.* 44, 1543-1550.
- Lindsay, W. L., Walthall, P. M. (1989): The solubility of aluminum in soils. In: *The environmental chemistry of aluminum*. Sposito, G. (Hrsg.). CRC Press, Boca Raton, Florida. 221-239.
- Llugany, M., Massot, N., Wissemeier, A. H., Poschenrieder, C., Horst, W. J., Barceló, J. (1994): Aluminium tolerance of maize cultivars as assessed by callose production and root elongation. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 157, 447-451.
- Llugany, M., Poschenrieder, C., Barceló, J. (1995): Monitoring of aluminium-induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in tolerance to aluminium and proton toxicity. *Physiol. Plant.* 93, 265-271.
- Lydersen, E., Salbu, B., Polò, A. B. S., Muniz, P. (1991): Formation and dissolution kinetics of Al(OH)₃ (s) in synthetic freshwater solutions. *Water Resources Res.* 27, 351-357.
- Ma, J. F. (2000): Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol.* 41 (4), 383-390.
- Ma, J. F., Hiradate, S. (2000): Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Planta* 211, 355-360.
- Ma, J. F., Hiradate, S., Nomoto, K., Iwashita, T., Matsumoto, H. (1997): Internal detoxification mechanism of Al in *Hydrangea*. Identification of Al form in the leaves. *Plant Physiol.* 113, 1033-1039.
- Ma, J. F., Hiradate, S., Matsumoto, H. (1998): High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiol.* 117, 753-759.
- Ma, J. F., Ryan, P. R., Delhaize, E. (2001): Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6, 273-278.
- McQuattie, C., Schier, G. A. (1990): Response of red spruce seedlings to aluminum toxicity in nutrient solution: alterations in root anatomy. *Can. J. For. Res.* 20, 1001-1011.
- Maier, P. (1997): Bedeutung der Kompartimentierung von Mangan und organischen Säuren für die Mangantoleranz von Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Dissertation Universität Hannover, Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart.

- Malone, M., Leigh, R. A., Tomos, A. D. (1989): Extraction and analysis of sap from individual wheat leaf cells: the effect of sampling speed on the osmotic pressure of extracted sap. *Plant Cell Environ.* 12, 919-926.
- Malone, M., Leigh, R. A., Tomos, A. D. (1991): Concentrations of vacuolar inorganic ions in individual cells of intact wheat leaf epidermis. *J. Exp. Bot.* 42, 305-309.
- Marienfeld, S. (1992): Physiologische und feinstrukturelle Untersuchungen zur Aluminium-Toxizität an Haferpflanzen. Dissertation Universität Hannover.
- Marienfeld, S., Stelzer, R. (1993): X-ray microanalyses in roots of Al-treated *Avena sativa* plants. *J. Plant Physiol.* 141, 569-573.
- Marienfeld, S., Lehmann, H., Stelzer, R. (1995): Ultrastructural investigations and EDX-analyses of Al-treated oat (*Avena sativa*) roots. *Plant Soil* 171, 167-173.
- Marschner, H. (1991): Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. In: *Plant-soil interactions at low pH*. Wright, R. J. (Hrsg.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande. 683-702.
- Marschner, H. (1995): Mineral nutrition of higher plants. Harcourt Brace & Company (Hrsg.). Academic Press, London.
- Martin, F., Rubini, P., Côté, R., Kottke, I. (1994): Aluminium polyphosphate complexes in the mycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*: A ^{27}Al -nuclear magnetic resonance study. *Planta* 194, 241-246.
- Martin, R. B. (1986): The chemistry of aluminum as related to biology and medicine. *Clin. Chem.* 32, 1797-1806.
- Martin, R. B. (1988): Bioinorganic chemistry of aluminum. In: *Metal ions in biological systems*, Vol. 24, Aluminum and its role in biology. Sigel, H., Sigel, A. (Hrsg.). Marcel Dekker Inc., New York, Basel. 1-57.
- Masunaga, T., Kubota, D., Hotta, M., Wakatsuki, T. (1998): Mineral composition of leaves and bark in aluminum accumulators in a tropical rain forest in Indonesia. *Soil Sci. Plant Nutr.* 44, 347-358.
- Matsumoto, H. (2000): Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Intern. Rev. Cytol.* 200, 1-46.
- Memon, A. R., Chino, M., Yatazawa, M. (1981): Microdistribution of aluminum and manganese in the tea leaf tissues as revealed by X-ray microanalyzer. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 12, 441-452.
- Menzies, N. W., Bell, L. C., Edwards, D. G. (1991): Characteristics of membrane filters in relation to aluminium studies in soil solutions and natural water. *J. Soil Sci.* 42, 485-597.
- Mikuš, M., Bobák, M., Lux, A. (1992): Structure of protein bodies and elemental composition of phytin from dry germ of maize (*Zea mays* L.). *Bot. Acta* 105, 26-33.
- Millard, M. M., Foy, C. D., Coradetti, C. A., Reinsel, M. D. (1990): X-ray photoelectron spectroscopy surface analysis of aluminum ion stress in barley roots. *Plant Physiol.* 93, 578-583.
- Minolta (1996): Exakte Farbkommunikation – vom Farbgefühl zur objektiven Messung. Minolta GmbH, Ahrensburg.
- Mistrik, I., Tamas, L., Huttova, J. (1997): Effect of aluminium on root and leaf cytoplasmic proteins in maize. *Biologia Bratislava* 52, 767-772.
- Miyasaka, S. C., Hawes, M. C. (2001): Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. *Plant Physiol.* 125, 1978-1987.
- Miyasaka, S. C., Buta, J. G., Howell, R. K., Foy, C. D. (1991): Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. *Plant Physiol.* 96, 737-743.
- Muchovej, R. M. C., Allen, V. G., Martens, D. C., Muchovej, J. J. (1988): Effects of aluminum chelates in nutrient solution on the growth and composition of ryegrass. *J. Plant Nutr.* 11, 117-129.
- Nagata, T., Hayatsu, M., Kosuge, N. (1991): Direct observation of aluminum in plants by nuclear magnetic resonance. *Anal. Sci.* 7, 213-215.
- Nagata, T., Hayatsu, M., Kosuge, N. (1992): Identification of aluminium forms in tea leaves by ^{27}Al NMR. *Phytochem.* 31, 1215-1218.
- Nagata, T., Hayatsu, M., Kosuge, N. (1993): Aluminium kinetics in the tea plant using ^{27}Al and ^{19}F NMR. *Phytochem.* 32, 771-775.

- Naumann, A., Horst, W. J. (1998): Blaue Hortensien bei höheren pH-Werten. DeGa 13, 22-24.
- Naumann, A., Kunz, U., Lehmann, H., Stelzer, R., Horst, W. J. (2001): Effect of aluminium on root morphology of *Hydrangea macrophylla*. In: Plant nutrition - Food security and sustainability of agro-ecosystems. Horst, W. J. (Hrsg.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande. 516-517.
- Outlaw, W. H., Jr., De Vlieghere-He, X. (2001): Transpiration rate. An important factor controlling the sucrose content of the guard cell apoplast of broad bean. Plant Physiol. 126, 1716-1724.
- Ownby, J. D., Hruschka, W. R. (1991): Quantitative changes in cytoplasmic and microsomal proteins associated with aluminium toxicity in two cultivars of winter wheat. Plant Cell Environ. 14, 303-309.
- Parker, D. R., Pedler, J. F. (1998): Probing the "malate hypothesis" of differential aluminum tolerance in wheat by using other rhizotoxic ions as proxies for Al. Planta 205, 389-396.
- Parker, D. R., Kinraide, T. B., Zelazny, L. W. (1989): On the phytotoxicity of polynuclear hydroxy-aluminum complexes. Soil Sci. Soc. Am. J. 53, 789-796.
- Parker, D. R., Norvell, W. A., Chaney, R. L. (1995): GEOCHEM-PC: A chemical speciation program for IBM compatible personal computers. In: 'Soil Chemical Equilibrium and Reaction Models'. Loeppert, R. H. et al. (Hrsg.). ASA und SSSA, Madison, Wis. SSSA Spec. Publ. 42, 253-269.
- Pellet, D. M., Grunes, D. L., Kochian, L. V. (1995): Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). Planta 196, 788-795.
- Pellet, D. M., Papernik, L. A., Jones, D. L., Darrah, P. R., Grunes, D. L., Kochian, L. V. (1997): Involvement of multiple aluminium exclusion mechanisms in aluminium tolerance in wheat. Plant Soil 192, 63-68.
- Peterson, C. A., Cholewa, E. (1998): Structural modifications of the apoplast and their potential impact on ion uptake. Z. Pflanzenernähr. Bodenk. 161, 521-531.
- Piñeros, M. A., Kochian, L. V. (2001): A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al³⁺-induced anion channels. Plant Physiol. 125, 292-305.
- Plattner, H., Zingsheim, H. P. (1987): Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie. Verlag Gustav Fischer, Stuttgart.
- Puthota, V., Cruz-Ortega, R., Johnson, J., Ownby, J. (1991): An ultrastructural study of the inhibition of mucilage secretion in the wheat root cap by aluminium. In: Plant-soil interactions at low pH. Wright, R. J. et al. (Hrsg.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande. 779-787.
- Rengel, Z. (1996): Uptake of aluminium by plant cells. New Phytol. 134, 389-406.
- Reynolds, E. S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208-212.
- Richter, M. (2000): Das „blaue Wunder“ aus Wolbeck. Al-Zufuhr ohne zusätzliches Gießen der Hortensien. Gärtnerbörse 21, 14-16.
- Robinson, D. G., Ehlers, U., Herken, R., Herrmann, B., Mayer, F., Schürmann, F.-W. (1985): Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Romeis, B. (1948): Mikroskopische Technik. 15. Aufl. Leibniz Verlag, München. 44.
- Ryan, P. R., Ditomaso, J. M., Kochian, L. V. (1993): Aluminium toxicity in roots: An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. J. Exp. Bot. 44, 437-446.
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. (1996): Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots. Physiol. Plant. 96, 193-198.
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., Ma, J. F., Matsumoto, H. (1997): Early events induced by aluminum stress in elongating cells of wheat root. Soil Sci. Plant Nutr. 43, 1009-1014.
- Sase, H., Takamatsu, T., Yoshida, T. (1998): Variation in amount and elemental composition of epicuticular wax in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) leaves associated with natural environmental factors. Can. J. Forest Res. 28, 87-97.
- Schmohl, N. (2001): Bedeutung des Apoplasten für die Aluminiumtoxizität bei höheren Pflanzen. Dissertation Universität Hannover.
- Schmohl, N., Pilling, J., Fisahn, J., Horst, W. J. (2000): Pectin methylesterase modulates aluminium sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. Physiol. Plant. 109, 419-427.

- Schreiner, K. A., Hoddinott, J., Taylor, G. J. (1994): Aluminum-induced deposition of (1,3)- β -glucan (callose) in *Triticum aestivum* L. *Plant Soil* 162, 273-280.
- Schlegel, H., Godbold, D. L., Adriano, D. C. (1991): Metals in soils, waters, plants and animals. Proceedings of an international conference, Orlando, Florida, 20. 04. – 03. 05. 1990. *Water-, Air-, and Soil-Pollution* 57-58:131-138.
- Shen, R., Ma, J. F. (2001): Distribution and mobility in an Al-accumulating plant, *Fagopyrum esculentum* Moench. *J. Exp. Bot.* 52, 1683-1687.
- Shi, B., Haug, A. (1988): Uptake of aluminum by lipid vesicles. *Toxicol. Environm. Chem.* 17, 337-349.
- Singh, K., Yoshimura, E., Bughio, N., Kanazawa, K., Mori, S. (1997): Complexing ability of organic acids with aluminium in acidic soils. In: *Plant nutrition - for sustainable food production and environment*. Ando, T. *et al.* (Hrsg.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande. 447-448.
- Sitte, P. (1962): Einfaches Verfahren zur stufenlosen Gewebe-Entwässerung für die elektronenmikroskopische Präparation. *Naturwiss.* 49, 402-403.
- Sivaguru, M., Horst, W. J. (1998): The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiol.* 116, 155-163.
- Sivaguru, M., Baluška, F., Volkmann, D., Felle, H., Horst, W. J. (1999): Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiol.* 119, 1073-1082.
- Ślaski, J. J. (1989): Effect of aluminium on calmodulin-dependent and calmodulin-independent NAD kinase activity in wheat (*Triticum aestivum* L.) root tips. *J. Plant Physiol.* 133, 696-701.
- Ślaski, J. J. (1990): Response of calmodulin-dependent and calmodulin-independent NAD kinase to aluminium in root tips from various cultivated plants. *J. Plant Physiol.* 136, 40-44.
- Ślaski, J. J., Zhang, G., Basu, U., Stephens, J. L., Taylor, G. J. (1996): Aluminum resistance in wheat (*Triticum aestivum*) is associated with rapid, Al-induced changes in activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in root apices. *Physiol. Plant.* 98, 477-484.
- Snowden, K. C., Gardener, R. C. (1993): Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol.* 103, 855-861.
- Snowden, K. C., Richards, K. D., Gardner, R. C. (1995): Aluminum-induced genes. Induction by toxic metals, low calcium, and wounding and pattern of expression in root tips. *Plant Physiol.* 107, 341-348.
- Stout, P. R. (1961): zitiert in: *Plant biochemistry*. Bonner und Varner (Hrsg.). 1. Aufl. (1965). Academic Press, New York. London. 440.
- Steer, M. W. (1988): The role of calcium in exocytosis and endocytosis in plant cells. *Physiol. Plant.* 72, 213-220.
- Stedle, E., Peterson, C. A. (1998): How does water get through roots? *J. Exp. Bot.* 49, 775-788.
- Stienen, H. (1986): Veränderungen im Wasserhaushalt junger Koniferen in saurer und Al-haltiger Nähr- und Bodenlösung. *Forstarchiv.* 57, 227-231.
- Storck, A. (1942): Zur Kenntnis der bei den Blütenorganen der Hortensie (*Hydrangea opuloides* Koch) den Farbumschlag von rosa-rot nach blau auslösenden Faktoren und Untersuchungen über den Blütenfarbstoff dieser Pflanze. *Angew. Bot.* 24, 397-456.
- Takeda, K., Kariuda, M., Itoi, H. (1985): Blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*. *Phytochem.* 24, 2251-2254.
- Takeda, K., Yamashita, T., Takahashi, A., Timberlake, C. F. (1990): Stable blue complexes of anthocyanin-aluminium-3-*p*-coumaroyl- or 3-caffeoyl-quinic acid involved in the blueing of *Hydrangea* flower. *Phytochem.* 29, 1089-1091.
- Tamas, L., Mistrik, I., Huttova, J. (1997): Accumulation of proteins in barley primary leaves induced by aluminium and pathogen treatment. *Biologia Bratislava* 52, 585-589.
- Taylor, G. J. (1988): The physiology of aluminum tolerance in higher plants. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19, 1179-1194.
- Taylor, G. J. (1991): Current views of the aluminum stress response; the physiological basis of tolerance. *Curr. Top. Plant Biochem. Biophysiol.* 10, 57-93.

- Taylor, G. J., Foy, C. D. (1985): Mechanisms of aluminum tolerance in *Triticum aestivum* L. (wheat). I. Differential pH induced by winter cultivars in nutrient solutions. *Amer. J. Bot.* 72, 695-701.
- Taylor, L. P., Hepler, P. K. (1997): Pollen germination and tube growth. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 461-491.
- Taylor, G. J., Basu, A., Basu, U., Ślaski, J. J., Zhang, G., Good, A. (1997): Al-induced, 51-kilodalton, membrane-bound proteins are associated with resistance to Al in a segregating population of wheat. *Plant Physiol.* 114, 363-372.
- Taylor, G. J., McDonald-Stephens, J. L., Hunter, D. B., Bertsch, P. M., Elmore, D., Rengel, Z., Reid, R. J. (2000): Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiol.* 123, 987-996.
- Thiel, G., Rupnik, M., Zorec, R. (1994): Raising the cytosolic Ca^{2+} concentration increases the membrane capacitance of maize coleoptile protoplasts: Evidence for Ca^{2+} -stimulated exocytosis. *Planta* 195, 305-308.
- Tice, K. R., Parker, D. R., DeMason, D. A. (1992): Operationally defined apoplasmic and symplasmic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. *Plant Physiol.* 100, 309-318.
- Turnau, K., Kottke, I., Oberwinkler, F. (1993): *Paxillus involutus* - *Pinus sylvestris* mycorrhizae from heavily polluted forest. I. Element localization using electron energy loss spectroscopy and imaging. *Bot. Acta* 106, 213-219.
- Vázquez, M. D., Poschenrieder, C., Corrales, I., Barceló, J. (1999): Change in apoplasmic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiol.* 119, 435-444.
- Vitorello, V. A., Haug, A. (1996): Short-term aluminium uptake by tobacco cells: Growth dependence and evidence for internalization in a discrete peripheral region. *Physiol. Plant.* 97, 536-544.
- von Uexküll, H. R., Mutert, E. (1995): Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil* 171, 1-15.
- Wagatsuma, T. (1984): Characteristics of upward translocation of aluminum in plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* 30, 345-358.
- Wagatsuma, T., Akiba, R. (1989): Low surface negativity of root protoplasts from aluminum-tolerant plant species. *Soil Sci. Plant Nutr.* 35, 443-452.
- Wagatsuma, T., Kaneko, M., Hayasaka, Y. (1987): Destruction process of plant root cells by aluminum. *Soil Sci. Plant Nutr.* 33, 161-175.
- Wagatsuma, T., Hitomi, H., Ishikawa, S., Tawarayama, K. (1997): Al-binding capacity of plasma membrane of root-tip portion in relation to Al tolerance. In: *Plant nutrition – for sustainable food production and environment*. Ando, T. *et al.* (Hrsg.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande. 467-468.
- Watanabe, T., Osaki, M., Yoshihara, T., Tadano, T. (1998): Distribution and chemical speciation of aluminum in the Al accumulator plant, *Melastoma malabathricum* L. *Plant Soil* 201, 165-173.
- Watanabe, T., Osaki, M., Tadano, T. (2001): Al uptake kinetics in roots of *Melastoma malabathricum* L. - an Al accumulator plant. *Plant Soil* 231, 283-291.
- Webb, L. J. (1954): Aluminium accumulation in the Australian-New Guinea flora. *Aust. J. Bot.* 2, 176-197.
- Weithmann, M., Horst, W. J. (1997): Blaufärbung, Umsetzung in die Praxis. In: *Hortensien*. Jennerich, L. (Hrsg.). Thalacker Medien, Bernhard Thalacker Verlag, Braunschweig. ISBN 3-87815-077-6. 47-58.
- Weithmann, M., Hoyer, S., Horst, W. J. (1994): So werden Hortensien blau. *DeGa* 48, 1579-1581.
- Weithmann, M., Zöll, M., Horst, W. J. (1995): Blaufärbung von Hortensien. *DeGa* 2, 92-96.
- Whitehead, W. F., Singh, B. P. (1995): Leaf age affects gas exchange in okra. *Hort. Sci.* 30, 1017-1019.
- Wissemeier, A. H., Horst, W. J. (1995): Effect of calcium supply on aluminium-induced callose formation, its distribution and persistence in roots of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J. Plant Physiol.* 145, 470-476.

- Wissemeyer, A. H., Klotz, F., Horst, W. J. (1987): Aluminium induced callose synthesis in roots of soybean (*Glycine max* L.). *J. Plant Physiol.* 129, 487-492.
- Young, E., Werner, D. J. (1984): A nondestructive method for measuring shoot and root fresh weights. *Hort. Sci.* 19, 554-555.
- Yuan, J. L., Horng, S. T., Chi, L. H. (1996): The aluminum complexes in the xylem sap of a tea plant. *J. Chin. Agr. Chem. Soc.* 34, 695-702.
- Zeier, J., Ruel, K., Ryser, U., Schreiber, L. (1999): Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta* 209, 1-12.
- Zel, J., Svetek, J., Crne, H., Schara, M. (1993): Effect of aluminum on the membrane fluidity of the mycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *Plant Physiol.* 89, 172-176.
- Zhang, G., Hoddinott, J., and Taylor, G. J. (1994). Characterization of 1,3- β -glucan (callose) synthesis in roots of *Triticum aestivum* in response to aluminum toxicity. *J. Plant Physiol.* 144, 229-234.
- Zhang, G., Ślaski, J. J., Archambault, D. J., Taylor, G. J. (1997): Alteration of plasma membrane lipids in aluminum-resistant and aluminum-sensitive wheat genotypes in response to aluminum stress. *Physiol. Plant.* 99, 302-308.
- Zhang, F. Q., Shen, Z. G., Liu, Y. L. (2000): Effects of Al^{3+} and $Al^{3+} + Ca^{2+}$ on ATPases and membrane fluidities of plasma membrane and tonoplast vesicles from root tips of wheat seedlings. *Acta Phytophysiol. Sin.* 26, 105-110.
- Zheng, S. J., Ma, J. F., Matsumoto, H. (1998a): High aluminum resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol.* 117, 745-751.
- Zheng, S. J., Ma, J. F., Matsumoto, H. (1998b): Continuous secretion of organic acids is related to aluminium resistance during relatively long-term exposure to aluminium stress. *Physiol. Plant.* 103, 209-214.
- Zimmermann, M. H., Steudle, E. (1998): Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis. *Planta* 206, 7-19.
- Zimmermann, M. H., Hartmann, K., Schreiber, L., Steudle, E. (2000): Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta* 210, 302-311.
- Zorec, R., Tester, M. (1992): Cytoplasmic Ca^{2+} stimulates exocytosis in a plant secretory cell. *Biophys. J.* 63, 864-867.
- Zorec, R., Tester, M. (1993): Rapid pressure driven exocytosis-endocytosis cycle in a single plant cell. *FEBS Lett.* 333, 283-286.

8 ANHANG

Tab. 8.1: Anionenkonzentration im Xylemsaft von drei Hortensiensorten bei der Blüte im April 1998 in Abhängigkeit vom Al-Angebot ($\text{g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O (L Substrat)}^{-1}$). Alle Werte repräsentieren eine Messungen in einer Mischproben von den vier Wiederholungen pro Sorte und Al-Angebot.

Sorte	Al-Angebot $\text{g (L Substrat)}^{-1}$	NO_3 mM	PO_4 mM	SO_4 mM	Cl mM
'Renate Steiniger'	0	0,95	0,78	1,09	1,35
	3	0,96	0,64	1,40	2,34
	6	0,73	0,46	1,20	1,26
	12	0,62	0,20	0,47	0,59
'Adria'	0	0,56	0,92	0,68	4,48
	3	1,69	0,98	0,70	4,71
	6	0,90	0,64	1,27	3,37
	12	1,83	0,67	0,73	3,24
'Blauer Ball'	0	1,82	0,64	0,46	1,43
	3	2,20	0,51	0,79	1,98
	6	4,75	0,58	1,29	1,92
	12	3,40	0,42	0,76	2,29

Mein herzlicher Dank gilt

Herrn Prof. Dr. W. J. Horst für die Überlassung des interessanten Themas, die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Lehmann für die Übernahme des Koreferats und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe zur Durchführung der licht-, elektronenmikroskopischen und element-analytischen Untersuchungen.

Herrn Dr. R. Stelzer und Frau U. Kunz für die freundliche und tatkräftige Unterstützung der licht-, elektronenmikroskopischen und element-analytischen Untersuchungen (EDX, EELS, ESI), die weit über das normale Maß hinausging.

Herrn PD Dr. Koyro für die freundliche und tatkräftige Unterstützung bei der EDX-Analyse von Vakuolensaft, die in der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt wurde.

Herrn Prof. Dr. Seubert und Herrn Dr. Matthias Busch für die sehr gute Zusammenarbeit bei der ionenchromatographischen Al-Speziierung im Xylemsaft.

Frau M. Weithmann für die freundliche Unterstützung in der Einarbeitungsphase.

Den Betrieben Kötterheinrich und ramp für die kostenlose Überlassung von bewurzelten Hortensienstecklingen und der Firma Balster für die Unterstützung der Versuche durch Substratspenden.

Herrn Jokiel und allen Mitgliedern des Arbeitskreises Hortensien Westfalen-Lippe für den freimütigen und interessanten Einblick in die Praxis.

Der DFG und der Graduiertenförderung der Universität Hannover für die finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Ridder, Institut für Bodenkunde, für die Durchführung der ionenchromatischen Bestimmung der anorganischen Anionen.

Herrn W. Stebbe, Herrn J. Beyer, Frau G. Geisler, A. Klein für die Unterstützung bei der Kultur der Substratversuche.

Meinen „HiWis“ Frau R. Duda, Frau P. Roppel, Herrn H. Schnack, Frau T. Iken, Frau V. Everding und Frau F. Bergjohann für ihre unentbehrliche Hilfe bei der Nährlösungskultur der Stecklinge und der Versuchsdurchführung.

Frau Dr. A. Staß, Frau Dr. N. Schmohl, Herrn B. Gödecke, Herrn PD Dr. Franz Wiesler, Frau Dr. E. Barth für die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pflanzenernährung für ihre Hilfsbereitschaft und ihren Beitrag zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Meinen Freundinnen und Freunden für ihre Freundschaft während dieser Zeit.

Last not least: Meinen Eltern, Ingelore und Friedhelm Naumann, für ihre stete, bedingungslose Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Die Arbeit ist an keinem anderen Fachbereich oder keiner anderen Universität eingereicht worden.

Hannover, 04. 10. 2001