

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation der Plasmamembran H⁺-ATPase in submersen Makrophyten

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
der
Universität Karlsruhe

genehmigte
DISSERTATION

von

Gabriele Jürges
Ludwigshafen/Rh.

2002

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Mai 2002
Referent: Prof. Dr. H.-G. Heumann
Korreferent: Prof. Dr. Leist

Für Christian

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Verzeichnis der verwendeten Wasserpflanzen	VI
1. Einleitung	1
1.1. Lebensraum Wasser	1
1.1.1. Stehende Gewässer	1
1.1.2. Fließende Gewässer	2
1.1.3. Anpassungen von submersen Makrophyten an ihren Lebensraum	3
1.2. Das Karbonatsystem in Süßgewässern	4
1.2.1. Mangelware Sauerstoff und Kohlendioxid	4
1.2.2. Das Kalk-Kohlensäure-Gleichgewicht	4
1.3. Anpassungen von submersen Makrophyten und Algen	5
1.3.1. Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff bei Cyanobakterien und Algen	6
1.3.2. Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff bei Süßwassermakrophyten	7
1.3.3. Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff bei Seegräsern	8
1.4. Transportvorgänge an Membranen	8
1.4.1. Die V-Typ- und F-Typ-ATPasen	9
1.4.2. Die P-Typ-ATPasen	10
1.5. Der monoklonale Antikörper 46E5B11	11
1.6. Ziele der Arbeit	12
2. Material und Methoden	14
2.1. Das Pflanzenmaterial	14
2.1.1. Allgemeine Auswahl	14
2.1.2. Spezielle Auswahl	17
2.2. Pflanzenbeschreibungen	18
2.2.1. <i>Cabomba caroliniana</i>	18
2.2.2. <i>Callitriche hamulata</i>	18
2.2.3. <i>Ceratophyllum demersum</i>	19
2.2.4. <i>Elodea canadensis</i> und <i>E. nuttallii</i>	19
2.2.5. <i>Hippuris vulgaris</i>	19
2.2.6. <i>Myriophyllum spicatum</i>	19
2.2.7. <i>Myriophyllum aquaticum</i>	20
2.2.8. <i>Myriophyllum verticillatum</i>	20
2.2.9. <i>Posidonia oceanica</i>	20
2.2.10. <i>Potamogeton natans</i>	20
2.2.11. <i>Potamogeton lucens</i>	21
2.2.12. <i>Potamogeton perfoliatus</i>	21
2.2.13. <i>Ranunculus penicillatus</i>	21
2.2.14. <i>Stratiotes aloides</i>	21
2.2.15. <i>Vallisneria spiralis</i>	21
2.3. Die Probennahme	22
2.4. Präparation des Pflanzenmaterials	22

2.5. Lichtmikroskopische Untersuchungen	23
2.5.1. Fixierung und Einbettung für die Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie	23
2.5.2. Immunfluoreszenz-Markierung	23
2.5.3. Histologische Untersuchungen	24
2.5.3.1. Fixierung und Einbettung für die Hellfeldmikroskopie	24
2.5.3.2. Schneiden	24
2.5.3.3. Färbung mit Toluidinblau	24
2.5.4. Mikroskopie	24
2.5.4.1. Die Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	24
2.5.4.2. Differenzialinterferenzkontrast	25
2.5.4.3. Die Epifluoreszenzmikroskopie	25
2.5.4.4. Die Bilddokumentation	25
2.5.4.5. Die Lichtmikroskopie	25
2.6. Elektronenmikroskopische Methoden	26
2.6.1. Fixierung und Einbettung	26
2.6.1.1. Ermittlung der optimalen Fixierung für die Immunogoldmarkierung	26
2.6.1.2. Fixierung für die Strukturuntersuchungen	27
2.6.1.3. Fixierung für die Immunogold-Untersuchungen	27
2.6.2. Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie	28
2.6.3. Immunogoldmarkierung	28
2.6.4. Die Silberfärbung	29
2.6.5. Kontrastierungen	29
2.6.5.1. Kontrastierung mit Uranylacetat	29
2.6.5.2. Kontrastierung mit Bleicitrat	29
2.6.6. Transmissionselektronenmikroskopie	30
2.6.6.1. Transmissionselektronenmikroskop (TEM)	30
2.6.6.2. Die Bilddokumentation	30
2.6.6.3. Ermittlung der linearen Dichte-Verteilung von Goldkörnern mit AnalySIS [®]	30
2.7. Nachweis der physiologischen Polarität bei Blättern von Wasserpflanzen	31
2.8. Biochemische Untersuchungen	32
2.8.1. Mikrosomenfraktionierung	32
2.8.2. Quantitative Bestimmung von Proteinen der Mikrosomenfraktionen	33
2.8.3. SDS-Gel-Elektrophorese	33
2.8.3.1. Herstellung des Acrylamidgels	33
2.8.3.2. Auftrennung der Mikrosomenfraktionen	34
2.8.3.3. Anfärbung und Konservierung der Gele	34
2.8.4. Western Blotting	35
2.8.4.1. Immunmarkierung	35
2.8.4.2. Anfärbung	35
2.9. Untersuchungen an <i>Myriophyllum spec.</i> bei verschiedenen pH-Werten	36
2.9.1. Veränderungen im Blatt unter konstanten pH-Bedingungen	36
2.9.2. Veränderungen des pH im Laufe mehrerer Wochen	37
2.9.3. Messung des CO ₂ -Gehalts im Wasser	37
2.9.4. Messung der Membranspannung	37
2.9.5. Ermittlung der unterschiedlichen FITC-Fluoreszenz-Intensitäten	38

3. Ergebnisse	39
3.1. Physiologische Polarität bei Blättern submerser Pflanzen	39
3.1.1. Polare Blätter	39
3.1.2. Nicht polare Blätter	39
3.1.3. Blätter, die keine Polarität zeigten	40
3.1.4. <i>Vallisneria spiralis</i>	40
3.2. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie der Wasserpflanzen	44
3.2.1. Die Blätter der Wasserpflanzen	44
3.2.1.1. Wasserpflanzen mit fein zerschlitzten Blättern	44
3.2.1.2. Wasserpflanzen mit langen, flachen Blättern	55
3.2.1.3. Wasserpflanzen mit Blattwirteln	61
3.2.1.4. Wasserpflanzen mit „normalen“ Laubblättern	67
3.2.2. Die Stängel der Wasserpflanzen	73
3.2.3. Die Wurzeln der Wasserpflanzen	73
3.3. Immunlokalisation der PM-H ⁺ -ATPase	86
3.3.1. Fluoreszenzmikroskopie	86
3.3.1.1. Lokalisation der FITC-Fluoreszenz in Blättern von Hydrophyten	86
3.3.1.1.1. Allgemeiner Überblick	86
3.3.1.1.2. FITC-Fluoreszenz in den Epidermiszellen von Blättern	87
3.3.1.1.3. FITC-Fluoreszenz in Epidermis- und Mesophyllzellen von Blättern	88
3.3.1.1.4. Lokalisation der FITC-Fluoreszenz in den Leitbündeln von Blättern	98
3.3.1.1.5. Blätter ohne FITC-Fluoreszenz	98
3.3.1.2. Lokalisation der FITC-Fluoreszenz in Stängeln von Hydrophyten	98
3.3.1.3. Lokalisation der FITC-Fluoreszenz in Wurzeln von Hydrophyten	99
3.3.2. Elektronenmikroskopie	109
3.3.2.1. Ermittlung der optimalen Fixierung für die immuncytochemische Lokalisation	109
3.3.2.2. Die Verteilung der PM-H ⁺ -ATPase in den Blättern von Wasserpflanzen	111
3.3.2.3. Quantitative Bestimmung der spezifischen Verteilung von Goldkörnern	125
3.4. SDS-Page und Western Blot	126
3.5. Auswirkungen unterschiedlicher pH-Werte auf <i>Myriophyllum spec.</i>	127
3.5.1. Allgemeinzustand der Pflanzen	127
3.5.2. Vitalität der Pflanzen bei konstanten pH-Werten	127
3.5.3. Vitalität der Pflanzen bei sich verändernden pH-Werten	131
3.5.4. pH-Schwankungen und CO ₂ -Konzentration bei <i>M. spicatum</i>	131
3.5.5. Veränderungen im pH bei <i>M. spicatum</i> und <i>M. aquaticum</i>	133
3.5.6. Messung der Membranspannungen	133
3.5.7. Lokalisation der FITC-Fluoreszenz in <i>M. spicatum</i> und <i>M. aquaticum</i>	134
3.5.8. Messung der FITC-Fluoreszenz-Intensität	138

4. Diskussion	144
4.1. Physiologische Polarität an Blättern von Hydrophyten	144
4.2. Unterschiedliche histologische und cytologische Strukturen	146
4.2.1. Die Blattstrukturen	146
4.2.2. Stängel- und Wurzelstrukturen	149
4.3. Die Lokalisation der PM-H ⁺ -ATPase	151
4.3.1. Die Auswirkung unterschiedlicher Fixierungsmittel	151
4.3.2. Primär- und FITC-Fluoreszenz	152
4.3.3. Lokalisation der PM-H ⁺ -ATPase in Blättern von Wasserpflanzen	153
4.3.4. Lokalisation der PM-H ⁺ -ATPase in Stängeln und Wurzeln	154
4.3.5. Die asymmetrische Verteilung der PM-H ⁺ -ATPase in den Zellen	155
4.4. Auswirkungen des pH auf die PM-H ⁺ -ATPase	158
4.5. Die Kohlenstoff-Konzentrations-Mechanismen	159
4.6. Ausblick	160
5. Zusammenfassung	161
6. Literatur	163
7. Anhang	175

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASA	American Standards Association (Einheit f. Lichtempfindlichkeit)
BCIP	Brom-chlor-indolyl-phosphat (Serva, Heidelberg, Deutschland)
BSA	Bovine serum albumin
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
DABCO	1,4 Diazabicyclo-[2,2,2]octan
DMP-30	2,4,6 (Tri(Dimethylaminoethyl)phenol)
DMP-30	2,4,6 (Tri(Dimethylaminoethyl)phenol)
DMSO	Dimethylsulfoxid (Serva, Heidelberg, Deutschland)
dpi	Dots per inch
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Ethylen-glycol-bis(β -aminoethylether)N,N,N',N'-tetraaceticacid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
LASER	Light amplification by stimulated emission of radiation
LR-White	London Resin White (Agar Scientific, Essex, Großbritannien)
MW	Mittelwert
Na-EDTA	Ethylendiamine tetraacetic acid-Na-salt
NBT	Nitro-blau-tetrazolium (Serva, Heidelberg, Deutschland)
PBS	Phosphat buffered saline
PEG 6000	Polyethylenglycol
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethan-sulfonsäure)
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTB	0,01M PBS + 0,01% Tween 20 + 1% BSA
PVPP	Polyvinylpyrrolidon (water insoluble); „Polyclar“ (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
RGB-Modus	Rot-gelb-blau-Modus bei Computer-Programmen
RT	Raumtemperatur
SDS	Dodecylsulfat-Na-Salz
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tif(f)	Target image file (formate)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

Verzeichnis der verwendeten Wasserpflanzen

<i>A. distachyos</i>	<i>Aponogeton distachyos</i>
<i>B. japonica</i>	<i>Bacopa japonica</i>
<i>C. beckettii</i>	<i>Cryptocoryne beckettii</i>
<i>C. caroliniana</i>	<i>Cabomba caroliniana</i>
<i>C. demersum</i>	<i>Ceratophyllum demersum</i>
<i>C. hamulata</i>	<i>Callitriche hamulata</i>
<i>C. palustris</i>	<i>Callitriche palustris</i>
<i>C. submersum</i>	<i>Ceratophyllum submersum</i>
<i>E. canadensis</i>	<i>Elodea canadensis</i>
<i>E. nuttallii</i>	<i>Elodea nuttallii</i>
<i>F. antipyretica</i>	<i>Fontinalis antipyretica</i>
<i>H. inflata</i>	<i>Hottonia inflata</i>
<i>H. vulgaris</i>	<i>Hippuris vulgaris</i>
<i>I. lacustris</i>	<i>Isoëtes lacustris</i>
<i>I. setacea</i>	<i>Isoëtes setacea</i>
<i>L. cardinalis</i>	<i>Lobelia cardinalis</i>
<i>M. aquatica</i>	<i>Mentha aquatica</i>
<i>M. aquaticum</i>	<i>Myriophyllum aquaticum</i>
<i>M. pteropus</i>	<i>Microsorium pteropus</i>
<i>M. spicatum</i>	<i>Myriophyllum spicatum</i>
<i>M. verticillatum</i>	<i>Myriophyllum verticillatum</i>
<i>N. marina</i>	<i>Najas marina</i>
<i>P. lucens</i>	<i>Potamogeton lucens</i>
<i>P. natans</i>	<i>Potamogeton natans</i>
<i>P. oceanica</i>	<i>Posidonia oceanica</i>
<i>P. perfoliatus</i>	<i>Potamogeton perfoliatus</i>
<i>R. penicillatus</i>	<i>Ranunculus penicillatus</i>
<i>R. rofundifolia</i>	<i>Rotala rofundifolia</i>
<i>S. aloides</i>	<i>Stratiotes aloides</i>
<i>U. sp.</i>	<i>Utricularia sp.</i>
<i>V. spiralis</i>	<i>Vallisneria spiralis</i>

1. Einleitung

1.1 Lebensraum Wasser

71,8% der gesamten Erdoberfläche sind von Meeren bedeckt, das sind rund 361 Mio. km². Binnenseen, Flüsse und das Grundwasser „bedecken“ noch mal ca. 2,5 Mio. km² (Heyn, 1975).

Binnengewässer entstanden schon in den geologischen Epochen der Kontinentalbildung. Im Gegensatz zu den Meeren, wo über längere Zeiträume konstante Umweltbedingungen herrschten, z.B. bei der Salinität, der Wassertemperatur, dem Gasgehalt des Wassers (Bohle, 1995), waren die Binnengewässer sowohl ihrer Lage nach, als auch in ihrer Ausdehnung einem raschen zeitlichen Wandel unterworfen. Eine ungestörte Entwicklung wie im Meer konnte in der Pflanzen- und Tierwelt nicht ablaufen. Wechselnde biotische und abiotische Umweltbedingungen in den Gewässern, sowie intensive Wechselwirkungen mit dem terrestrischen Umfeld hatten einen großen Einfluss auf Flora und Fauna. Immer wieder fanden an Land lebende Tiere und terrestrische Pflanzen den Weg in die limnischen Ökosysteme. Auch aus der Gruppe der Phycophyta (Algen) sind zahlreiche Arten vertreten, jedoch findet man von ihnen hier keine richtigen Großformen wie man sie im Gegensatz dazu im Meer (Bohle, 1995). Die heute in den Süßgewässern der Welt zu findenden Makrophyten sind also sekundär ins Wasser zurückgekehrt und mussten sich dort den neuen Umweltbedingungen anpassen. Den Weg zurück ins Meer fanden dagegen nur wenige Spermatophyten. Neben den Mangroven konnten sich einige Seegräser aus den Familien der Potamogetonaceae und Hydrocharitaceae in Küstennähe der Meere behaupten (Riedl, 1983).

1.1.1 Stehende Gewässer

Neben Quellen und Flüssen bieten vor allem die stehenden Gewässer submersen Makrophyten einen geeigneten Lebensraum. Es gibt sie in verschiedenen Erscheinungsformen, von kleinen, nur periodisch Wasser enthaltenen Pfützen bis zu großen, landschaftsprägenden Seen. Sie bilden meist einen in sich abgeschlossenen, fast autarken Lebensraum (Bohle, 1995). Aufgrund ihrer Entstehung unterscheidet man verschiedene Seen, wie z.B. die Dammseen, die Kraterseen und Maare, Einbruchbecken usw., und anthropogen entstandene Seen, wie z. B. die Kiesgruben (Krausch, 1996).

Den Lebensraum „See“ kann man in verschiedene Zonen einteilen, die jeweils unterschiedliche Lebensgemeinschaften beherbergen. Da wären in erster Linie die Uferzone (Litoral), der Freiwasserbereich (Pelagial), die Boden- und Tiefenzone (Profundal) und der Bodenkörper (Benthal) zu nennen. Das Litoral selbst

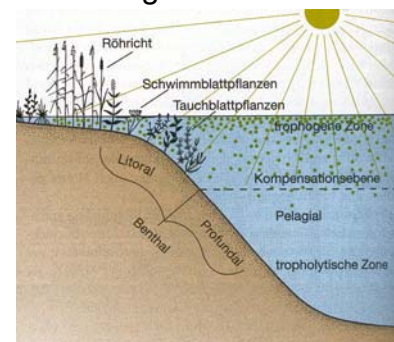


Abb. 1: Querschnitt durch einen See

kann wiederum in verschiedene Bereiche gegliedert werden, die unterschiedlich häufig mit Wasser in Berührung kommen. Auch das Pelagial wird nochmals horizontal unterteilt, in einen Oberflächenwasserbereich (trophogene Zone), in dem photoautotrophe und heterotrophe Organismen leben, und in einen Tiefenwasserbereich (tropholytische Zone), in dem nur heterotrophe Organismen leben (Bohle, 1995).

Ein limitierender Faktor für die Ausbreitung von photoautotrophen Organismen ist das Licht. Ein geringer Teil des einfallenden Lichtes wird an der Wasseroberfläche reflektiert, der Rest im Wasser absorbiert. Je tiefer es vordringt, desto mehr wird es abgeschwächt und es entsteht ein vertikaler Lichtgradient. In jeder Tiefe wird eine bestimmte Wellenlänge des noch vorhandenen Lichtes absorbiert. Es kommt zu einer exponentiellen Abnahme in der Tiefe. Da die verschiedenen Wellenlängen des Lichtes verschiedene Attenuationskoeffizienten haben, werden sie in der Tiefe unterschiedlich absorbiert, so dass die Lichtfarbe sich ändert. Blau hat die größte Transmission und ist auch noch in größeren Tiefen zu finden. Rot ist dagegen schon nach wenigen Metern nicht mehr zu erkennen. Daneben beeinflussen auch die im Wasser gelösten Partikel, Algen und Huminstoffe die Transmission des Lichtes. Dies ist von erheblicher Bedeutung für die Photosynthese der phototrophen Organismen, die nur bestimmte Spektralbereiche (400-750nm) nutzen können (Lampert und Sommer, 1993). Daher sind vor allem das Litoral und die trophogene Zone des Pelagials mit ihren ausreichenden Lichtverhältnissen die optimalen Lebensräume für photoautotrophe Organismen. Im Litoral konnte sich eine üppige Makrophytenvegetation entwickeln, im Pelagial findet man in erster Linie Mikroalgen. Aber auch einzelne Makrophyten, wie das wurzellose Hornkraut *Ceratophyllum spec.* haben diesen Lebensraum für sich gewonnen. Am Ufer steht Röhricht und im flachen, ufernahen Bereich findet man die Schwimmblattpflanzen. Daran schließt sich der Bereich der submersen Vegetation an. Mit zunehmender Wassertiefe, wenn das Litoral ins Profundal übergeht, wird der Bewuchs immer geringer. Die Tiefenverteilung reicht selten über 10m, ist aber letztendlich von der Einstrahlintensität der Sonne abhängig sowie von der Trübung des Wassers. Meist findet man in diesen Tiefen nur noch Characeen (Algen) und Moose (Bohle, 1995).

Ein zweiter Faktor, der die Ausbreitung von Wasserpflanzen in tiefere Schichten begrenzt, ist der Wasserdruck. Der Gasaustausch im Aerenchym der Spermatophyten wird durch den zunehmenden hydrostatischen Druck (1bar/10m) beeinträchtigt, so dass die Pflanzen mit zunehmender Tiefe neben zu geringen Lichtintensitäten auch mit weniger CO₂ und O₂ auskommen müssen (Lampert und Sommer, 1993).

Auch die Trophiestufen eines Gewässers haben einen Einfluss auf die Wasserpflanzenbestände. In oligotrophen Seen findet man z.B. kleine, rosettenbildende Pflanzen wie z.B. *Littorella spec.*, *Isoëtes spec.* und *Lobelia spec.*. Mit zunehmender Trophiestufe nimmt der Bestand an Röhricht und Schwimmblattpflanzen zu und die submerse Vegetation ab (Lampert und Sommer, 1993).

1.1.2 Fließende Gewässer

Auch von Fließgewässern gibt es verschiedene Erscheinungsformen, die sich sowohl in ihrer horizontalen als auch vertikalen Ausdehnung voneinander unterscheiden. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal bei Fließgewässern ist ihr Gefälle und die damit verbundene Fließgeschwindigkeit. Man unterscheidet zwei Hauptlebensräume, einmal den Bachbereich (Rhithral) und den anschließenden Flußbereich (Potamal). Während an der Quelle und im Bachbereich die Strömung schnell und turbulent ist, und das nährstoffarme Wasser eine 100%ige O₂-Sättigung aufweist, nimmt die Strömung bis zur Mündung hin deutlich ab, ebenso wie die Sauerstoffsättigung. Die Nährstoffdichte dagegen nimmt zu (Hafner und Philipp, 1996).

Nur ein geringer Teil der Flora eines Fließgewässers ist direkt im strömenden Wasser zu finden. Während im terrestrischen Umfeld von Fließgewässern Spermatophyten zahlreich vorkommen, sind sie in Flüssen und Bächen nur spärlich vertreten. Aber alle

festen Oberflächen sind mit einem Biofilm überzogen, der primär aus Bakterien, Algen, Pilzen, Protozoen und Mikrometazoen besteht. In den Oberläufen der gemäßigten Klimazonen fehlen Spermatophyten fast ganz (Bohle, 1995). Einige Moosarten wie *Scapania*, *Plathytnidum* und *Fontinalis* können sich aber ansiedeln und bilden dichte Rasen aus. In Quellsümpfen dagegen kann sich eine beachtliche Artenvielfalt ausbilden. In nicht zu tiefen Fließgewässern mit feinkörnigen Sohlsubstraten und einem geringen Gefälle gibt es einige Arten, die strömungstolerant sind oder sogar rasch fließende Gewässer bevorzugen. Zwei artenarme Angiospermenfamilien, die Podostemaceae und die Hydrocharitaceae sind spezialisierte Rheobionten (Lebewesen, auch Pflanzen, die in der Strömung leben). So findet man vor allem Wasserhahnenfuß, Wassersternarten und Wasserpest als submerse Arten in Fließgewässern (Bohle, 1995).

1.1.3 Anpassungen von submersen Makrophyten an ihren Lebensraum

Nach ihrer Immigration ins Süßwasser mussten sich die einstmals an das terrestrische Leben angepassten Makrophyten wieder auf neue Lebensbedingungen einstellen. Diese Anpassungen an den neuen Lebensraum waren vielfältig. Die durch das Landleben entwickelten Strukturen wurden entweder wieder aufgegeben oder beibehalten, dann aber in ihrer Funktion reduziert (Brünner, 1953).

Die meisten in unseren Klimazonen vorkommenden submersen Makrophyten zählen zu den Angiospermen. Sie besitzen einen Kormus, an dem man Blatt, Stängel und Wurzel unterscheiden kann. Die Wurzeln haben meist nur noch Haltefunktion, einige Pflanzen, wie z.B. *Ceratophyllum demersum*, haben sie ganz reduziert, da sie ihre Nährstoffe über die gesamte Pflanzenoberfläche aufnehmen. Andere, vor allem Sumpfpflanzen, nutzen ihre Wurzeln jedoch auch noch zur Nährstoffaufnahme. Da Wasserpflanzen ihre Nährstoffe direkt aus dem Wasser über die gesamte Oberfläche aufnehmen können, haben sie diese im Vergleich zu ihren Massen vergrößert, indem sie ihre Blätter meist fein zerschlitzt oder schmal und dünn gestaltet haben. Diese enthalten in der Regel keine Stomata mehr, dafür können aber Hydropoten und Wasserspalten auftreten, wie z.B. bei *Myriophyllum spicatum* (Napp-Zinn, 1973). Auf dicke Blattoberflächenauflagen als Verdunstungsschutz kann ebenfalls verzichtet werden. Die Stängel sind meist lang, dünn und auf Zugfestigkeit ausgelegt. Einige Pflanzen haben ihn ganz reduziert, z.B. *Isoetes spec.*. Die geschlechtliche Vermehrung findet bei vielen Wasserpflanzen weiterhin außerhalb des Wassers statt. Sie schieben ihre Blütenstände an langen Stängeln über die Wasseroberfläche. Bei anderen Wasserpflanzen findet die Blütenbildung und Befruchtung unter Wasser statt. Eine vegetative Vermehrung ist bei Wasserpflanzen ebenfalls weit verbreitet (Krausch, 1996).

1.2 Das Karbonatsystem in Süßgewässern

1.2.1 Mangelware Sauerstoff und Kohlendioxid

Die im Wasser gelösten Gase wie Sauerstoff und Kohlendioxid stammen aus der Atmosphäre, sie entstehen bei der Photosynthese von Algen und höheren Pflanzen und durch die Atmung von Pflanzen und Tieren. Während Stickstoff sowohl durch bakterielle Aktivität als auch durch die Atmosphäre in die Gewässer gelangt, werden Schwefelwasserstoff und Methan ausschließlich durch Bakterien produziert (Lampert und Sommer, 1993).

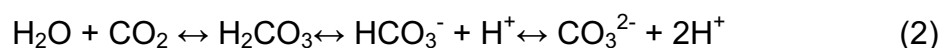
Zwischen den Gasen und dem Wasser entsteht ein Lösungsgleichgewicht, das mit Hilfe des Henryschen Gesetzes beschrieben werden kann. Man kann damit die theoretisch gelöste Gasmenge C ([mol/l]) errechnen, da es einen Zusammenhang zwischen dem Partialdruck (P_T) eines Gases, in Abhängigkeit von der Temperatur (T), und seinem Löslichkeitskoeffizienten K herstellt:

$$C = K \cdot P_T \quad (1)$$

Enthält das Wasser so viel Gas, dass es dem Lösungsgleichgewicht entspricht, dann ist die Lösung gesättigt. Es wird nun genauso viel CO_2 produziert bzw. aufgenommen, wie verbraucht bzw. abgegeben wird. Dies ist aber selten der Fall, da Produktion und Verbrauch meist unterschiedlich schnell erfolgen und ein Austausch mit der Luft an deren Grenzfläche relativ langsam vonstatten geht. Daher kommt es meist zu einer Über- oder Untersättigung des Wassers mit CO_2 . Für die Sättigungsmenge ist der Partialdruck des Gases, die Temperatur der Lösung und der Salzgehalt der Lösung wichtig, wobei dieser bei Süßwasser vernachlässigt werden kann (Lampert und Sommer, 1993). Die Temperatur dagegen hat einen erheblichen Einfluss auf die Löslichkeit von CO_2 . Bei 0°C beträgt K für CO_2 $7,55 \times 10^{-4}$ und bei 20°C $3,61 \times 10^{-4}$ (Gisi et al., 1997). Bei einem gleichbleibenden Partialdruck (z.B. $1,01\text{bar}^1$ auf Meereshöhe) ist die gelöste CO_2 -Menge bei 0°C Wassertemperatur mehr als doppelt so groß wie bei 20°C . Erhöht sich der Partialdruck, z.B. mit zunehmender Tiefe eines Sees (der Druck nimmt je 10m Wassertiefe um 1bar zu), dann erhöht sich auch die Löslichkeit des Gases. Da die Diffusionsgeschwindigkeit von CO_2 in Wasser jedoch sehr gering ist und eine signifikante Zufuhr von CO_2 nur an der Grenzfläche Atmosphäre/Wasser Oberfläche erfolgt, hat die erhöhte Löslichkeit in der Tiefe keinen Einfluss auf die Gesamtmenge an gelöstem CO_2 im Wasserkörper. Das Gas gelangt lediglich mit der Frühjahrs- und Herbstzirkulation in das Hypolimnion (untere Wasserschicht) (Lampert und Sommer, 1993).

1.2.2 Das Kalk-Kohlensäure-Gleichgewicht

Nach dem Henryschen Gesetz (1) wird die Löslichkeit eines Gases durch den Löslichkeitskoeffizienten des Gases (K) und durch seinen Partialdruck (P_T) bestimmt. Kohlendioxid löst sich aber mehr, als nach den Berechnungen möglich wäre. Der Grund liegt darin, dass das Gas nicht nur als solches gelöst vorliegt, sondern dass es zu Kohlensäure hydratisiert:



¹ 1bar ist der zehnte Teil eines Megapascals: 1bar = 100kPa

Abb. 2 zeigt die relativen Anteile der unterschiedlichen Kohlenstoff-Formen bei verschiedenen pH-Werten. Die Kohlensäure ist eine recht instabile Säure, die sehr schnell wieder zerfällt. Ihr Dissoziationsgrad ist vom pH des Gewässers abhängig. Bei pH 8 liegt das Gleichgewicht eher auf der rechten Seite der Gleichung beim Hydrogenkarbonat. Steigt der pH weiter an, dann finden sich immer mehr Karbonat-Ionen im Wasser. Bei niedrigen pH-Werten liegt überwiegend freies $\text{CO}_{2(\text{aq})}$ und in geringen Mengen ($< 1\%$) Kohlensäure vor (Lampert und Sommer, 1993).

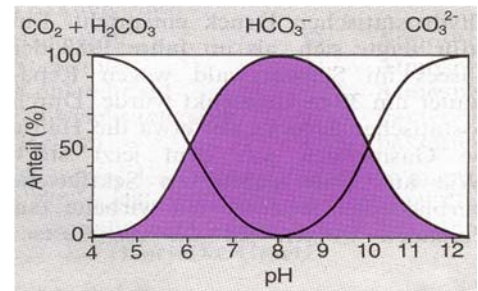


Abb. 2: Relative Anteile der verschiedenen Formen des CO_2 bei unterschiedlichen pH-Werten (Lampert und Sommer, 1993)

In vielen Gewässern kann das Karbonat mit Alkali- und Erdalkalimetallen schwerlösliche Salze bilden, so dass dem Gleichgewicht (2) CO_3^{2-} entzogen wird. Dadurch kann neues CO_2 gelöst werden. So kommt es, dass sich mehr CO_2 im Wasser löst, als es nach den Berechnungen mit dem Henryschen Gesetz möglich wäre. Die Metallionen, die mit dem Karbonat Verbindungen eingehen, sind vor allem Mg^{2+} und Ca^{2+} . Solange eine geringe Menge an Kohlensäure im Wasser vorliegt, d.h., der pH nicht zu weit ansteigt, verbinden sich diese Ionen mit HCO_3^- und bilden z.B. das leicht lösliche $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$. Wird die Kohlensäure jedoch verbraucht, so steigt der pH an und es bildet sich schwerlösliches CaCO_3 , das ausfällt. Dies kann in kalkreichen Seen passieren, wenn z.B. bei hoher Lichtintensität die Photosyntheserate der Wasserpflanzen hoch ist und die Pflanzen dem Wasser daher viel CO_2 entziehen. Dann fällt unlösliches CaCO_3 aus und lagert sich auf den Blättern ab. Man spricht von einer biogenen Entkalkung. Wird dem System aber CO_2 zugeführt, z.B. nachts durch die Pflanzenatmung, so löst sich das Karbonat wieder, und zwar so lange, bis das gelöste CO_2 bzw. die Kohlensäure verbraucht ist. Der pH sinkt dabei langsam (Schmidt, 1978).

Das Kalk-Kohlensäure-Gleichgewicht ist verantwortlich für das Puffervermögen eines Gewässers. Kalkarme Gewässer sind meist schwach gepuffert. Wird ihnen CO_2 durch die Photosynthese entzogen, dann kann der pH auf 9, bei HCO_3^- -Verbrauch sogar auf 11 steigen, so dass es zu tagesperiodischen pH-Schwankungen kommt. Kalkreiche Gewässer haben einen pH zwischen 7 und 8. Bei CO_2 -Entzug verschiebt sich das Gleichgewicht zum unlöslichen CaCO_3 und CO_2 kann nachgeliefert werden. Der pH-Wert bleibt so lange stabil, bis alles CO_2 aufgebraucht ist (Lampert und Sommer, 1993).

1.3 Anpassungen von submersen Makrophyten und Algen

Das Problem von submersen Pflanzen, die Photosynthese betreiben, liegt nicht (wie bei den Landpflanzen) im Wassermangel und auch nicht in den oftmals geringeren Lichtintensitäten ihrer Standorte. Ihre Schwierigkeiten liegen vor allem in der Aufnahme von ausreichend CO_2 und der möglichst raschen Abgabe von O_2 (van Ginkel und Prins, 1998). In einem mit der Atmosphäre im Gleichgewicht stehenden Süßgewässer, bei einem pH zwischen 7.0 und 8.5, liegt die Gesamtkonzentration an gelöstem Kohlenstoff je nach Temperatur zwischen 0,2 und 2,5mM (Sand-Jensen, 1983; van Ginkel und Prins, 1998). Die Menge an CO_2 ist in etwa die Gleiche, wie in dem entsprechenden Volumen der Luft (Madsen und Sand-Jensen, 1991). Meerwasser hat einen pH von etwa 8.2, d.h., mehr als 95% des anorganischen Kohlenstoffs liegt in Form von Bikarbonat vor. Es hat dadurch eine ca. 50-mal höhere Konzentration an gelöstem anorganischen Kohlenstoff, als CO_2 in der Atmosphäre vorkommt (Falkowski und Raven, 1997).

Trotzdem ist CO_2 der limitierende Faktor bei der Photosynthese von Wasserpflanzen. Die verminderte Verfügbarkeit von CO_2 liegt in seiner 10 000-mal geringeren Diffusionsgeschwindigkeit in Wasser (nur $10^{-5}\text{cm}^2/\text{s}$). Die Viskosität des Wassers, zusammen mit der Diffusionsbarriere, die die Grenzschicht an den Blattoberflächen von Wasserpflanzen darstellt, tragen dazu bei (Jahnke et al., 1991).

Um diesen Nachteil zu kompensieren, haben sich bei submersen Wasserpflanzen verschiedene Strategien entwickelt, die Bestandteil zahlreicher Untersuchungen waren. Schmidt (1978) teilte die Unterwasserpflanzen, in Bezug auf die CO_2 -Aufnahme, in drei Gruppen ein:

- a) In den Quellmoos-Typ, der nur das im Wasser gelöste CO_2 aufnehmen kann. Dazu zählte er Rotalgen, einige Grünalgen und Wassermoose, sowie Wasserfarne wie *Isoetes spec.*, und Blütenpflanzen wie *Callitriche spec.*, *Myriophyllum verticillatum*, *Lobelia spec.* und *Cabomba spec.* Diese Pflanzen leben in Gewässern, deren pH niedriger ist als 7.
- b) In den Wasserpest-Typ, der neben CO_2 auch HCO_3^- nutzen kann und dafür OH^- an seine Umgebung abgibt. Dazu zählte er *Myriophyllum spicatum*, verschiedene Laichkrautarten, *Ceratophyllum demersum*, *Ranunculus penicillatus*, verschiedene *Elodea*-Arten, *Vallisneria spiralis* sowie einige Grünalgen (z.B. *Chara fragilis*).
- c) Ein dritter Typ ist der Scenedesmus-Typ. Bei dieser planktischen Grünalge dominiert die HCO_3^- -Aufnahme.

In den darauf folgenden Jahren untersuchten verschiedene Arbeitsgruppen die unterschiedlichen Aufnahmemechanismen von HCO_3^- und CO_2 bei submersen Makrophyten genauer. 1985 beschrieben Lucas und Berry die unterschiedlichen Aufnahmewege von Kohlenstoff bei Cyanobakterien, Mikro- und Makroalgen sowie aquatischen Angiospermen. Sie zeigten einen aktiven Transport von DIC (dissolved inorganic carbon) durch die Zellmembran auf, sowie das mögliche Vorhandensein einer extrazellulären Kohlendioxidanhydrase bei Algen.

1.3.1 Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff bei Cyanobakterien und Algen

Im Hinblick auf die Kohlenstoffaufnahme wurden neben den Cyanobakterien (Procaryoten) vor allem die Algen genauer untersucht. Dabei waren in erster Linie die Chlorophyta (Grünalgen) Bestandteil einiger Untersuchungen, da sie mit höheren Pflanzen viele Gemeinsamkeiten aufweisen, wie z.B. das Vorhandensein von Chloroplasten-stärke und Zellwänden, die aus Zellulose und Pektin bestehen (Streble und Krauter, 1988).

Bei Cyanobakterien, wie z.B. *Synechococcus spec.* und *Anabaena variabilis* (Badger und Andrews, 1982, Badger et al., 1978; Kaplan et al., 1980) wurden Untersuchungen zur Aufnahme und Fixierung von Kohlenstoff durchgeführt. So wurde z.B. bei *Anabaena variabilis* ein Carrier in der Plasmamembran entdeckt, der sowohl CO_2 als auch HCO_3^- transportieren soll (Kaplan, 1985).

Die Untersuchungen von verschiedenen Mikroalgen zeigten unterschiedliche Mechanismen zur HCO_3^- -Nutzung. Bei Untersuchungen an verschiedenen *Chlorella*-Arten wurden keine Spuren einer externen Kohlendioxidanhydrase-Aktivität gefunden (Matsuda et al., 1999). Tsuzuki et al. (1985) zeigten, dass diese Grünalgen entweder CO_2 oder HCO_3^- aufnehmen. In *Clamydomonas reinhardtii*, ebenfalls eine Grünalge, wurden Komponenten eines sog. „carbon concentrating mechanism“ (CCM) entdeckt, durch den ein aktiver CO_2 - und HCO_3^- -Transport durch die Plasmamembran ermöglicht

wird und wobei die Aktivität einer Kohlendioxidanhydrase im periplasmatischen Raum² eine Rolle spielen soll (Bozzo und Colman, 2000).

Bei Characeen hat man ebenfalls eine Aufnahme von HCO_3^- festgestellt (Lucas, 1983). Es wurden bei diesen Makroalgen zwei Hauptmodelle für die Aufnahme diskutiert, die beide einen Protonengradienten an der Plasmamembran voraussetzen, der durch eine ATPase erzeugt wird. Nach dem einen Modell erfolgt ein Plasmamembran-gebundener Co-Transport für HCO_3^- und H^+ (Lucas, 1985), die andere Theorie postuliert eine Dehydratation von HCO_3^- durch eine Ansäuerung der Grenzschicht um die Alge (Walker et al., 1980) oder des periplasmatischen Raumes (Price und Badger, 1985) und die nachfolgende Diffusion des CO_2 in das Cytoplasma. Auch die Rolle von Charasomen bei der Kohlenstoffaufnahme wurde diskutiert. Während Franceschi und Lucas (1980) sowie Price und Whitecross (1983) vermuteten, dass diese eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von DIC spielen, widerlegten Lucas et al. (1989) die Notwendigkeit von Charasomen bei der photosynthetischen Nutzung von exogenem HCO_3^- bei *Chara corallina*.

Auch bei der Rotalge *Gracilaria gaditana* wurden die Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff und die Wirkung des CCM untersucht. So wurde mit Hilfe von Hemmversuchen und potentiometrischen Methoden festgestellt, dass die Alge zwei Aufnahmemechanismen für DIC hat, die unterschiedlich sensitiv sind. Neben einem „Anionenaustauscher“, der DIC aufnimmt, ist die indirekte Aufnahme von HCO_3^- durch die Aktivität einer externen Kohlendioxidanhydrase der Hauptaufnahmeweg (Andria et al., 1999).

1.3.2 Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff bei Süßwassermakrophyten

Über die Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff bei submersen Makrophyten sind viele Artikel verfasst worden. Schon 1833 machte sich Raspail Gedanken über die CaCO_3 -Niederschläge auf den Blättern von Wasserpflanzen und brachte sie mit einer Entnahme von Kohlensäure aus dem Medium in Verbindung. 1933 führte Arens mit dem Indikatorfarbstoff Phenolphthalein Versuche an Wasserpflanzen wie *Elodea*, *Najas* und *Potamogeton* durch und konnte deren physiologische Polarität nachweisen und beschreiben. Dass submerse Makrophyten, ebenso wie die Algen, in der Lage sind, HCO_3^- als Kohlenstoffquelle zu nutzen, war bald klar, nur über die Aufnahmewege gibt es bis heute unterschiedliche Meinungen.

1989 befasste sich Elzenga ausführlich mit der Nutzung von HCO_3^- bei Wasserpflanzen. Er zeigte bei Algen für HCO_3^- unterschiedliche Aufnahmewege, die von einem aktiven Transport bis zur Aktivität einer externen Kohlendioxidanhydrase reichte. Für polare submerse Makrophyten griff er das Modell von Prins et al. (1982) auf, bei dem HCO_3^- durch Diffusion in den Apoplasten der Blattunterseiten gelangt, und dort durch H^+ -Ionen in CO_2 umgewandelt wird. Die Protonen werden mittels einer ATPase nach außen gepumpt. Gleichzeitig erfolgt ein apoplastischer oder symplastischer K^+ -Transport quer durch das Blatt. Die Protonenabgabe an der Blattunterseite wird durch die Abgabe von OH^- -Ionen an der Blattoberseite ausgeglichen. In einem weiteren Artikel beschrieben Prins und Elzenga (1989) eine „unstirred layer“, eine Grenzschicht an den Blattoberflächen, die je nach Wasserturbulenzen und Pflanzenart zwischen 10 und 500 μm dick sein kann. In dieser Schicht diffundiert CO_2 und HCO_3^- vom Wasserkörper hinein und O_2 hinaus. Sie ist es, die durch die Abgabe von Protonen angesäuert wird.

² Lt. Angaben von Coleman und Grossman (1984) und Miyachi et al (1985) ist dies der Raum zwischen Zellwand und Plasmamembran

Hier und in der Zellwand finden alle Umwandlungsprozesse von HCO_3^- in CO_2 statt. In weiteren Arbeiten befassten sich z.B. Miedema und Prins (1992) mit dem Protonenflux an der Membran bei unterschiedlichen Beleuchtungsstärken.

Wie die Nutzung von HCO_3^- an polaren Blättern von submersen Makrophyten erfolgt, scheint weitgehend geklärt zu sein. Wie der Mechanismus aber bei nicht polaren Blättern aussieht, die nachweislich ebenfalls HCO_3^- nutzen können (Prins et al., 1982), ist noch nicht restlos geklärt.

1.3.3 Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff bei Seegräsern

Bei einem pH-Wert von etwa 8.3 liegt der größte Anteil an anorganischem Kohlenstoff in den Ozeanen in Form von Bicarbonat vor. Nach Berechnungen mit dem Henryschen Gesetz (1) kommt etwa 50-mal mehr gelöster anorganischer Kohlenstoff in den Meeren vor, als CO_2 in der Atmosphäre (Falkowski und Raven, 1997). Daher erscheint es naheliegend, dass sowohl Salzwasseralgen, als auch die Seegräser diese Kohlenstoffquelle zu nutzen wissen.

In Untersuchungen über die Kohlenstoffassimilation bei *Posidonia oceanica* stellten Modigh et al. (1998) fest, dass die maximale Kohlenstoffassimilation im Februar stattfand, wenn der epiphytische Bewuchs auf den Pflanzen am geringsten war. Ebenso konnten sie nachweisen, dass das Gewebealter und die Position des Blattes an der Pflanze Einfluss auf die Assimilationskapazität hatte. Dagegen schien die Tiefe nur einen geringen Einfluss darauf zu haben.

Andere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Aufnahme von Bikarbonat als Kohlenstoffquelle bei *Posidonia oceanica* und *Cymodocea nodosa*. Invers et al. (1999) versuchten eine Verbindung zwischen einer Kohlensäureanhydrase-Aktivität und der Bicarbonat-Aufnahme herzustellen. Sie hemmten die Anhydrase mit Acetazolamid (AZ) und maßen dann die Netto-Sauerstoff-Freisetzung. Dabei kamen sie letztendlich zu dem Schluss, dass in Seegräsern ein Mechanismus zur direkten, aktiven Bikarbonat-Aufnahme keine signifikante Rolle für den Erwerb von Kohlenstoff spielte.

1.4 Transportvorgänge an Membranen

Eine elementare Aufgabe von Membranen ist die Kontrolle über den Ein- und Austritt von Ionen und niedermolekularen Verbindungen an den Zellgrenzen. Dazu dienen membranspezifische Vorrichtungen, wie Pumpen, Kanäle und Carrier (Lüttge und Higinbotham, 1979). Neben dem Transport von Substanzen durch die Membranen wird an ihr auch ein Ionengradient aufgebaut und aufrechterhalten (Alberts et al., 1995).

Damit anorganischer Kohlenstoff zu den Chloroplasten in den Zellen gelangen kann, muss er die Plasmamembran durchdringen. Kleine unpolare Moleküle wie CO_2 und O_2 können sich, gemäß einem Verteilungskoeffizienten in der Membran „durchlösen“ (Munk, 2000). Auch polare, ungeladene Moleküle diffundieren, wenn sie klein genug sind (bis ca. 60Da), durch die Lipiddoppelschicht. Bei diesen passiven Transportvorgängen werden die ungeladenen Moleküle nur aufgrund eines Konzentrationsgradienten transportiert. Ionen, unabhängig von ihrer Größe, steht dieser Weg nicht zur Verfügung (Alberts et al., 1995). Sie können durch einen elektrochemischen Gradienten (Konzentrationsgradient und elektrische Potentialdifferenz) durch die Membran gelangen. Neben diesen passiven Transportvorgängen können die Zellen benötigte Moleküle auch aktiv, entgegen einem elektrochemischen Gradienten durch die Membran pumpen. Dazu sind Carrier-Proteine mit einer Energiequelle gekoppelt (z.B. Energiegewinnung durch ATP-Hydrolyse), oder

es sind Pumpen am Transport beteiligt, welche die Moleküle aktiv nach innen transportieren (Richter, 1996).

Solche Pumpen können entweder als elektrogen (eine Netto-Ladung fließt über die Membran) oder elektroneutral (keine Netto-Bewegung von Ladung) charakterisiert werden. Das Pumpen von H^+ -Ionen durch die Plasmamembran bei Pflanzen, Pilzen und Bakterien und durch den Tonoplast erfolgt elektrogen (Taiz und Zeiger, 2000). Für den Aufbau einer solchen elektrochemischen Potentialdifferenz mit H^+ -Ionen ist an der Plasmamembran eine H^+ -ATPase vom P-Typ verantwortlich und an der Vakuolenmembran eine vom V-Typ, sowie eine H^+ -PPase (H^+ -Pyrophosphatase). Neben Protonen werden bei Pflanzen nur noch Ca^{2+} -Ionen durch Pumpen transportiert. Andere Stoffe werden entgegen einem elektrochemischen Potentialgradienten durch einen Carrier-vermittelten Cotransport transportiert, der indirekt durch Pumpen angetrieben wird (Taiz und Zeiger, 2000).

ATPasen sind Enzyme, welche die Energie eines Protonengradienten (proton motif force = pmf) erzeugen (Skulachev, 1994). Sie koppeln eine ATP-Hydrolyse mit einem Transport von H^+ -Ionen durch die Membranen in den Apoplasten (Palmgren, 1998). Man teilt sie aufgrund ihres Aufbaus und ihres Vorkommens in drei Typen ein, in die V-Typ-ATPasen, die F-Typ-ATPasen/Synthasen und die P-Typ-ATPasen.

1.4.1 Die V-Typ- und F-Typ- H^+ -ATPasen

V-Typ- H^+ -ATPasen (vakuoläre ATPasen) (Abb. 3) sind entfernt verwandt mit den F-Typ- H^+ -ATPasen (fraktionierte ATPasen). Es handelt sich bei beiden um große, multi-heteromere Enzyme mit einem Molekulargewicht um 500kDa. Sie bestehen aus einem integralen Membran-Teil (V_0 , F_0) und einem hydrophilen katalytischen Komplex (V_1 , F_1). Dieser hydrophile Komplex ist in fünf Untereinheiten aufgeteilt (A-E). Die katalytische Seite, ein Hexamer, besteht aus drei A-Untereinheiten und drei B-Untereinheiten, welche das ATP binden und hydrolysieren (Palmgren, 1998).

V-Typ- H^+ -ATPasen findet man im Tonoplasten von Pflanzen und Pilzen, wo sie H^+ -Ionen in die Vakuolen transportieren und dadurch eine treibende Kraft für verschiedene Transportsysteme durch den Tonoplasten entsteht (Sze et al, 1992).

Im Gegensatz dazu findet man die F-Typ- H^+ -ATPasen in der Plasmamembran von Eubakterien und bei Eucaryoten in den inneren Membranen von Mitochondrien (F_0F_1 -ATPase) und Chloroplasten (CF_0CF_1 -ATPase) (Sze, 1985). Sie synthetisieren unter physiologischen Bedingungen ATP, unter Ausnutzung der protonenmotorischen Kraft (pmf), so dass sie eigentlich als ATP-Synthasen bezeichnet werden müssen.

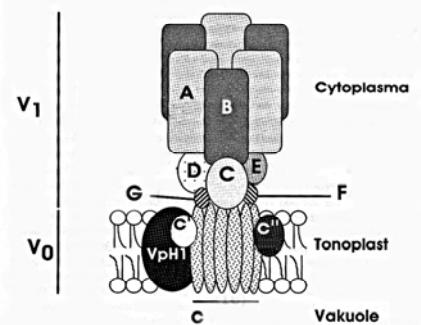


Abb. .3: V-Typ- H^+ -ATPase einer Hefe (A-E sind Untereinheiten der V_1 Domäne; c, c' und c'' sind Untereinheiten der V_0 Domäne); Kettner, 1999

1.4.2 P-Typ-ATPase

Die PM-H⁺-ATPase im Plasmalemma von Pflanzen zählt zu den P-Typ-ATPasen. Das P stammt aus dem Wort Phospho-Aspartyl-Intermediat, welches während der ATP-Hydrolyse als Zwischenprodukt entsteht (Dame und Scarborough, 1980). Die P-Typ-H⁺-ATPase unterscheidet sich von den V-Typ- und F-Typ-ATPasen hinsichtlich ihrer Biochemie, dem Aufbau der Untereinheiten, ihrem Arbeitsmechanismus und in ihrem evolutionären Ursprung (Palmgren, 2001). Sie besteht aus einem einzelnen Polypeptid mit einem Molekulargewicht von rund 100kDa, welches 10 Transmembrandurchgänge (M) aufweist und so intra- und extrazelluläre Schleifen bildet (Abb. 4).

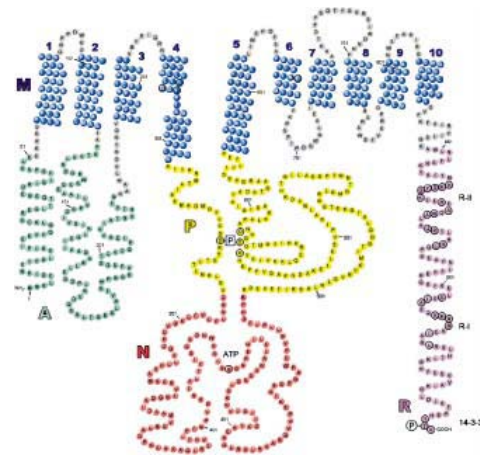


Abb. 4: P-Typ-PM-H⁺-ATPase vom IIB-Typ (Palmgren, 2001)

Im Cytosol bildet das Protein eine große N-Domäne (in anderen Veröffentlichungen als C-Domäne bezeichnet) mit einer seitlichen Ausbuchtung, die als „hinge“-Region (Van Winkle, 1999) beschrieben wird, eine A-Region mit dem N-terminalen Ende des Proteins und das C-terminale Ende des Proteins, das als R-Domäne bezeichnet wird (Palmgren, 2001).

Die P-Typ-ATPasen bilden eine große Gruppe von Kationen-Pumpen, die alle durch Vanadat gehemmt werden können (Palmgren 2001). Sie entstammen alle dem selben Ursprung, nämlich aus „alten“ Procaryoten. Sie haben sich schon früh in zwei Typen aufgeteilt, in Typ I und Typ II (Abb. 5). Daraus entwickelten sich die unterschiedlichen, heute existierenden P-Typ-ATPasen. Dazu zählen u.a. die H⁺-ATPasen in den Plasmamembranen der Pilze, die Na⁺/K⁺-ATPase in tierischen Zellen und die bakterielle K⁺-ATPase (Palmgren, 2001). Die PM-H⁺-ATPase in Pflanzenzellen zählt zum Typ IIB der H⁺-ATPasen (Møller et al., 1996).

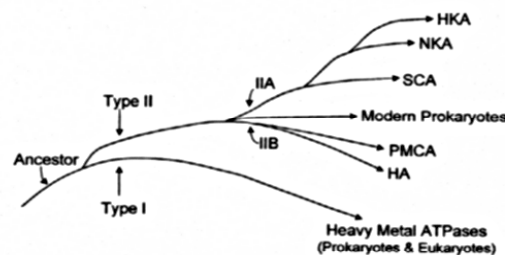


Abb. 5: Die Entwicklung der P-Typ ATPasen (Van Winkle, 1999)

Die Gen-Familie der PM-H⁺-ATPase ist viel umfassender. Allein in *Arabidopsis thaliana* wurden bis heute 12 Gene für verschiedene Isoformen der H⁺-ATPase gefunden, in *Nicotiana plumbaginifolia* waren es 9 (Oufattole et al., 2000). Die Isoformen kommen in unterschiedlichen Pflanzenteilen und Geweben vor. So findet man z.B. die von AHA3 codierte Isoform der PM-H⁺-ATPase im Leitgewebe der Blätter von *A. thaliana* (Palmgren, 2001).

Die PM-H⁺-ATPase verbindet eine ATP-Hydrolyse mit einem Protonentransport aus dem Cytoplasma in den Apoplasten (Møller, et al, 1996). Durch die Hydrolyse von einem ATP wird ein H⁺-Ion transportiert (Briskin und Reynolds-Niesman, 1991). Dadurch wird sowohl ein elektrischer, als auch ein chemischer Protonengradient aufgebaut. So können z.B. mit Hilfe von verschiedenen Carriern, die von der protonenmotorischen Kraft (pmf) abhängig sind, Aminosäuren und Zucker transportiert werden (Palmgren, 1998).

Neben dem Transport von Nährstoffen ist die PM-H⁺-ATPase auch am Pflanzenwachstum beteiligt, sie spielt eine Rolle bei der Salztoleranz von Pflanzen, reguliert den intrazellulären pH und das Zellwachstum (Michelet und Boutry, 1995). Sie ist an der Phloembeladung beteiligt (Parets-Soler et al., 1990) und bei der Regulation

des stomatalen Öffnungsmechanismus (Becker et al., 1993). Auch bei der Aufnahme von Nährstoffen aus dem Boden durch die Wurzeln (Jahn et al., 1998) und beim Spitzenwachstum, z.B. in Pollenschläuchen und Wurzelhaaren (Obermeyer et al., 1992; Weisenseel et al., 1979) ist sie beteiligt.

Bei der Regulation der PM-H⁺-ATPase Aktivität spielt das C-terminale Ende des Proteins als selbsthemmende Regulationsdomäne eine wichtige Rolle (Palmgren 2001). Vermutlich wird diese R-Domäne durch einen molekularen Mechanismus verschoben und so die Pumpe aktiviert, sowie die Affinität für ihre Liganten erhöht (Palmgren, 1991). Dies kann z.B. durch Wechselwirkungen mit Lysophospholipiden und durch Abbruchprodukte der Phospholipid-Hydrolyse durch eine Phospholipase erfolgen (Palmgren et al., 1991). Daran beteiligt ist ein Regulationsprotein, das 14-3-3 Protein (Fu et al., 2000), welches an der R-Domäne nur anbindet, wenn an der Bindungsstelle entweder ein Serin (Ser) oder ein Threonin (Thr) phosphoryliert ist (Svennelid et al., 1999). Durch Zuführung von Fusicoccin wird die Bindung des 14-3-3 Proteins stabilisiert, so dass die Aktivität der PM-H⁺-ATPase durch dieses Phytotoxin des Pilzes *Fusicoccum amygdali* erhöht wird (Olivari et al., 1998; Sitte et al., 1998).

Auch verschiedene andere Faktoren führen durch Phosphorylierung zu einer Aktivierung der PM-H⁺-ATPase, wie z.B. der Einfluss von Hormonen, Licht (Blaulicht), Nährstoffen, und der pH des Cytoplasmas (Malerba und Bianchetti, 2001). Andere Einflüsse bewirken durch eine Dephosphorylierung eine Hemmung der PM-H⁺-ATPase-Aktivität, wie z.B. durch eine Protein-Phosphatase (Camoni et al., 2000). Im Gegensatz dazu gibt es aber auch Berichte, in denen die PM-H⁺-ATPase durch Phosphorylierung gehemmt und durch Dephosphorylierung aktiviert wurde (Desbrosses et al., 1998; Vera-Estrella et al., 1994).

1.5 Der monoklonale Antikörper 46E5B11

Im Rahmen seiner Dissertation stellte Lützelschwab 1990 an der Albert-Ludwig Universität in Freiburg unter anderem einen monoklonalen Antikörper (46E5B11) her, der sich gegen die 97kDa PM-H⁺-ATPase in Hypocotylen von *Cucurbita pepo* richtete. Durch Kreuzreaktionen mit verschiedenen *Arabidopsis*-Isoformen, die in Hefezellen exprimiert wurden, konnte festgestellt werden, dass er an drei Isoformen (AHA1-3) bindet (Palmgren und Christensen, 1994).

In weiteren Untersuchungen von Lützelschwab (1990) wurde die polare Verteilung der PM-H⁺-ATPase in *Elodea canadensis* mit Hilfe dieses Antikörpers genauer untersucht, nachdem man an ihrem Blatt starke Ansäuerungen an der Blattunterseite beobachtet hatte (Prins et al., 1980; Prins et al., 1982). 1991 kam er bei der Lokalisation der PM-H⁺-ATPase in Mais-Kotyledonen zum Einsatz (Villalba et al., 1991). Von Baur et al. (1996) wurde der Antikörper bei der Untersuchung der Verteilung der PM-H⁺-ATPase in Blättern und Stängeln von *E. canadensis* mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Methoden eingesetzt. Diese Arbeit war u.a. der Anlass für die hier durchgeführten Untersuchungen. Der monoklonale Antikörper 46E5B11, wurde uns von Dr. Michalke vom Institut für Biologie III der Albert-Ludwig-Universität in Freiburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

1.6 Ziele der Arbeit

Einige submerse Angiospermen und eine Vielzahl von Algen haben die Fähigkeit erworben, HCO_3^- als zusätzliche Kohlenstoff-Quelle zu nutzen. Dafür haben sie unterschiedliche Wege entwickelt. Während bei Algen eine aktive Aufnahme von HCO_3^- durch Carrier und die Aktivität einer Kohlensäureanhydrase außerhalb der Zellen oder im Plasmalemma postuliert wird, haben die Angiospermen vermutlich andere Wege beschritten (Lucas und Berry, 1985). Bei manchen submersen Angiospermen findet man Blätter, die eine physiologische Polarität aufweisen. Durch das Ansäuern einer Blattseite wird das $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -Gleichgewicht in Richtung CO_2 verschoben. Dies kann dann passiv durch die Zellwände und die Plasmamembran diffundieren. Als Ausgleich für die Ansäuerung an einer Blattseite wird die andere Seite alkalisch. Eine Nutzung von HCO_3^- als Kohlenstoff-Quelle fand man jedoch nicht nur bei submersen Angiospermen mit polaren Blättern. Auch zahlreiche andere Submersophyten, deren Blätter keine physiologische Polarität aufwiesen, waren in der Lage, HCO_3^- zu nutzen, wie z.B. *Myriophyllum spicatum*.

Messungen von Weisenseel und Linder (1990) mit einer 3-D-Schwingelektrode zeigten polare Strömungsmuster an den Blättern von *Elodea canadensis*. An der adaxialen Seite drangen positive Ströme in die Blattoberfläche ein und verließen sie an der abaxialen Blattseite wieder. Weisenseel und Linder (1990) stellten dadurch fest, dass die Blätter von *E. canadensis* H^+ -Ionen an der Blattunterseite nach außen pumpten und an der Blattoberseite für OH^- -Ionen durchlässig wurden.

Bei den fluoreszenzmikroskopischen Nachweisen der PM- H^+ -ATPase konnte diese in den unteren Epidermiszellen von *Elodea canadensis* nachgewiesen werden, während sie in den oberen Epidermiszellen fehlten (Lützelshwab, 1990; Baur et al., 1996). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die PM- H^+ -ATPase im direkten Zusammenhang mit dem Auftreten der Blattpolarität zu tun hat und mit der HCO_3^- -Nutzung in Zusammenhang steht.

Diese Untersuchungen waren der Anlass, mit dem monoklonalen Antikörper (46E5B11) auch bei anderen submersen Makrophyten nach der PM- H^+ -ATPase zu suchen. Folgende Fragen sollten im ersten Teil geklärt werden:

- Bei welchen Wasserpflanzen, die unterschiedlichsten Biotopen entnommen werden, zeigen die Blätter eine Polarität?
- Bei welchen Wasserpflanzen ist die 100kDa-PM- H^+ -ATPase in den Blättern nachzuweisen. Ist sie auch in nicht polaren Blättern zu finden?
- Wo genau kann die PM- H^+ -ATPase in den Blättern lokalisiert werden?
- Findet man die PM- H^+ -ATPase auch in den Stängeln und Wurzeln der Wasserpflanzen?
- Welche strukturellen Gemeinsamkeiten oder Unterschiede finden sich im Blattaufbau bei polaren und nicht polaren Blättern? Finden sich histologische Besonderheiten?
- Zeigen sich histologische Unterschiede im Bau von Blatt, Stängel und Wurzel zwischen rein submers lebenden Wasserpflanzen und Wasserpflanzen, die auch über der Wasseroberfläche assimilieren?

Im zweiten Teil der Arbeit werden die cytologischen Aspekte genauer untersucht. Der monoklonale Antikörper (46E5B11) soll auch in der Elektronenmikroskopie eingesetzt werden. Mit seiner Hilfe sollen eventuelle cytologische Besonderheiten in Blättern, Stängeln und Wurzeln mit der Lokalisation der PM- H^+ -ATPase in Zusammenhang

gebracht werden. Dazu muss jedoch als erstes eine geeignete Fixierung und eine brauchbare Einbettung gefunden werden, die sowohl den Strukturerhalt als auch die Antigenität der Proben gewährleistet. Folgende Fragen sollen dann beantwortet werden:

- Zeigen sich strukturelle Besonderheiten in den Blattzellen, in denen eine Markierung der PM-H⁺-ATPase gefunden wurde, gegenüber solchen Zellen, die keine aufweisen?
- Zeigt sich eine besondere Verteilung in der Lokalisation der PM-H⁺-ATPase in den einzelnen Zellen?

Zum Schluss soll noch untersucht werden, ob Veränderungen von äußeren Faktoren einen Einfluss auf das Vorhandensein dieser PM-H⁺-ATPase in den Blättern von submersen Makrophyten haben.

Ziel der Arbeit ist es, unter anderem mit Hilfe von licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen Zusammenhänge zwischen strukturellen und physiologischen Gegebenheiten bei submersen Makrophyten aufzuzeigen, die in unterschiedlichen Habitaten zu finden sind. Dabei steht die Fähigkeit der Nutzung von HCO₃⁻ als zusätzliche Kohlenstoff-Quelle für die Photosynthese im Vordergrund.

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

2.1.1. Allgemeine Auswahl

Die Gewässer und ihre Ufer werden von zahlreichen Pflanzen besiedelt, aus deren Artenvielfalt einige zur Untersuchung ausgewählt wurden. Die meisten davon zählen zu den Angiospermen, aber auch Bryophyten und Pteridophyten waren vertreten.

Nach Krausch (1996) werden die Wasserpflanzen (Hydrophyten) in Tauchpflanzen (Submersophyten) und Schwimmpflanzen (Natantophyten) unterteilt. Die Submersophyten werden weiter unterschieden in Unterwasserpflanzen (Demersophyten), die unter Wasser blühen und fruchten und in die Überwasserblüher (Emergentophyten), welche unter Wasser assimilieren und ihrer Blüten über die Wasseroberfläche hinaus schieben. Die Natantophyten assimilieren dagegen ganz oder zum größten Teil an der Wasseroberfläche und blühen auch dort. Sie lassen sich in frei treibende (errante) Wasserschwimmer und wurzelnde (radikante) Schwimmblattpflanzen unterteilen. Sumpfpflanzen (Helophyten) dagegen treiben ihre Blätter recht bald über die Wasseroberfläche und assimilieren dann an der Luft. Die Unterwasserblätter sterben schnell ab.

Zunächst wurden aus vielen Pflanzenfamilien Hydrophyten ausgesucht, um bei ihnen, mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers, das Vorhandensein und die Verteilung der 100kDa Plasmamembran (PM)-H⁺-ATPase immunfluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. Dieser erste Überblick sollte dazu dienen, eine engere Auswahl von Pflanzen zu treffen, die anschließend genauer untersucht werden sollten. Folgende allgemeine Kriterien wurden für die erste Auswahl zu Grunde gelegt:

- Es wurden in erster Linie Submersophyten ausgesucht. Es waren sowohl Vertreter der Demersophyten als auch der Emergentophyten bei der Auswahl dabei.
- Einige Natantophyten wurden ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen. Dabei waren sowohl errante als auch radikante Pflanzen vertreten.
- Da die Unterteilung zwischen Helophyten und Submersophyten nicht immer eindeutig ist, waren auch Sumpfpflanzen bei der Auswahl vertreten. Dabei handelte es sich immer um die Unterwasserformen von Tenagophyten (Seichtwasserpflanzen).

Die Auswahl der Pflanzen für die folgenden Untersuchungen erfolgte zunächst nach ihren Standorten. Mit Hilfe von Ettl et al. (1980) und Sebald et al. (1990) konnten sie folgenden Habitaten zugeordnet werden:

- Anthropogen entstandene, stehende Gewässer (Kiesgruben), mit einer Tiefe von mehr als 5m. Das Wasser ist meist nährstoff- und kalkreich und weist eine jahreszeitliche Schichtung auf.
- Stehende, nährstoffarme und kalkarme Gewässer, die mehr als 5m tief sind und ebenfalls eine Schichtung aufweisen.
- Ein Hügellandbach als Vertreter der Fließgewässer, mit klarem, nährstoff- und sauerstoffreichem Wasser. Er weist eine geringe Wassertiefe und eine mittlere Strömungsgeschwindigkeit auf.
- Die Küstengewässer des Mittelmeers bei Hyères (Südfrankreich).

2. Material und Methoden

Ein Großteil der gewählten Pflanzen konnte den Freilandbecken des Botanischen Gartens der Universität Karlsruhe entnommen (vgl. Tabellen 1-6). Dies hatte den Vorteil, dass aus einem freien, geschützten Bestand keine Pflanzen entnommen werden mussten, da viele einheimische Wasserpflanzenarten unter Naturschutz stehen. Zusätzlich standen die Pflanzen für die Versuche jederzeit zur Verfügung.

Die Pflanzen, die nicht aus dem Botanischen Garten bezogen werden konnten, wie z.B. *Posidonia oceanica*, ein Vertreter der Seegräser im Mittelmeer, mussten dem Freiland entnommen werden. Die Tabellen 1 bis 5 geben einen Überblick über die untersuchten Pflanzen und ihre Herkunft.

Tab. 1: Pflanzen aus stehenden, nährstoff- und kalkreichen Gewässern

Pflanzenname	Familie	Form	Entnahmeort
Callitriche palustris	Callitrichaceae (dicotyl)	Natantophyt (radikant)	Bot. Garten, Karlsruhe
<i>Ceratophyllum demersum</i>	Ceratophyllaceae (dicotyl)	Demersophyt	Bot. Garten, Karlsruhe
<i>Ceratophyllum submersum</i>	Ceratophyllaceae (dicotyl)	Demersophyt	Bot. Garten, Karlsruhe
<i>Elodea canadensis</i>	Hydrocharitaceae (monocotyl)	Emergentophyt	Bot. Garten, Karlsruhe
<i>Elodea nuttallii</i>	Hydrocharitaceae (monocotyl)	Emergentophyt	Kiesgrube „Streitköpfe“, Linkenheim- Hochstetten
<i>Myriophyllum spicatum</i>	Haloragaceae (dicotyl)	Emergentophyt	Bot. Garten, Karlsruhe
<i>Myriophyllum verticillatum</i>	Haloragaceae (dicotyl)	Emergentophyt	Kiesgrube „Epple See“, Forchheim (Karlsruhe)
<i>Najas marina</i>	Najadaceae (monocotyl)	Demersophyt	Kiesgrube „Streitköpfe“, Linkenheim- Hochstetten
<i>Potamogeton lucens</i>	Potamogetonaceae (dicotyl)	Emergentophyt	Bot. Garten, Karlsruhe
<i>Potamogeton natans</i>	Potamogetonaceae (dicotyl)	Natantophyt (radikant)	Bot. Garten, Karlsruhe
<i>Potamogeton perfoliatus</i>	Potamogetonaceae (dicotyl)	Emergentophyt	Bot. Garten, Karlsruhe
<i>Stratiotes aloides</i>	Hydrocharitaceae (monocotyl)	Natantophyt (errant)	Bot. Garten, Karlsruhe
<i>Utricularia sp.</i>	Lentibulariaceae (dicotyl)	Emergentophyt	Kiesgrube „Streitköpfe“, Linkenheim- Hochstetten

Tab. 2: Pflanzen aus stehenden, kalkarmen, mäßig nährstoffreichen Gewässern

Pflanzenname	Familie	Form	Entnahmeort
Isoëtes lacustris	Isoëtaceae (Pteridophyta)	Demersophyt	Titisee, Schwarzwald
<i>Lobelia cardinalis</i>	Campanulaceae (dicotyl)	Emergentophyt	Fachhandel: Gula, Aquaristik

2. Material und Methoden

Tab. 3: Sumpfpflanzen (nährstoffreiche, kalkreiche Gewässer)

Pflanzenname	Familie	Form	Entnahmeort
Mentha aquatica	Lamiaceae (dicotyl)	Tenagophyt	Bot. Garten, Karlsruhe
<i>Hippuris vulgaris</i>	Hippuridaceae (dicotyl)	Tenagophyt	Bot. Garten, Karlsruhe

Tab. 4: Pflanzen in Fließgewässern (Hügellandbach)

Pflanzenname	Familie	Form	Entnahmeort
<i>Ranunculus penicillatus</i>	Ranunculaceae (dicotyl)	Emergentophyt	Speyerbach bei Appenthal, Rheinland-Pfalz
Callitriche hamulata	Callitrichaceae (dicotyl)	Natantophyt	Speyerbach bei Appenthal, Rheinland-Pfalz

Tab. 5: Pflanzen im Salzwasser des Mittelmeers

Pflanzenname	Familie	Form	Entnahmeort
Posidonia oceanica	Potamogetonaceae (dicotyl)	Demersophyt	Küstengewässer bei Hyères (La Madrague), Südfrankreich

Der Zoo- und Aquarienfachhandel (Gula Aquaristik, Zoo-Dehner) bietet zahlreiche Wasserpflanzen für das Aquarium an. Hierbei handelt es sich sowohl um Hydro- als auch um Helophyten, die, laut Information des Vertreibers, zunächst in 100% Luftfeuchtigkeit angezogen und dann erst in Wasserbecken eingesetzt wurden. Einige davon wurden ausgewählt und ebenfalls untersucht.

Tab. 6: Aquarienpflanzen aus dem Fachhandel

Pflanzenname	Familie	Herkunft
Aponogeton distachyos	Aponogetonaceae (dicotyl)	Südafrika, Südfrankreich
<i>Bacopa japonica</i>	Scrophulariaceae (dicotyl)	Asien
<i>Cabomba caroliniana</i>	Cabombaraceae (dicotyl)	Mittelamerika
<i>Cryptocoryne beckettii</i>	Araceae (monocotyl)	Sri Lanka
<i>Hottonia inflata</i>	Primulaceae (dicotyl)	Südl. Nordamerika
<i>Isoëtes setacea</i>	Isoëtaceae (Isoëtopsida)	Mittelmeerraum
<i>Microsorium pteropus</i>	Polypodiaceae (Pteridophyta)	Südostasien
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	Haloragaceae (dicotyl)	Südamerika
<i>Rotala rofundifolia</i>	Lythraceae (dicotyl)	Südostasien
<i>Vallisneria spiralis</i>	Hydrocharitaceae (monocotyl)	tropischer Kosmopolit
<i>Fontinalis antipyretica</i>	Fontinaliaceae (Bryopsida)	Quellbäche, Europa

2.1.2 Spezielle Auswahl

Von den unter 2.1.1 aufgezählten Pflanzen wurden zunächst nur die Blätter immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht (vgl. 2.5.1 ff), um einen allgemeinen Überblick über das Vorkommen der PM-H⁺-ATPase (vgl. 1.4) zu erhalten. Danach wurden einige Vertreter verschiedener Familien und ihrer Habitats ausgewählt und genauer untersucht. Bei dieser Auswahl lagen folgende Kriterien zugrunde:

- Die Pflanzen konnten während der Sommermonate jederzeit den Freilandbecken des Botanischen Gartens oder ihrem natürlichen Standort entnommen werden.
- Sie konnten in den Wintermonaten in Aquarien in einem vitalen Zustand gehalten werden.
- Es sollten Hydrophyten oder Unterwasserformen von Helophyten untersucht werden, die von Anfang an unter Wasser wuchsen.
- Die Auswahl sollte verschiedene Standorte abdecken. Aus den unterschiedlichen Habitats sollten die Pflanzen miteinander verglichen werden.
- Aus einer Familie sollten mehrere Pflanzen stammen, um sie miteinander vergleichen zu können.

Aufgrund dieser Kriterien und nach den ersten immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden sechzehn Pflanzen ausgewählt. Tabelle 7 gibt Auskunft über die Pflanzen und ihre Standorte:

Tab. 7: Ausgewählte Hydrophyten

Pflanze	Vorkommen
<i>Cabomba caroliniana</i> (Grüne Haarnixe)	Stehende Gewässer, Tropen, nährstoffreich
<i>Callitriche hamulata</i> (Haken-Wasserstern)	Fließgewässer, nährstoffreich
<i>Ceratophyllum demersum</i> (Rauhes Hornblatt)	Stehende Gewässer, nährstoffreich
<i>Elodea canadensis</i> (Kanadische Wasserpest)	Stehende und fließende Gewässer, nährstoffreich
<i>Elodea nuttallii</i> (Nutalls Wasserpest)	Stehende und fließende Gewässer, nährstoffreich
<i>Hippuris vulgaris</i> (Tannenwedel)	Stehende Gewässer, nährstoff- und kalkreich
<i>Myriophyllum aquaticum</i> (Brasilianisches Tausendblatt)	Stehende Gewässer, Tropen
<i>Myriophyllum spicatum</i> (Ähriges Tausendblatt)	Stehende und fließende Gewässer, kalkreich
<i>Myriophyllum verticillatum</i> (Quirliges Tausendblatt)	Stehende Gewässer, kalkarm

Fortsetzung Tabelle 7: Ausgewählte Hydrophyten

Pflanze	Vorkommen
<i>Posidonia oceanica</i> (Neptungras)	Mittelmeer
<i>Potamogeton lucens</i> (Spiegel- oder glänzendes Laichkraut)	Stehende Gewässer, nährstoff- und kalkreich
<i>Potamogeton natans</i> (Schwimmendes Laichkraut)	Stehende und fließende Gewässer, nährstoffarm
<i>Potamogeton perfoliatus</i> (Durchwachsenes Laichkraut)	Stehende und fließende Gewässer, nährstoffreich
<i>Ranunculus penicillatus</i> (Pinselblättriger Wasserhahnenfuß)	Fließgewässer, nährstoffreich
<i>Stratiotes aloides</i> (Krebsschere oder Wasseralee)	stehende, flache Gewässer, nährstoffarm
<i>Vallisneria spiralis</i> (Schraubenvallisnerie)	Thermalwässer, warme Abwässer

2.2 Pflanzenbeschreibungen

Für die folgenden Beschreibungen der Arten wurden die nachstehenden Quellen benutzt: „Flora von Deutschland“ (Rauh und Senghas, 1988), „Farbatlas Wasser- und Uferpflanzen“ (Krausch, 1996) und die Bände 23 und 24 von „Süßwasserflora von Mitteleuropa“ (Casper und Krausch, 1980 a,b). Falls weitere Literatur eingesetzt wurde, ist dies an den entsprechenden Stellen vermerkt.

2.2.1 *Cabomba caroliniana* Gray

Die Grüne Haarnixe bildet eine eigene Familie, die Cabombaraceae. Ihre gabelig zerteilten Unterwasserblätter sitzen gegenständig am Stängel. Sie sind fünfteilig und diese Teile spalten sich nochmals in noch feinere Blattzipfel auf. Ihr Gesamtumfang ist fast rund. Die Schwimmblätter sind ganzrandig, rund geformt und ungeteilt (Brünner, 1953). Ihre Heimat ist das südliche Nordamerika. Man bekommt sie als Aquariumpflanze im Fachhandel oder findet sie in Europa z.B. in einigen Thermalwässern (Heviz, Ungarn).

2.2.2 *Callitriche hamulata* (Kützing)

Die Sprosse des Haken-Wassersterns, der zur Familie der Callitrichaceae gehört, werden zwischen 20 und 80cm lang und sind unter Wasser mit linearen, 10-24mm langen und 0,5-1,3mm breiten zarten Blättern besetzt, deren Spitzen etwas verbreitert und mit zwei zangenförmigen Ausstülpungen versehen sind. Sie bilden Schwimmblattrosetten aus, deren oval-löffelförmige Blätter wasserabweisend sind. Diese Demersophyten findet man meist in fließenden, klaren, kühlen, kalk- und nährstoffarmen Gewässern, da sie empfindlich gegen Verschmutzungen sind.

2.2.3 *Ceratophyllum demersum* L.

Das Rauhe Hornblatt gehört zur Familie der Ceratophyllaceae und zählt zu den Demersophyten. Es lebt frei schwimmend, ohne Wurzeln, in stehenden, nährstoffreichen Gewässern. Gelegentlich bilden sich farblose Rhizoide aus, mit denen es dann im Boden verankert ist. Seine 30-100cm langen Sprosse sind dicht beblättert, mit ein- bis zweimal gegabelten, hornartigen dunkelgrünen Blättern. Diese werden 15-25cm lang und stehen in 7-12 zähligen Wirteln am Spross. Die 2-4 zähligen primeligen Blattzipfel sind dicht gezähnt.

2.2.4 *Elodea canadensis* L.C. Richard in Michx. und *E. nuttallii* (Planch.) St. John

Die beiden Wasserpestarten gehören zur Familie der Hydrocharitaceae. Sie leben meist untergetaucht und sind im Boden fest verwurzelt. Man findet sie in stehenden und fließenden, nährstoffreichen Gewässern.

E. canadensis findet man sowohl in stehenden, als auch in fließenden Gewässern. Ihre 30-60cm langen Sprosse sind dicht mit 6-13mm langen und 1-5mm breiten, dunkelgrünen länglich-lanzettlichen Blättern besetzt, die in dreizähligen Quirlen stehen. Sie gehört zu den Emergentophyten, da sie ihre Blüten über die Wasseroberfläche hinaus schiebt. In Europa vermehrt sie sich allerdings nur vegetativ.

Die blassgrünen Blätter von *E. nuttallii* sind, im Gegensatz zu *E. canadensis*, dünner, schlaffer und etwas länger. Meist sind sie unregelmäßig in sich gedreht. Sie stehen in 3 zähligen Quirlen an einem bis zu 60cm langen Spross. Sie gehört ebenfalls zu den Emergentophyten und vermehrt sich hier in Europa auch generativ.

2.2.5 *Hippuris vulgaris* L.

Der Tannenwedel bildet eine eigene Familie, die Hippuridaceae. Es handelt sich dabei um eine Seichtwasserpflanze (Tenagophyt), die in ausreichender Wassertiefe zunächst Unterwasserformen ausbildet. An ihren röhrigen, rotbraunen 10-50cm langen Stängeln (in großen Tiefen bis zu 190cm lang) sitzen die 1,5-2,5mm breiten linearen, hellgrünen Blätter in 6-12 zähligen Quirlen. Man findet sie meist in flachen, stehenden, sommerwarmen Gewässern und Gräben, sowie an Ufern von Seen und Tümpeln, in denen sie wie Tannenbäume aus dem Wasser ragen.

2.2.6 *Myriophyllum spicatum* L.

Das Ährige Tausendblatt bildet mit anderen Tausendblattarten eine eigene Familie, die der Haloragaceae. Ihre rötlichen Stängel werden zwischen 40 und 275cm lang und verzweigen sich mäßig. Die einfach gefiederten Blätter haben 13-38 paarig angeordnete borstige Fiederzipfel und stehen in meist 4 zähligen Quirlen am Spross. Die zu den Emergentophyten zählenden Wasserpflanzen findet man in stehenden und fließenden, nährstoffarmen bis nährstoffreichen Gewässern in einer Wassertiefe von bis zu 5m.

2.2.7 *Myriophyllum aquaticum* (Velloso) Verdcourt (*M. brasiliense*, Cambess.)

Das Brasilianische Tausendblatt besitzt Stängel, die über 1m lang werden können. Sie tragen submers 3-5cm lange gelbgrüne Blätter, die in 4-6 zähligen Quirlen angeordnet sind. Die Blätter sind fiederförmig, beiderseits der Hauptrippe in 8-12 schmale spitze Zipfel geteilt, die 2-5cm lang werden.

Über Wasser sind die Stängel rund und dicker, mit derben, kürzeren, kräftigen und auffallend hellen, blaugrünen Blättern besetzt, die samtartig glänzen. Das Tausendblatt zählt zu den Tenagophyten und ist vor allem in Sümpfen und an Ufern von flachen Gewässern zu finden.

2.2.8 *Myriophyllum verticillatum* L.

Das Quirlige Tausendblatt gehört ebenfalls zur Familie der Haloragaceae. Seine Sprosse werden zwischen 50-200cm lang und verzweigen sich mäßig. Die einfach gefiederten Blätter sind mit 25-45mm Länge größer als die von *M. spicatum* und besitzen 25-30 lineare Fiederzipfel. Diese sitzen in 5-6 zähligen Quirlen am grünen Spross. Den Emergentophyt findet man in stehenden, nährstoffarmen und vor allem kalkarmen Gewässern (Wendelberger, 1986) in bis zu 3m Wassertiefe.

2.2.9 *Posidonia oceanica* (L.) Delile

Im Mittelmeer, um die Inseln von Hyères (Südfrankreich), kommen hauptsächlich vier Arten von Seegräsern vor. Die am häufigsten auftretende Art ist das Neptungras, *Posidonia oceanica* (Potamogetonaceae), das vor den Küsten regelrechte „Wiesen“ bildet. Es hat flache, lange dunkelgrüne 8-11mm breite Blätter, die bis zu 60cm lang werden können (Riedl, 1983). Sie sprießen aus einem rauhen faserigen Wurzelstock (Rhizom), der über Stolone mit anderen Pflanzen fest verbunden ist. Zusammen mit Sandeinlagerungen bilden sie eine dichte Matte auf dem Meeresboden. Die abgerissenen Blätter werden von den Wellen mit Sand vermengt und zu weichen braunen Bällen, den Seebällen geformt (Campbell, 1983). In seltenen Fällen treten bei den Demersophyten Blüten auf, die zwischen den langen Blättern sitzen. Meist verbreiten sie sich aber vegetativ über Ableger.

2.2.10 *Potamogeton natans* L.

Das Schwimmende Laichkraut zählt zur Familie der Potamogetonaceae. Es besitzt binsenähnliche bis linear-lanzettliche Tauchblätter, die bis zu 50cm lang und 1cm dick werden können. Sie sterben bis zur Blütezeit im Juni ab und es bleiben nur die Schwimmblätter übrig. Deren Blattspreite ist eiförmig bis länglich-elliptisch, mit einer Länge von 4-12cm und einer Breite von 5-7cm. Die vielnervigen Blätter haben ein lederartig-derbes, dunkel- bis bräunlichgrünes Aussehen. Die radikanten Natantophyten kommen in stehenden und fließenden, nährstoffarmen Gewässern vor und sind in einer Tiefe von bis zu 5m mit Wurzeln verankert.

2.2.11 *Potamogeton lucens* L.

Das Glänzende Laichkraut hat einen tief im Boden kriechenden Wurzelstock, aus dem ein 2-6m langer, meist verzweigter Stängel wächst. An ihm wachsen 10-25cm lange und 1-5cm breite, oval- bis länglich lanzettliche Blätter. Diese sind olivgrün bis gelbgrün, durchsichtig glänzend und am Rand leicht gesägt. Die Emergentophyten sind in stehenden oder langsam fließenden Gewässern in einer Tiefe von 0,5-3,5m zu finden.

2.2.12 *Potamogeton perfoliatus* L.

Das Durchwachsene Laichkraut hat ebenfalls einen kriechenden Wurzelstock, aus dem bis zu 6m lange Stängel wachsen. Die 6-12cm langen und 3,5-6cm breiten, rundlich bis eiförmig-länglichen dunkelgrünen Blätter haben einen herzförmigen Grund, der am Stängel sitzt und ihn umfasst. Die Emergentophyten kommen in stehenden und fließenden, nährstoffreichen Gewässern in einer Tiefe von 0,5-6m vor. Sie sind tolerant gegen leichte Verschmutzungen und geringe Sichttiefen.

2.2.13 *Ranunculus penicillatus* (Dumortier) Babington

Der Pinselblättrige Wasserhahnenfuß aus der Familie der Ranunculaceae hat dunkelgrüne bis zu 3m lange flutende Stängel. Die Tauchblätter sind mehr als vierfach gegabelt. Die Blattzipfel sind schlaff, fadenförmig und 0,5-1,5mm breit. Gelegentlich findet man nierenförmige bis halbrunde, 3-5 lappige Schwimmblätter. Die Emergentophyten sind in Bächen, Gräben und kleineren Flüssen zu finden, die nährstoffreich sein können.

2.2.14 *Stratiotes aloides* L.

Die Krebschere gehört zur Familie der Hydrocharitaceae. Es ist eine halb untergetauchte, halb schwimmende Wasserpflanze mit einer großen, trichterförmigen Blattrosette. Die 15-40cm langen und 0,5-7cm breiten Blätter sind steif, dreikantig und am Blattrand stachelig gesägt. Mit langen farblosen Rhizoiden können sie am Grund verankert sein. In stehenden, kleinen und flachen Gewässern handelt es sich um radikante Natantophyten. In kalkreichen, tiefen Klarwasserseen bleiben die Pflanzen in 2-5m Tiefe untergetaucht und kommen dort auch zur Blüte (Demersophyt).

2.2.15 *Vallisneria spiralis* L.

Die Schraubenvallisnerie oder Wasserschraube zählt zur Familie der Hydrocharitaceae. Sie hat grundständige, schmale, bandförmige, an der Spitze gezähnte Blätter, die bis zu 1m lang werden können. Die Emergentophyten bilden selten Blüten aus. Meistens verbreiten sie sich vegetativ durch die Ausbildung von Stolonen. Die aus dem tropischen bis subtropischen Amerika stammende Wasserpflanze findet man in Deutschland nur in einigen Thermalgewässern und im Bereich warmer Abwässer. Ansonsten ist sie auf beheizte Aquarien beschränkt.

2.3 Probennahme

Bei der Entnahme der Pflanzen sowie bei ihrem Transport wurde stets darauf geachtet, dass sie zu keiner Zeit austrockneten. Die Entnahme aus dem Freiland erfolgte am Vortag der Präparation. Bis zum Beginn der Versuche wurden sie im Labor in 50-Liter-Aquarien bei 20°C aufbewahrt und mit einer Beleuchtungsstärke von $140\mu\text{mol Quanten}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ (photosynthetisch aktive Strahlung) bestrahlt. *Callitriche hamulata* und *Ranunculus penicillatus*, die Pflanzen aus dem Hügellandbach, wurden in Wasser ihres Standortes ins Labor transportiert und dort in einem Klimaschrank bei 11°C mit einer Beleuchtungsstärke von $67\mu\text{mol Quanten}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ bis zur Präparation aufbewahrt. Das Wasser wurde während dieser Zeit ständig belüftet. Die marine Angiosperme *Posidonia oceanica* wurde, ebenfalls im Wasser ihres Standortes, in einer Kühlbox von Südfrankreich ins Labor transportiert und dort im Klimaschrank bei 11°C für kurze Zeit aufbewahrt. Die Entnahmen der Pflanzen aus den Becken des Botanischen Gartens fanden an den Tagen der Präparation statt. Sie wurden bis zur Präparation in Leitungswasser aufbewahrt.

Unmittelbar vor der Fixierung wurden die Pflanzen unter fließendem Leitungswasser gereinigt und dann präpariert.

2.4 Präparation des Pflanzenmaterials

Die Probennahme an den Blättern erfolgte zunächst aus der Mitte der Lamina (Abb. 6). Vereinzelt wurden auch Proben aus der Blattspitze und dem Blattrand entnommen. Da sich aus den daraus resultierenden Ergebnissen aber kein signifikanter Unterschied ergab, wurden die Proben bevorzugt aus der Mitte des Blattes entnommen. Der Blattstiel wurde, da er nicht bei allen Pflanzen deutlich zu erkennen war, nicht untersucht. Bei einigen Hydrophyten sind die Blätter bis zur Mittelrippe zerschlitzt, wie z.B. bei *Myriophyllum spicatum*. In diesem Fall wurden die Rhachis und die Blattfiedern getrennt präpariert und untersucht.

Bei den Pflanzenstängeln wurden die Internodien aus dem oberen Drittel der Pflanze entnommen. Sie wurden in 1-2mm große Abschnitte unterteilt und so weiter verarbeitet.

Die Hauptwurzeln von Wasserpflanzen gehen bald zugrunde und werden durch Beiwurzeln ersetzt, die aus dem Hypocotyl, dem Rhizom oder dem flutenden Stängel entspringen (von Guttenberg, 1968). Diese waren meist relativ dünn und lang und wiesen keine Wurzelhaarzonen auf. Daher wurden,

neben der Wurzelspitze, nur die nachfolgenden 5cm der Wurzel für die Präparation verwendet.

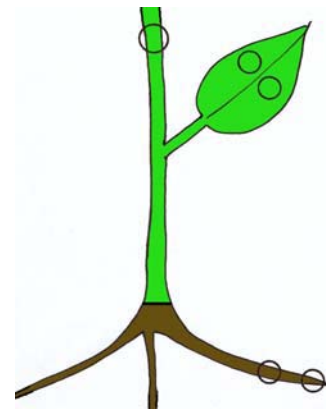


Abb. 6: Stellen der Probennahme

2.5 Lichtmikroskopische Untersuchungen

2.5.1 Fixierung und Einbettung für die Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit dem Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) wurden die Blätter, Stängel und Wurzeln zunächst in einer frisch hergestellten 4%igen Formaldehydlösung fixiert. Dazu wurden Paraformaldehyd und 3mM EGTA in 50mM PIPES bei 70°C gelöst. Der pH wurde auf 6.8 eingestellt (Lützelshwab, 1990).

Die Pflanzenproben wurden in der Fixierungslösung in ca. 5mm große Stücke geschnitten und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe mit der Fixierungslösung infiltriert. Die gesamte Inkubationsdauer betrug bei Blättern und feinen Wurzeln 30min, bei etwas dickeren Wurzeln und Stängeln 60min. Anschließend wurden sie mit 50mM PIPES (pH 6.0) gewaschen und über eine ansteigende Ethanolreihe mit unvergälltem Ethanol (30%, 50%, 70%, 90% und zweimal 100%) entwässert. Über das Zwischenmedium Xylol wurden die Proben dann in einem Wärmeschrank bei 60°C im Laufe von mehreren Tagen in flüssiges Paraffin (Schmelzpunkt 56-58°C) überführt.

2.5.2 Immunfluoreszenz-Markierung

Mit einem Schlittenmikrotom (R. Jung, Heidelberg, Deutschland) wurden Dünnschnitte von 10µm Dicke hergestellt und auf, mit Chromgelatine (0,1% Gelatine, 0,01% Kaliumchrom-(III)-sulfat x 12 H₂O) beschichtete Objektträger aufgebracht. Durch die Zufuhr von Wärme wurden sie gestreckt, um Kompressionsartefakte zu vermindern und um sie auf der Objektträgeroberfläche zu fixieren.

Nach einer Trocknungszeit von 4–6h wurde das Paraffin mit Hilfe von Xylol aus den Schnitten entfernt und diese dann über eine absteigende Ethanolreihe (90%, 70%, 50%, 30% unvergälltes Ethanol) in 0,01M PBS (pH 7.4) überführt.

Die Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen auf den Schnitten erfolgte mit einer 1%igen (w/v) BSA-Lösung (in 0,01M PBS, pH 7.4). Danach folgte eine 30 minütige Inkubation mit einem primären Antikörper (46E5B11) gegen die 100kDa PM-H⁺-ATPase (siehe 1.5), der 1:1000 mit PBS (pH 7.4) verdünnt wurde. Als Kontrolle wurde ein unspezifischer Antikörper (mouse IgG, Sigma, I-5381) in einer Konzentration von 15µg/ml eingesetzt.

Nach dem gründlichen Auswaschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit einem sekundären Antikörper (anti-mouse-IgG mit FITC-Konjugate, Sigma, F-6257), der 1:50 mit PBS verdünnt wurde. Da das anhaftende Fluorochrom FITC lichtempfindlich ist, wurden alle weiteren Arbeitsschritte in der Dunkelkammer bei Rotlicht durchgeführt.

Nach 1h wurde der überschüssige Antikörper ausgewaschen und die Schnitte schließlich in dem Montagemittel Mowiol 4-88[®] (Calbiochem) (mit einem Zusatz von 2-5% DABCO als Antibleichmittel) eingedeckelt. Lichtgeschützt und kühl aufbewahrt, konnten die Präparate am folgenden Tag mit dem Epifluoreszenzmikroskop oder dem Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) untersucht werden.

2.5.3 Histologische Untersuchungen

2.5.3.1 Fixierung und Einbettung für die Hellfeldmikroskopie

Die Proben wurden wie unter 2.5.1 beschrieben, fixiert und entwässert und des besseren Strukturerhalts wegen nach der Entwässerung nicht in Paraffin sondern in LR-White (London-Resin-White, medium, Agar Scientific) eingebettet. Dazu wurden sie zunächst in eine 1:1 Mischung aus 100% Ethanol und LR-White überführt und dann die Konzentration des Einbettungsmittels im Laufe von mehreren Stunden kontinuierlich erhöht, so dass sich die Proben am nächsten Tag in reinem LR-White befanden. Dem Kunstharz waren 2% (w/v) Benzoyl-Peroxyd zur Stabilisierung zugesetzt worden. Die Polymerisation erfolgte unter Ausschluss von Luftsauerstoff unter einer UV-Lampe bei 10°C. Je nach Alter des Kunstharzes betrug die Polymerisationsdauer 3-5 Tage.

2.5.3.2 Schneiden

An einem Ultramikrotom (Ultracut R, Leica, Bensheim, Deutschland) wurden mit einem Histoknife (Diatome, Biel, Schweiz) Dünnschnitte von 2-3µm Dicke hergestellt und auf mit Chromgelatine (siehe 2.5.2) beschichtete Objektträger aufgebracht. Durch Zufuhr von Hitze wurden die Schnitte gestreckt und die Kompressionsartefakte vermindert. Nach dem Trocknen konnte die Färbung erfolgen.

2.5.3.3 Färbung mit Toluidinblau

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurde eine Selektivfärbung mit Toluidinblau durchgeführt. Der basische Thiazinfarbstoff eignet sich aufgrund seiner metachromatischen Eigenschaften zur Differenzierung von sauren und nicht sauren Zellbestandteilen. Verholzte Zellwände färben sich grünlich-blau, unverholzte rot-violett. Es wurde die Methode nach Trump et al. (1961) modifiziert. Dazu wurde 0,1% (w/v) Toluidinblau in einer 2,5%igen wässrigen Natriumcarbonatlösung aufgelöst.

Die nicht entharzten Schnitte wurden 5-10min in der Farblösung inkubiert. Nach dem Spülen mit aqua dest. und dem Trocknen wurden die Präparate in Entellan® (Merck, Darmstadt) eingedeckelt.

2.5.4 Mikroskopie

2.5.4.1 Die Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (TCS SP) von Leica (Bensheim, Deutschland) mit einem Argon-Krypton-Laser verwendet. Damit konnte man tiefenselektive Informationen über die dreidimensionale Struktur der Objekte erhalten.

Die Mikroskop-Parameter mussten für jedes Präparat individuell eingestellt werden. Die Anregungswellenlänge für FITC lag bei 488nm. Als TeilungsfILTER wurde ein TD 488/568/647 eingesetzt. Für viele botanische Objekte ist eine starke Eigenfluoreszenz charakteristisch, die vor allem durch das Chlorophyll in den Chloroplasten, durch die lignifizierten Zellwände und von sekundären Pflanzenstoffen verursacht wird. Der Detektionsstrahlenteiler (TK 580) unterscheidet nicht zwischen Eigen- und FITC-Fluoreszenz. Um diese voneinander trennen zu können, wurde mit Hilfe eines λ-Scans die Eigenfluoreszenz von der FITC-Fluoreszenz getrennt. Für das Fluorochrom wurde ein Fluoreszenzbereich von 510 bis 520nm ermittelt und auf den ersten Kanal des Mikroskops gelegt. Alle Wellenlängen davor und danach wurden herausgefiltert. Die

Wellenlängen der Chloroplastenfluoreszenz und ein Teil der Zellwandfluoreszenz lagen zwischen 600 und 700nm und wurden auf den zweiten Kanal gelegt. Beiden Kanälen wurde eine Farbe zugewiesen, dem ersten Kanal für FITC grün, dem zweiten rot. Bei jedem Scan wurden beide Bereiche getrennt ermittelt und dann in einem Bild übereinander gelegt (overlay). Die Scan-Geschwindigkeit betrug 450 lines/sec.

Für jedes Präparat mussten die optimalen Scan-Parameter eingestellt werden. Die Helligkeit und der Kontrast wurden jeweils optimal eingestellt, so dass alle Teile des Bildes gut zu erkennen waren, aber kein Hintergrundrauschen auftrat. Die Laser-Spannung und die Größe des Pinholes wurden nicht verändert, damit die Fluoreszenzstärke vergleichbar blieb. Mit Hilfe der Epifluoreszenz-Einrichtung (siehe 2.5.4.2) des Mikroskops wurden die Einstellungen der Scan-Parameter kontrolliert und gegebenenfalls reguliert.

2.5.4.2 Differenzialinterferenzkontrast

Neben den Fluoreszenzaufnahmen wurden von den Präparaten Differenzialinterferenzkontrastaufnahmen in einem dritten Kanal dargestellt. Diese Art der Darstellung wurde gewählt, da die meisten Lebendpräparate im Hellfeld eines Mikroskops nur einen geringen Eigenkontrast besitzen (Munk, 2000). Mit dieser Methode werden die Dichteunterschiede im Präparat in ein plastisches Relief umgesetzt, um so einen höheren Kontrast zu erreichen.

2.5.4.3 Die Epifluoreszenzmikroskopie

Das TCS SP von Leica verfügt neben dem Laser auch über eine Quecksilber-Dampflampe, mit deren Hilfe man mittels der Epifluoreszenzmikroskopie die Proben kontrollieren kann. Dies war vor allem im Hinblick auf das richtige Helligkeitsverhältnis zwischen dem ersten und dem zweiten Kanal von großer Bedeutung (siehe 2.5.4.1). Zum Einsatz kam ein Filtersystem, welches das Absorptions- und Emissionsspektrum eingrenzt. Für das Fluorochrom FITC wurde der Filterblock I 3 gewählt. Dieser enthielt einen Bandpassfilter BP 450-490nm, einen Teilerspiegel, der Licht der Wellenlänge 510nm passieren ließ, sowie einen Langpassfilter LP 515nm.

2.5.4.4 Die Bilddokumentation

Die Bilder des CLSM wurden mit 72dpi (512x512 Pixel), 8 Bit Bildtiefe und RGB-Farben als tif (target image file)-Datei abgespeichert und konnten in dieser Form mit anderen Bildbearbeitungsprogrammen am Computer weiter bearbeitet werden. Der Maßstab wurde vom Scanner-Programm automatisch berechnet. Die Beschriftung der Bilder erfolgte mit Hilfe des Programms „Adobe Photo Shop“ 5.5.

2.5.4.5 Die Lichtmikroskopie

Die mit Toluidinblau gefärbten Präparate (2.5.3.3) wurden mit einem Zeiss-Mikroskop Standard 18 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit Einbauleuchte (Osram, 15W) und Plan-Objektiven (6,5x, 16x, 40x, 100x), sowie Phasenkontrast-Objektiven (16x, 40x) untersucht. Mit den blauen Farbglasfiltern 3, 6 und 12 wurde die Lichtqualität für Tageslichtfilme korrigiert.

Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden Aufnahmen mit einer Mikroskop-Aufsatzkamera (M35, Zeiss) gemacht. Die optimale Belichtungszeit der Diafilme (z.B.

Agfa RSX 200 und Agfa CT 100) wurde empirisch nach einer Belichtungsreihe geprüft und die eingestellte Zeit durch die semi-automatische Belichtungssteuerung kontrolliert.

Die Dia-Aufnahmen der Lichtmikroskopie wurden mittels eines Dia-Scanners (Polaroid 35 LE, Cambridge, Mass., USA) digitalisiert. Dafür wurden die für das Farbbild optimalen Einzelparameter im RGB-Modus mit einer Bildtiefe von 8 Bit verwendet. Die Auflösung betrug 500dpi (1986x1390 Pixel). Anschließend wurden die digitalisierten Bilder als tif-Datei abgespeichert, mit Adobe „Photo Shop“ 5.5 beschriftet und mit einem Messbalken versehen.

2.6 Elektronenmikroskopische Methoden

2.6.1 Fixierung und Einbettung

Die hier angewandten chemischen Fixierungen hatten die Aufgabe, den ultrastrukturellen Aufbau der Gewebe und Zellen für die Elektronenmikroskopie optimal zu konservieren und gleichzeitig die Antigenität der Proteinmoleküle für den Nachweis der PM-H⁺-ATPase aufrecht zu erhalten. Dies sind beides Forderungen, die sich schwer miteinander vereinbaren ließen! Meist hatte ein guter Strukturerhalt den Verlust der Antigenität zur Folge, und ließ sich die H⁺-ATPase mit Hilfe der Antigen-Antikörper-Reaktion gut lokalisieren, so war der Strukturerhalt meist von schlechter Qualität. Daher wurden zunächst verschiedene Fixierungsmittel in unterschiedlichen Konzentrationen miteinander kombiniert, einige Blätter fixiert und dann einer Immunogold-Behandlung unterzogen (siehe 2.6.3). Schließlich wurden für die Strukturuntersuchungen und die Immunogold-Lokalisation zwei unterschiedliche Fixierungen und Einbettungsmedien gewählt.

2.6.1.1 Ermittlung der optimalen Fixierung für die Immunogoldmarkierung

Zur Ermittlung der optimalen Antigenität mit gutem Strukturerhalt wurden an Blättern von *Potamogeton lucens* mehrere unterschiedliche Fixierungsgemische, mit unterschiedlichen Fixierungszeiten und verschiedenen Einbettungsmitteln getestet. Folgende Gemische wurden getestet:

- a) Eine bewährte Standardfixierung für elektronenmikroskopische Pflanzenpräparate, mit 2,5% Glutaraldehyd als Primärfixierung und 1% Osmiumtetroxid nach Palade (1952) als Sekundärfixierung. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.6.1.2 beschrieben. Die Einbettung der Proben erfolgte in Epon-Araldit (2.6.1.2) und in LR-White (2.5.3.1).
- b) Als Fixierungsmittel wurde lediglich 2,5% Glutaraldehyd eingesetzt, die übrigen Bedingungen, wie sie unter a) beschrieben wurden, blieben gleich. Eingebettet wurde in Epon-Araldit (2.6.1.2) und LR-White (2.5.3.1).
- c) Die Fixierungsgemische von a) und b) wurden bei einer Mikrowellenfixierung eingesetzt. Bei dieser Art von Fixierung wurden die Präparate in Glutaraldehyd in einer Mikrowelle (Sharp R-5975) mit Drehteller bei 500W bestrahlt, so dass das Fixierungsmedium eine Temperatur von 40-43°C erreichte (Heumann, 1992). Damit war die Fixierung abgeschlossen und die Sekundärfixierung [a]) bzw. Entwässerung der Proben [b]) konnte erfolgen. Eingebettet wurde in LR-White.
- d) Die Glutaraldehydkonzentration wurde auf 0,1% verringert und mit 2,5% Formaldehyd (aus Paraformaldehyd) gemischt. Das Fixierungsgemisch enthielt außerdem die unter 2.5.1 beschriebenen Zusätze und wurde mit dem gleichen PBS-

Puffer angesetzt. Die Fixierungsdauer betrug 1h. Eingebettet wurde in LR-White (2.5.3.1).

- e) Die Glutaraldehydkonzentration wurde nochmals verringert (auf 0,05%) und dafür die Formaldehydkonzentration auf 3% erhöht. Die übrigen Bedingungen wurden wie unter c) beibehalten.
- f) Die Fixierung der Proben erfolgte mit 4% Formaldehyd, wie sie für die immunocytochemischen Untersuchungen beschrieben wurde (siehe 2.5.1). Die Fixierungsdauer variierte zwischen 30min und 1h. Eingebettet wurde in LR-White.
- g) Die Konzentration des Formaldehyds wurde auf 8% erhöht. Die restlichen Bedingungen blieben gleich, wie unter e) beschreiben.

Von diesen verschiedenen Ansätzen wurden Ultradünnschnitte hergestellt (2.6.2), diese dann einer Immunogoldbehandlung unterzogen (2.6.3) und die spezifische Verteilung der Markierungen pro μm^2 Plasmamembran bestimmt.

2.6.1.2 Fixierung für die Strukturuntersuchungen

Die primäre Fixierung der Blätter, Stängel und Wurzeln erfolgte bei Raumtemperatur (RT) mit 2,5% Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer, bei einem pH von 7.4. Die Proben wurden in der Fixierlösung in ca. 1mm² große Stücke geschnitten und anschließend mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe mit dem Fixierungsmedium infiltriert. Die Inkubationsdauer betrug 2,5h. Danach wurde mit 0,1M Cacodylatpuffer ausgewaschen, bis der Geruch von Glutaraldehyd verschwunden war. Im letzten Waschgang kamen die Proben ins Eisbad, in dem sie auf ca. 4°C abkühlten. Alle weiteren Schritte erfolgten bei dieser Temperatur.

Die Sekundärfixierung wurde mit einem Ansatz nach Palade (1952) (1% OsO₄, 1/7 M Barbitol-Acetat, 0,1N HCl, pH 7.0) durchgeführt und dauerte 1,5h. Danach wurde gründlich mit aqua dest. ausgewaschen. Die nachfolgende Entwässerung über eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 95% und zweimal 100%) wurde ebenfalls bei niedrigen Temperaturen durchgeführt.

Als Vorbereitung für die Einbettung in Epon-Araldit (Mollenhauer, 1964) erfolgte zunächst eine Inkubation in 1,2-Epoxypropan bei RT. Dann wurden die Proben in einer Mischung aus 1,2-Epoxypropan und einer steigenden Menge (2:1; 1:1; 1:2) an Epon-Araldit-Harz (Glycid-Ether 100[®], Araldit CY 206[®], Araldit-Härter HY 964[®], DMP-30 Beschleuniger[®]) über drei Tage in reines Harz überführt. Nach einer weiteren Infiltration von 24h in reinem Harz wurden die Proben in kleinen Silikonkautschuk-Formen ausgerichtet und in einem Wärmeschrank bei 70°C über 3 Tage polymerisiert.

2.6.1.3 Fixierung für die Immunogold-Untersuchungen

Aufgrund der Resultate der Vorversuche (siehe 3.3.2.1) wurden die Pflanzenproben für die immunocytochemischen Untersuchungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) in einer 8%igen Formaldehydlösung fixiert. Dafür wurde Paraformaldehyd mit 3mM EGTA in 50mM PIPES gelöst und der pH-Wert auf 6.8 eingestellt. Die Proben wurden, wie unter 2.5.1 beschrieben bei 4°C fixiert und über eine aufsteigende Ethanolreihe entwässert. Innerhalb von 2 Tagen wurden sie dann in das Einbettungsmittel LR-White hochgeführt und eingebettet. Die Polymerisation erfolgte bei Kälte unter UV-Licht (vgl. 2.5.3.1).

2.6.2 Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie

Für die verschiedenen Untersuchungen standen zahlreiche Grids aus vielfältigen Materialien und in unterschiedlichen Ausführungen zur Verfügung. Für die Strukturuntersuchungen wurden Schlitz-Grids (2 x 0,6mm) und Netz-Grids (Netzmaschenzahl 100) aus Kupfer eingesetzt, für die immuncytologischen Untersuchungen kamen 100er Netz-Grids aus Nickel zum Einsatz.

Die Grids wurden nach einer Reinigung mit Chloroform im Ultraschallbad mit einem dünnen Film aus 1,4% (w/v) Pioloform beschichtet, um die Stabilität der Schnitte zu erhöhen.

Sowohl die Epon-Araldit-, als auch die LR-White-Blöckchen wurden zunächst getrimmt, dann erfolgte die Herstellung von Ultradünnschnitten (60-90nm dick) mit einem Diamantmesser (Diatome, Schweiz) am Ultramikrotom (Ultracut R, Leica, Bensheim, Deutschland). Nach deren Streckung mit Chloroform-Xylol-Dämpfen (Mischungsverhältnis 1:1) wurden sie mit Hilfe einer Marderborste auf die befilmten Grids aufgebracht. Die getrockneten Grids wurden bis zu ihrer weiteren Behandlung in einer Gridbox staubfrei aufbewahrt.

2.6.3 Immunogoldmarkierung

Um die Antigenität der Proben zu verbessern, wurden die Schnitte zunächst erhitzt (Stirling und Graf, 1995; Brorson, 2001). Dazu wurden sie auf die Oberfläche eines 0,01M Citratpuffers (pH 6.2) gelegt und in einem PC-960 air cooled thermal cycler (Corbett Research, Mortlake, N.S.W., Australia) langsam, über mehrere Temperaturstufen auf 93°C erhitzt. Die Inkubationsdauer nach Erreichen der Endtemperatur betrug 15min.

Nach dem Abkühlen wurden die Grids mit 0,01M PBS (pH 7.4) gewaschen, dann folgte die Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen mit PTB (0,01M PBS + 0,01% (v/v) Tween 20[®] + 1% (w/v) BSA) für die Dauer von 15min.

Als primärer Antikörper wurde auch hier der monoklonale Antikörper gegen die 100kDa PM-H⁺-ATPase (46E5B11) eingesetzt (siehe 1.5). Die Inkubation erfolgte in einer Verdünnung von 1:500 mit PTB. Als Kontrolle diente PTB, anstatt eines unspezifischen Antikörpers. Sein Gebrauch, wie er bei der Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz kam, ergab die gleichen negativen Ergebnisse wie mit PTB, so dass auf die kostengünstige Alternative zurückgegriffen werden konnte. Nach dem gründlichen Auswaschen mit PTB erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-mouse IgG, Fc, 10nm Goldpartikel, Sigma, G-7777), der 1:10 mit PTB verdünnt wurde. Schließlich wurden die Schnitte mehrmals mit PTB, dann mit PBS und aqua dest. gewaschen und dann getrocknet.

2.6.4 Die Silberfärbung

Um die Goldpartikel im Elektronenmikroskop optisch besser lokalisieren zu können, wurde nach der Immunogoldmarkierung (2.6.3) bei einigen Proben eine Silberverstärkung nach Danscher (1981) durchgeführt. In der Reaktion katalysieren die Goldpartikel die Reduktion von Silberionen durch Hydrochinon, so dass die Goldkörner, durch die Inkubation in der folgenden Lösung, mit Silber umgeben werden.

Für die Gebrauchslösung wurden 20% Gummi arabicum und 75mM Hydrochinon in 0,2M Citratpuffer (pH 3.6) bei Dunkelheit gerührt, bis sich alles gelöst hatte. Danach erfolgte die Zugabe von 5,5mM Silberlactat.

Die Lösung wurde erst kurz vor Gebrauch frisch angesetzt und die Grids 15-30min bei Rotlicht inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit aqua dest. wurden sie getrocknet und konnten kontrastiert werden.

2.6.5 Kontrastierungen

Um den Kontrast der Proben zu erhöhen, wurden die Schnitte unmittelbar nach dem Schneiden oder nach der immunocytochemischen Behandlung (2.6.3) mit Schwermetallen behandelt. Für die Strukturuntersuchungen wurden die Grids zunächst mit Uranylacetat und anschließend mit Bleicitrat behandelt. Die Schnitte für die Immunogoldmarkierung wurden nur mit Bleicitrat behandelt.

2.6.5.1 Kontrastierung mit Uranylacetat

Die Grids wurden 5min in einer 10%igen methanolischen Uranylacetat-Lösung (Stempak und Ward, 1964) inkubiert und anschließend zweimal kurz in 100%igem, wasserfreiem Methanol gewaschen. Über eine 50%ige Methanollösung wurden die Grids in aqua dest. überführt und dann getrocknet.

2.6.5.2 Kontrastierung mit Bleicitrat

Im Anschluss daran folgte die zweite Kontrastierung mit 8mM Bleicitrat (Reynolds, 1963). Da Bleicitrat mit dem CO₂ der Luft zu unlöslichem Bleikarbonat reagieren würde und dieses dann als schwarzer punktförmiger Niederschlag auf den Schnitten zu liegen käme, musste ein Kontakt damit unterbunden werden. Dafür wurde eine Petrischale mit NaOH-Plätzchen (Merck) bestückt, welche das CO₂ aus der Luft abfangen und in Na₂CO₃³ umwandeln. Die Inkubation der Grids mit dem Bleicitrat erfolgte so in einer CO₂-freien Atmosphäre. Nach einer Kontrastierungsdauer von genau 5min wurden sie mehrmals mit CO₂-freiem aqua dest. gewaschen und dann getrocknet.

³ 2NaOH + CO₂ → Na₂CO₃ + H₂O

2.6.6 Transmissionselektronenmikroskopie

2.6.6.1 Das Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

Die Schnitte auf den Grids wurden an einem Zeiss EM 900 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) Transmissionselektronenmikroskop mit einer Beschleunigungsspannung von 80kV bei unterschiedlichen Vergrößerungen untersucht.

2.6.6.2 Die Bilddokumentation

Zur fotografischen Dokumentation der Versuchsergebnisse wurden Planfilme von Agfa (Scientia, 8,3 x 10,2 cm) verwendet, die mit Gp5-Arbeitslösung (Agfa for B & W Film) entwickelt und mit Acidofix-Arbeitslösung (Agfa Acidofix rapid fixing salt for B & W films and papers) fixiert wurden. Da für dieses Negativ-Format kein Scanner zur Verfügung stand, um die Bilder zu digitalisieren, mussten zunächst an einem Vergrößerungsgerät (T912 Manuell, Kienzle) Bildpositive hergestellt werden. Diese wurden in Neutol liquid NE (Agfa, Leverkusen) entwickelt und mit Acidofix-Arbeitslösung fixiert. Nach dem Trocknen konnten die Bilder mit Hilfe eines Flachbettscanners (Snapscan 1212, Agfa) digitalisiert werden. Die Bildauflösung betrug 300dpi (1382x1544 Pixel), mit einer Bildtiefe von 8 Bit und 256 Graustufen. Abgespeichert wurden sie im tif-Format.

2.6.6.3 Ermittlung der linearen Dichte-Verteilung von Goldpartikeln mit AnalySIS[®]

Um die lineare Dichte-Verteilung der Markierungen der PM-H⁺-ATPase in der Plasmamembran von Epidermiszellen bei *Myriophyllum spicatum* und *Elodea canadensis* zu ermitteln, wurden mit Hilfe des Programms AnalySIS[®] (Version 3.0) die Goldkörner in mehreren unterschiedlichen Proben quantitativ erfasst. Dazu mussten elektronenmikroskopische Bilder mit Hilfe einer Videokamera (MTI CCD72) direkt vom Mikroskop in einen Computer (Pentium II) eingelesen werden. Die Auflösung der Bilder betrug 72 dpi mit 768 x 576 Pixel mit einer Bildtiefe von 8 Bit und 256 Graustufen. Da die Bildqualität nicht sehr gut war, wurde diese Methode nicht für die Bilddokumentation eingesetzt (2.6.6.2).

Um die lineare Dichte-Verteilung der Goldkörner innerhalb einer Zelle zu bestimmen, wurde die Plasmamembran in vier verschiedene Abschnitte unterteilt:

- In die perikline Außenseite der Zelle
- In die perikline Innenseite der Zelle
- In die beiden antiklinen Seiten der Zelle

Die Länge (μm) der Plasmamembran wurde mit Hilfe des Programms bestimmt und anschließend die Anzahl der spezifisch an den Membranabschnitten markierten Goldkörner gezählt. Die Anzahl der Markierungen wurde auf $1\mu\text{m}$ Plasmamembranlänge umgerechnet und die Ergebnisse statistisch ausgewertet. Die Darstellung erfolgte sowohl grafisch als auch tabellarisch.

2.7 Nachweis der physiologischen Polarität bei Blättern von Wasserpflanzen

Der Indikatorfarbstoff Bromkresolpurpur (Dibrom-o-cresolsulfon-phthalein) hat zwei Umschlagpunkte bei verschiedenen pH- Werten. Er wechselt seine Farbe von gelb ($\text{pH} \leq 5.2$) über rot ($\text{pH} 5.3-6.8$) nach blauviolett ($\text{pH} \geq 6.8$).

Für die Polaritätsversuche wurden 0,04% (w/v) des Indikators mit einer 0,1%igen (w/v) Agar-Agar-Lösung (in Leitungswasser!) gemischt und erwärmt, bis sich alle Bestandteile lösten. Mit 1N HCl und/oder 1N KOH wurde der pH zwischen 5.25 und 5.3 eingestellt, so dass sich eine rote Farbe einstellte. Damit wurde in einer Petrischale eine ca. 5mm dicke Agar-Schicht gegossen.

Die Versuche wurden stets vormittags zwischen 9.00 und 10.30 Uhr durchgeführt. In dieser Zeit wurden die Blätter der Pflanzen unter kaltem Leitungswasser gründlich von Schmutz, Algen und groben Verkalkungen befreit und dann in Leitungswasser für mindestens 30min belichtet. Die Beleuchtungsstärke betrug $140\mu\text{mol Quanten} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ (photosynthetisch aktive Strahlung). Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Blätter dem Wasser entnommen, mit aqua dest. abgespült und feucht auf den gerade stockenden Agar gelegt oder hinein gesteckt. Mit der oben erwähnten Beleuchtungsstärke wurden die Blätter 30–60min weiter belichtet.

Aufgrund der unterschiedlichen Formen der Blätter wurden sie auf verschiedene Art und Weise auf den Agar gelegt. Die Blätter von *M. spicatum*, *M. verticillatum* und *M. aquaticum*, sowie die Blätter von *C. caroliniana* wurden sowohl mit der adaxialen (Oberseite) als auch mit der abaxialen (Unterseite) Seite auf den Agar gelegt. Die Blätter von *C. demersum* sind zwar auch zerschlitzt, aber sie bleiben nicht flach auf dem Agar liegen. Daher wurden die einzelnen Blattzipfel sowohl mit der adaxialen als auch mit der abaxialen Seite auf dem Agar plaziert. Auch die oval-lanzettlichen Blätter von *P. lucens*, *P. perfoliatus* und die Schwimmblätter von *P. natans* wurden flächig auf den Agar gelegt. Das Unterwasserblatt von *P. natans* hat eine schmale, langgestreckte Form und wurde daher mit der langen Blattkante bis zur Hälfte in den Agar hinein gesteckt. Bei *H. vulgaris* wurde der Stängel knapp über- und unterhalb der Blattwirtel der Unterwasserblätter abgeschnitten, und diese dann flächig auf dem Agar plaziert. Auch hier wurde wieder zwischen adaxialer und abaxialer Seite unterschieden. Das lanzettliche Blatt von *V. spiralis* wurde mit beiden Seiten der Blattfläche auf den Agar gelegt. Die Blätter von *S. aloides* wurden mit der langen Blattkante in den Agar gesteckt. Dafür wurden nicht die ältesten, äußeren Blätter genommen, sondern die etwas jüngeren, aus dem Inneren der Rosette. Auch die ovalen Blättchen von *E. canadensis* und die länglichen von *E. nuttallii* wurden vom Stängel abgezapft und mit der längeren Blattkante in den Agar gesteckt.

Die Ergebnisse der Farbänderungen in der Blatumgebung wurden zur Dokumentation mit einer Spiegelreflexkamera von Minolta (X-700) auf einem 100 ASA-Diafilm fotografisch festgehalten.

2.8 Biochemische Untersuchungen

Der für die Immunfluoreszenz (2.5.2) und Immunogoldmarkierung (2.6.3) eingesetzte monoklonale Antikörper (46E5B11) wurde von Dr. Lützelschwab im Rahmen seiner Dissertation 1990 aus Zucchiniemlingen (*Cucurbita pepo* L.) hergestellt und richtet sich gegen die PM-H⁺-ATPase mit einem Molekulargewicht von etwa 100kDa (siehe 1.5).

Um dessen Spezifität zur Lokalisation der H⁺-ATPase bei Wasserpflanzen nachzuweisen, wurden durch fraktionierte Zentrifugation von Blättern, Stängeln und Wurzeln Mikrosomenfraktionen hergestellt und im Western Blot die Funktionalität des Antikörpers überprüft.

2.8.1 Mikrosomenfraktionierung

Von den folgenden Pflanzen wurden die Blätter, Stängel und Wurzeln getrennt aufgeschlossen und zu Mikrosomenfraktionen verarbeitet:

Hippuris vulgaris

Potamogeton lucens

Ranunculus penicillatus

Stratiotes aloides

Myriophyllum spicatum *Myriophyllum aquatica*

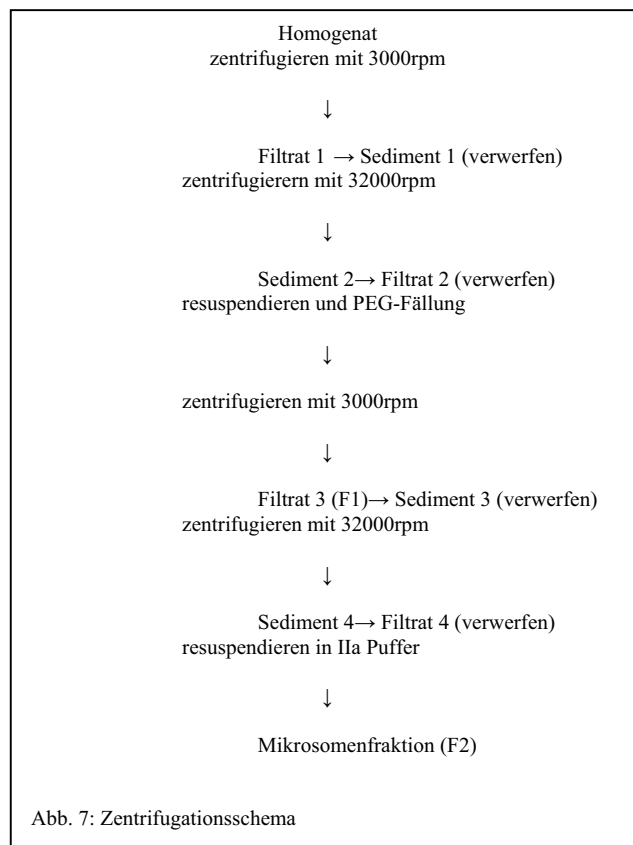
Cabomba caroliniana

Vallisneria spiralis

Callitriche hamulata

Elodea canadensis

Alle hier zum Einsatz kommenden Lösungen wurden vor ihrer Nutzung zuerst mit Sterilfiltern (Sartorius, Minisart NML SM 16534 K) steril filtriert (Cellulosemembran mit 0,2µm Porenbreite, Schleicher & Schnüll) und dann auf ca. 4°C abgekühlt. Alle nachfolgenden Schritte wurden ebenfalls bei dieser Temperatur durchgeführt. Nach einer gründlichen Reinigung unter fließendem, kaltem Wasser wurden die Blätter, Stängel und Wurzeln voneinander getrennt und einzeln weiter verarbeitet. Der Menge des Frischgewichtes an Pflanzenmaterial wurde das 4fache eines erweiterten Ia-Puffers zugesetzt. Dieser enthielt 25mM Tris, 20mM Na-EDTA, 0,3M NaCl, 2% PVPP, 0,1% BSA, 1mM DTT und 0,2mM PMSF [gelöst in DMSO]. Der pH-Wert des Puffers lag zwischen 7.8 und 8.0. Das Pflanzenmaterial wurde zusammen mit dem Puffer in einer elektrischen Kräutermühle (Krups Speedy Plus, Solingen, Deutschland) zerkleinert. Nach dem Abfiltern durch ein engmaschiges Polyestertuch wurde das Homogenat nach dem in Abb. 7 gezeigten Zentrifugationsschema abzentrifugiert. Zuerst wurde es bei 4°C mit 3000rpm (1000 g; Hermle Tischzentrifuge, Z583K, Rotor 220.80.V02) für 30min abzentrifugiert. Das daraus gewonnene Filtrat 1 wurde dann bei 4°C, 30min, mit 32000rpm (100.000 g; Beckmann Ultrazentrifuge, LZ-65K, Rotor 50 Ti) abzentrifugiert. Das entstandene Sediment 2 wurde in der 2fachen



Menge eines Ia-Puffers (10mM Tris, 20mM Na-EDTA, 0,3M NaCl, pH 7.8-8.0) resuspendiert. Dieser Suspension wurde 5% PEG 6000 zugesetzt und unter Rühren 35min inkubiert. Anschließend wurde wieder 30min bei 4°C und mit 3000rpm zentrifugiert. Das daraus resultierende Filtrat 3 wurde in der Ultrazentrifuge 60min bei 4°C und mit 32000rpm zentrifugiert. Sediment 4 wurde in 1ml eines IIa Puffers (10mM Tris, 10mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 5mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,3M NaCl; pH 6.0) aufgenommen und ergab die Mikrosomenfraktion F2. Diese wurde portionsweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

2.8.2 Quantitative Bestimmung von Proteinen der Mikrosomenfraktionen

Eine einfache, sensitive colorimetrische Methode, mit der man Proteine quantitativ in komplexen Extrakten bestimmen kann, ist die Proteinbestimmung nach Bradford (1976). Der Nachweis beruht auf der spezifischen Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffs Coomassie Blue an Proteinen. Die dazu benötigte Eichkurve wurde mit BSA erstellt und im Photometer (Biophotometer, Eppendorf, Heidelberg, Deutschland) gespeichert.

Für die Farbreagenz wurden 25mg Coomassie Blue G250[®] (Serva, Heidelberg, Deutschland) mit 12,5ml 95%igem Ethanol und 25ml 85% Phosphorsäure gemischt und mit kaltem aqua dest. auf 250 ml aufgefüllt. Nach dem vollständigen Lösen des Farbstoffs wurde er gefiltert und war einsatzbereit.

Für die Proteinbestimmung wurden 20µl der Mikrosomenfraktion mit 50µl 1M NaOH und 1ml Farbreagenz gemischt und nach einer Inkubationsdauer von 10min am Photometer gegen zwei Leerwerte (LW) bei einer Wellenlänge von 595nm abgelesen. Die Werte wurden digital in mg/ml ausgegeben. Die Proteinkonzentrationen wurden auf 1g des eingesetzten Frischgewichts umgerechnet.

2.8.3 SDS-Gel-Elektrophorese

Proteine können nach einer Behandlung mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und Dithiothreitol (DTT) in einer Gel-Elektrophorese nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden.

Als SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde das diskontinuierliche System nach Laemmli (1970) verwendet. Die Diskontinuität bezieht sich auf die Gelstruktur. Es kommen zwei Gele zum Einsatz, die sich in ihrer Porengröße, ihrem pH und der Art und Konzentration ihrer Ionen unterscheiden.

2.8.3.1 Herstellung des Acrylamidgels

Zwischen zwei Glasplatten für Minigele (10 x 8 cm) wurde aus Acrylamid-Bis (30%T, 2,7%C, Serva), zusammen mit einem Trenngelpuffer (375mM Tris HCl, 0,1%SDS, pH 8.8) und 0,08% (w/v) TEMED, sowie 0,3% (w/v) APS ein 12,5%iges Trenngel gegossen. Nach dessen Polymerisierung (20-30min) wurde ein 5%iges Sammelgel aus Acrylamid-Bis (30%T, 27%C, Serva), Sammelgelpuffer (125mM Tris-HCl, 0,1% SDS, pH 6.8), 0,1% (w/v) TEMED und 0,5% (w/v) APS auf das Trenngel aufgetragen. Nach weiteren 20-30min war das zweite Gel ebenfalls polymerisiert und einsatzbereit. Die Gele konnten im Kühlschrank 1-3 Tage aufbewahrt werden, wurden aber i. Allg. am selben Tag eingesetzt.

2.8.3.2 Auftrennung der Mikrosomenfraktionen

Die Mikrosomenfraktionen wurden im Verhältnis 3:1 mit Roti-Load 1[®], einem reduzierenden Proteinauftragspuffer (Roth, Karlsruhe), gemischt. Die Endkonzentration an eingesetztem Protein wurde auf 5µg/ml festgelegt. Höher konzentrierte Proben wurden zuvor mit Ila-Puffer (siehe 2.8.1) entsprechend verdünnt, um einen gleichmäßigen Lauf zu erhalten und sie mit dem mitlaufenden Proteinmarker vergleichbar zu machen. Enthielten die Proben weniger als 5µg/ml Protein, wurde dies entsprechend notiert.

Zwei Gele wurden in die Elektrophoresekammer (MS Laborgeräte, Heidelberg, Deutschland) eingespannt und die Laufkammern, sowie die Probenaschen der Gele mit Elektrophoresepuffer (25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS, pH ~ 8.8) aufgefüllt. In die Taschen des Sammelgels wurde je 20µl der vorbereiteten Probe pipettiert. Als Referenz lief ein Proteinmarker mit (5µg/ml Protein, 2-200 kDa, Serva liquid mix[®]).

Bei einer Stromspannung von 100V und einer anfänglichen Stromstärke von 20mA durchliefen die Proben innerhalb von einer Stunde das Sammelgel und sammelten sich an der Grenze zum Trenngel. Jetzt wurde die Stromstärke auf 24mA erhöht. Der Lauf war beendet, sobald die Proben den unteren Rand des Trenngels erreicht hatten.

2.8.3.3 Anfärbung und Konservierung der Gele

Nach dem Lauf wurden die Sammelgele entfernt und die Trenngele mit aqua dest. gewaschen, um überschüssigen Elektrophoresepuffer zu entfernen, da die darin enthaltenen Detergenzien bei der anschließenden Färbung die Bildung des Farbkomplexes von Coomassie Blue mit den Proteinen behindern würden (Eckert und Kartenbeck 1997).

Eines der Gele wurde in einer Farblösung aus 50% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure, 0,1% (w/v) SDS und 0,2% (w/v) Coomassie Blue G250 auf dem Drehschüttler 1h gefärbt.

Nach dem Auswaschen der überschüssigen Farbe wurde das Gel in aqua dest. mehrere Minuten gekocht, um es wieder zu entfärben. Der Vorgang wurde mehrmals wiederholt, bis die Proteinbanden sich als blaue Bereiche deutlich von dem entfärbten Hintergrund abhoben.

Nach der fotografischen Dokumentation (Minolta, X-700) wurde das Gel in einer 1-3%igen (v/v) Glycerinlösung inkubiert und dann zwischen Zellophanfolien (Owl, Separation Systems), die mit 5% (v/v) Glycerinlösung benetzt sind, in einem Trocknungsrahmen getrocknet. Die Gele sind so haltbar und archivierbar.

2.8.4 Western Blotting

Ziel dieser Methode ist der vollständige Transfer der aufgetrennten Proteine eines SDS-Gels auf eine synthetische Trägermembran, damit diese für den immunologischen Nachweis mit einem spezifischen Antikörper zugänglich sind. Die hier angewandte Methode des Semidry-Blottings stammt von Kyhse-Andersen (1984). Das diskontinuierliche Puffersystem ermöglicht einen relativ gleichmäßigen Transfer aller Proteine, unabhängig von Ladung und Größe.

Gleich nach Beendigung der Elektrophorese (siehe 2.8.3.2) wurde das zweite Trenngel, zusammen mit drei Filterpapieren (Whatman, 3mm) 5min in Kathodenpuffer (Roti-Blot K[®], Roth) inkubiert. Eine Nitrozellulosemembran (Porengröße: 0,45µm, Serva), sowie drei weitere Filterpapiere inkubierten in Anodenpuffer (Roti-Blot A[®], Roth). Die Anode des Semidry-Blotters (cti, SD, Idstein, Deutschland) wurde mit Anodenpuffer befeuchtet und dann ein Stapel, wie in Abb. 8 abgebildet, aufgebaut. Die Kathode wurde gut mit Kathodenpuffer befeuchtet und auf den Stapel aufgesetzt. Die angelegte Stromspannung betrug 10V, die Stromstärke wurde konstant bei 1mA/cm² gehalten. Die Laufdauer betrug 1h.

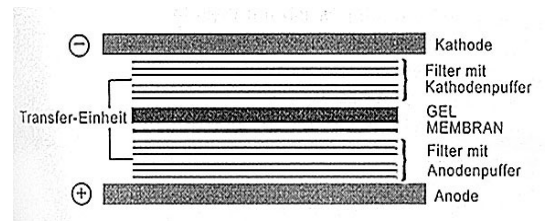


Abb. 8: Querschnitt durch den Aufbau einer Transfer-Einheit bei Anwesenheit eines diskontinuierlichen Puffersystems nach Kyhse-Andersen, 1984

2.8.4.1 Immunmarkierung

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran zunächst in 0,04% (v/v) Tween 20[®] (in 0,01M PBS, pH 7.4) gewaschen, dann erfolgte die Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen mit 0,2% (v/v) Tween 20[®]. Schließlich inkubierte der Blot 2h in dem 1:1000 verdünnten, primären monoklonalen Antikörper (46E5B11). Nach dem Auswaschen mit 0,02% Tween 20[®] erfolgte die Inkubation mit einem sekundären Antikörper (goat, anti-mouse-IgG, alkaline phosphatase conjugate, Fc spezifisch, Sigma, A-1418), der 1:5000 mit 0,02% Tween 20[®] verdünnt wurde. Danach wurde nochmals mit 0,02% (v/v) Tween 20[®] ausgewaschen, bevor der Blot gefärbt wurde.

2.8.4.2 Anfärbung

Für den colorimetrischen Nachweis der alkalischen Phosphatase auf der Blot-Membran wurden die chromogenen Substanzen 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazolium (NBT) verwendet.

Die Phosphatase des sekundären Antikörpers katalysiert die Abspaltung des Phosphatrestes von BCIP und wandelt es in das entsprechende Indoxylderivat (lösliches Leucoindigo) um. Das Indoxylderivat wird durch NBT oxidiert und dimerisiert zu dem tiefblauen, unlöslichen 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlor-Indigo (Franci und Vidal, 1988). NBT wird dabei als Wasserstoff-Akzeptor zu einem purpur gefärbten Diformazan reduziert, welches die Intensität des Farbniederschlages noch verstärkt. Da die Farbreaktion lichtempfindlich ist, wurde die Inkubation in der Dunkelkammer unter Rotlicht durchgeführt.

Mit Dimethylformamid wurde eine 5%ige (w/v) Lösung aus NBT und eine 5%ige (w/v) Lösung aus BCIP angesetzt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Farblösungen 1:2 (NBT:BCIP) gemischt und mit dem 100-fachen eines Puffers (100mM NaCl, 5mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 100mM Tris) verdünnt. Der Blot wurde darin ca. 7min inkubiert, bis eine deutliche Anfärbung von Banden zu erkennen war. Danach wurde die Reaktion mit einer 20mM EDTA-Na-Salz-Lösung gestoppt.

Nach dem Spülen in aqua dest. wurde der Blot zur Dokumentation fotografiert und dann zwischen Filterpapier getrocknet. Die Aufbewahrung erfolgte lichtgeschützt zwischen Filterpapier.

2.9 Untersuchungen an *Myriophyllum spec.* bei verschiedenen pH-Werten

Mit *Myriophyllum spicatum* und *M. aquaticum* konnten zwei Wasserpflanzen untersucht werden, die einer Familie angehören und in unterschiedlichen Habitaten wachsen. *M. spicatum* findet man bevorzugt in kalkhaltigen Gewässern unserer Breiten, während *M. aquaticum* aus Südamerika stammt und in einem Gewässer wächst, dessen pH im sauren Bereich liegt (vgl. 2.2.6 und 2.2.7).

In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, wie *M. spicatum* mit unterschiedlichen pH-Werten in seinem Lebensraum zurecht kommt und welche Auswirkung dies auf den Nachweis der PM- H^+ -ATPase hat. In einem zweiten Versuch sollte abgeklärt werden, wie sich der pH des Umgebungsmilieus von *M. spicatum* und *M. aquaticum* im Laufe von mehreren Wochen verändert und ob dies Konsequenzen auf den Nachweis der PM- H^+ -ATPase hat.

2.9.1 Veränderungen im Blatt unter konstanten pH-Bedingungen

Drei Pflanzen von *M. spicatum* wurden von Schmutz befreit und in je einen Glaszylinder mit 1,5l Fassungsvermögen eingebracht. Diese wurden mit Quellwasser aus Scorzè (bei Treviso, Italien) gefüllt. Das Wasser enthielt lt. Etikett folgende Kationen und Anionen: Na^+ : 7,1mg/l, K^+ : 1,1mg/l, Mg^{2+} : 31mg/l, Ca^{2+} : 46mg/l, Cl^- : 2,8mg/l, SO_4^{2-} : 4,6mg/l, SiO_4^{4-} : 17mg/l und HCO_3^- : 500mg/l. Der pH wurde mit Hilfe von 1N HCl auf drei verschiedene pH-Werte eingestellt (6,0, 7,0 und 8,0) war. Die Glaszylinder wurden abgedeckt und im Klimaschrank bei 11°C und einer Beleuchtung von $67 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ (photosynthetisch aktive Strahlung) 10h täglich belichtet. Eine Belüftung des Wassers mit einem Sprudelstein fand nicht statt, da dadurch das im Wasser enthaltene CO_2 innerhalb von wenigen Stunden aus dem Wasser entweichen würde (Kaspar, 1992). Jeden dritten Tag wurde zunächst der CO_2 -Gehalt (2.9.3) der drei Hälterungswässer bestimmt und dann das Wasser ausgewechselt. So konnten die Pflanzen unter relativ konstanten pH-Bedingungen wachsen, ohne dass zusätzliche Puffer eingesetzt werden mussten. Die Versuchsdauer belief sich auf fünf Wochen.

Neben der Kontrolle der Vitalität wurde jeden Vormittag der pH der drei Ansätze gemessen. Die Messung der Membranspannungen wurde einmal in der Woche durchgeführt (siehe 2.9.4). Alle zwei Wochen erfolgte die Entnahme von Blattproben, die für immunocytochemische Untersuchungen fixiert wurden (siehe 2.5.1ff).

2.9.2 Veränderungen des pH im Laufe mehrerer Wochen

Je eine Pflanze von *M. spicatum* und *M. aquaticum* wurden von grobem Schmutz und Algenbewuchs befreit, ihre Größe vermessen und dann in je einen Glaszylinder mit 1,5l Fassungsvermögen eingebracht. Bei *M. aquaticum* wurden vor Versuchsbeginn und während der gesamten Laufzeit alle Überwasserblätter entfernt, da sonst die Unterwasserblätter absterben würden (de Wit, 1990). Die Glaszylinder wurden mit Quellwasser (Scorzè, bei Treviso, Italien) aufgefüllt und der pH mit 1N HCl auf 6.0 eingestellt. Die Belichtung erfolgte in einem Klimaschrank bei 11°C 10h mit $67\mu\text{mol Quanten} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Die Versuchsdauer belief sich auf fünf Wochen.

Neben der täglichen Messung des pH (immer vormittags), der Kontrolle der Vitalität der Pflanzen und der wöchentlichen Messung der Membranspannung (siehe 2.9.4) wurden alle zwei Wochen Proben von Blättern beider Arten entnommen und für die immunocytochemischen Untersuchungen präpariert (siehe 2.5.1ff).

2.9.3 Messung des CO₂-Gehalts im Wasser

Während der Versuchsdauer von fünf Wochen wurde mehrmals das freie CO₂ im Wasser titrimetrisch bestimmt (Schwoerbel, 1980). In 100ml Probenwasser wurde 1mg eines Phenolphthaleingemisches[®] (Hach, USA) gelöst. Mit einem Digital-Titrator (16900-01, Hach, Loveland, Colorado, USA) wurde tropfenweise eine 0,3636M NaOH-Lösung zugegeben, bis sich eine leichte, dauerhafte Rottönung einstellte. Der Verbrauch an NaOH (in ml) wurde mit 0,2 multipliziert, dies ergab den Gehalt an freiem CO₂ in [mg/l] (Schwoerbel, 1980).

Die Messung des freien CO₂-Gehalts im Wasser wurde nur zu Beginn und am Ende des Versuchs durchgeführt, da für die Bestimmung 100ml Wasser benötigt wurden, die bei diesem Versuch nicht alle zwei Tage zur Verfügung standen (siehe 2.9.3).

2.9.4 Messung der Membranspannung

Dünne Kapillaren aus Borosilikatglas, die ein Filament enthielten (GB150F10, Science products GmbH), wurden mit Hilfe eines vertikalen Pipettenziehers (Model 750, David Kopf, USA) zu Glasmikroelektroden (Messpipetten) ausgezogen. Die dabei entstandenen feinen Spitzen der Pipetten hatten einen Durchmesser von 1-2µm (Kettner, 1999). Die Messpipette (MP) wurde mit einer 3mM KCl-Lösung luftblasenfrei gefüllt und in einem Mikromanipulator (MM) fixiert, der sich auf einem luftgefederten Tisch in einem Faradayschen Käfig befand. Abb. 9 zeigt den Aufbau der Messanordnung. Ein chlorierter Silberdraht, der Elektrodendraht, wurde in die Pipette eingeführt und am anderen Ende mit einem Elektrometer (solid state 610 C, Keithly Instruments, USA) elektrisch verbunden. Die Referenzelektrode (RE),



Abb. 9: Anordnung zur Messung der Membranspannung

die ebenfalls am Elektrometer (EM) angeschlossen war, enthielt einen Ag/AgCl-Draht, der in eine 1M KCl-Lösung getaucht war.

Sie ragte in die Badlösung (0,1mM KCl, 0,1mM CaCl₂, pH 8.0). Das Elektrometer (EM) wurde auf -300mV eingestellt und der Ausschlag des Schreibers geeicht. Auf dem Schreiber-Papier entsprachen 2,5cm (10 Kästchen) in der Breite -50mV. Die Laufgeschwindigkeit betrug 20cm/h.

Die Blätter von *M. spicatum* und *M. aquaticum* wurden in einer Halterung lose befestigt dann so orientiert, dass die adaxiale Blattseite nach oben zeigte und schließlich mit Vaseline fixiert. Im Anschluss daran wurde alles vollständig mit Badlösung bedeckt, die Referenzelektrode sowie die Messpipette hinein getaucht und schließlich der Null-Punkt am Elektrometer und am Schreiber eingestellt. Die Annäherung der Messpipette an das Blatt erfolgte mit Hilfe der Mikrometerschrauben am Mikromanipulator und wurde mit einem Zeiss-Binokular (3,2fach vergrößert) kontrolliert. Die Einstichstelle lag stets in einer Blattfieder, ca. 1mm oberhalb ihres basalen Endes, in der Nähe der Mittelrippe (Abb. 10). Sobald das Elektrometer ausschlug, wurde der Vorschub der Pipette gestoppt. War der Ausschlag stabil, wurde die Messung durchgeführt.

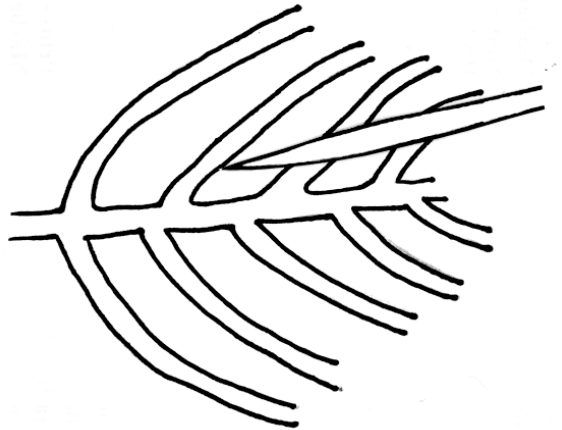


Abb. 10: Einstichstelle am Blatt von *Myriophyllum spec.*

2.9.5 Ermittlung der unterschiedlichen FITC-Fluoreszenz-Intensitäten

Neben der bildlichen Dokumentation der Versuchsergebnisse von 2.9.1 und 2.9.2 mit dem CLSM (siehe 2.5.4.3), konnten mit Hilfe des Computerprogramms TCSNT des Mikroskops die unterschiedlichen Intensitäten der FITC-Fluoreszenz in den Versuchsansätzen von *Myriophyllum spicatum* gemessen. Dafür wurden durch Epidermiszellen von *M. spicatum* Profile gelegt, auf deren Länge dann das Programm die Intensitäten der FITC-Fluoreszenz messen konnte. Die Ergebnisse wurden grafisch ausgegeben.

Die dimensionslose Skala der Lichtintensität verläuft von 0 bis 255. In Abb. 11 ist ein Beispiel für solch eine Grafik dargestellt. Die grüne Linie zeigt die Fluoreszenz-Intensität des 1. Kanals und stellt die FITC-Fluoreszenz dar. Die rote Linie zeigt die Primärfluoreszenz des 2. Kanals an. Die Profile werden so in die Bilder gelegt, dass sie von der Außenseite der Zelle zur Innenseite laufen. Der Beginn der Grafik stellt daher stets die perikline Außenseite einer Zelle dar, das Ende die perikline

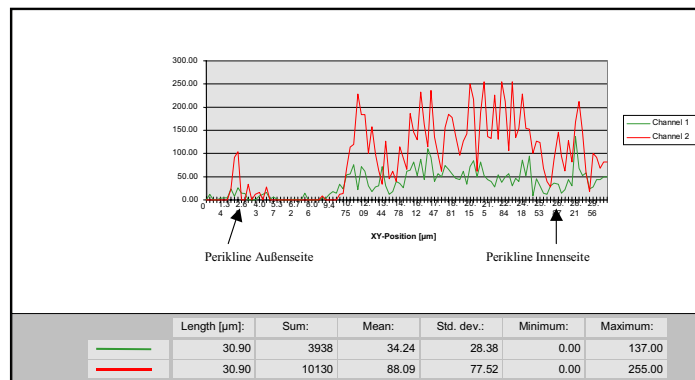


Abb. 11: Bsp. einer Intensitäts-Grafik für die FITC- und Primärfluoreszenz

Innenseite. Der Bereich in der Grafik-Mitte zeigt bei einigen Zellen die antiklinen Seiten an, je nachdem, in welcher Ebene die CLSM-Aufnahme entstanden ist.

3. Ergebnisse

3.1 Physiologische Polarität bei Blättern submerser Pflanzen

Bei einigen Blättern submerser Makrophyten zeigte sich mit dem pH-Indikator Bromkresolpurpur schon nach kurzer Belichtungszeit eine Gelbfärbung in der Umgebung der gesamten Blattoberfläche. Bei anderen Pflanzen traten an den abaxialen Seiten der Blätter Gelbfärbungen auf, während die adaxialen Blattflächen sich violett färbten. Wiederum andere Blätter zeigten keine Reaktionen. Die Ansäuerungen der gesamten Blattoberflächen waren nur am Vormittag zu beobachten. Nachmittags brachte auch eine längere Beleuchtungszeit kaum oder keine Reaktion. Die Reaktionen der polaren Blätter bei Belichtung waren dagegen jederzeit zu beobachten.

Solche physiologischen Polaritäten, bei denen sich die Blattunterseite gelb und die Blattoberseite violett färbte, traten sowohl bei monocotylen als auch bei dicotylen Angiospermen auf.

3.1.1 Polare Blätter

Die Blätter von *P. lucens* wiesen eine solche physiologische Polarität auf. Das Blatt des Laichkrauts färbte den Agar an seiner abaxialen Blattseite gelb, was darauf hin deutet, dass die Auflagefläche angesäuert wurde, während die adaxiale Seite sich violett anfärbte (Abb. 12 und 13). Die Blätter von *P. perfoliatus* verhielten sie ebenso (ohne Abb.).

Das Schwimmblatt von *P. natans* zeigte ebenfalls diese Reaktion. An seiner Blattunterseite trat eine leicht Gelbfärbung auf (Abb. 14), während die Blattoberseite dunkelrot wurde (Abb. 15). Im Vergleich zu *P. lucens*, wurde die Blatumgebung jedoch nicht so stark alkalisch.

Auch die beiden Wasserpestarten *E. canadensis* (Abb. 16) und *E. nuttallii* (ohne Abb.) zeigten eine deutliche physiologische Polarität. Die Umgebung ihrer Blattunterseiten wurden gelb, während sich an den Blattoberseiten der Agar violett einfärbte.

3.1.2 Nicht polare Blätter

Die Unterwasserblätter von *P. natans* zeigten im Gegensatz zu ihren Schwimmblättern keine physiologische Polarität. Ihre Umgebung säuerte sich sowohl an der adaxialen, als auch an der abaxialen Blattseite an, so dass sich der Agar auf beiden Seiten des Blattes gelb färbte (Abb. 17). Ebenso verhielten sich die Blätter von *S. aloides*. Beide Blattseiten färbte den Agar gelb an (Abb. 18).

Die gleiche Reaktion konnte auch bei Blättern von *M. spicatum* beobachtet werden. Die Umgebung der ganzen Blattoberfläche verfärbte sich gelb (Abb. 19). Gelegentlich werden statt einer Ansäuerung auch Alkalisierungen an den Blattoberflächen beobachtet (Abb. 20).

Die Blätter von *C. caroliniana* zeigten ebenfalls keine physiologische Polarität. Sowohl an ihrer Blattoberseite, als auch an ihrer Blattunterseite waren schwache Gelbfärbungen des Agars zu beobachten (Abb. 21).

3.1.3 Blätter, die keine Reaktion zeigen

Bei einer Reihe von Submersophyten und Helophyten konnten weder Alkalisierungen noch Ansäuerungen beobachtet werden, wie sie unter 3.1.1 und 3.1.2 beschrieben wurden, z.B. bei den Unterwasserblättern von *H. vulgaris*. Es zeigten sich keinerlei Reaktionen auf dem Agar (Abb. 24), selbst nach längeren Belichtungszeiten. Das pH-Milieu der unmittelbaren Umgebung veränderte sich nicht. Auch die fein zerschlitzten Blätter von *R. penicillatus* zeigten keine Reaktion (ohne Abb.).

In der unmittelbaren Umgebung der Blattoberfläche von *M. verticillatum* (Abb.22) und *M. aquaticum* (Abb. 23) traten keine Farbreaktionen in der Umgebung der Blätter auf. Bei *C. demersum* (Abb. 20) sowie bei *C. submersum* (ohne Abb.) zeigte sich ebenfalls keine Reaktion in der Umgebung der Blattoberfläche. Hier konnten ebenfalls, auch nach längeren Belichtungszeiten keine Verfärbungen auf dem Agar beobachtet werden.

3.1.4 *Vallisneria spiralis*

Die Blätter von *V. spiralis* zeigten ein differenzierteres Muster auf dem Agar als die anderen polaren und nicht polaren Blätter. Bei verschiedenen Ansätzen zeigte sich einmal eine Rotfärbung an der Blattspitze, was auf eine Alkalisierung hindeutet. Etwas dahinter wurde eine gelbe Bande am Blatt sichtbar und darauf folgte wieder eine rote (Abb. 27). Bei einem anderen Ansatz zeigte sich an der Spitze des Blattes eine Gelbfärbung des Agars und die nachfolgende Bande war rot (Abb. 26). Ein Unterschied zwischen Blattoberseite und Blattunterseite konnte nicht erkannt werden. Die Umgebung der Blattspitze färbte sich sowohl an der Oberseite als auch an der Unterseite rot oder gelb an.

Tafel 1: Physiologische Polarität bei Blätter von submersen Angiospermen. Abb. 12: Adaxiale Seite eines Blattes v. *P. lucens*. Abb. 13: Abaxiale Seite eines Blattes v. *P. lucens*. Abb. 14: Blattoberseite des Schwimmblattes v. *P. natans*. Abb. 15: Blattunterseite des Schwimmblattes v. *P. natans*. Abb. 16: Blatt v. *E. canadensis*, lateral; Oberseite (OS); Unterseite (US). Abb. 17: Unterwasserblatt v *P. natans*, lateral.

Tafel 2: Physiologische Polarität bei Blättern von submersen Angiospermen. Abb. 18: Blatt v. *S. aloides*, lateral. Abb. 19: Adaxiale Seite eines Blattes v. *M. spicatum*. Abb. 20: Adaxiale Seite eines Blattes v. *M. spicatum*. Abb. 21: Adaxiale Seite eines Blattes v. *C. caroliniana*. Abb. 22: Adaxiale Seite eines Blattes v. *M. verticillatum*. Abb. 23: Adaxiale Seite eines Blattes v. *M. aquaticum*.

Tafel 3: Physiologische Polarität bei Blätter von submersen Angiospermen. Abb. 24: Adaxiale Seite eines Blattwirtels v. *H. vulgaris* Abb. 25: Adaxiale und abaxiale Seite der Blattzipfel v. *C. demersum*. Abb. 26 und 27: Blattflächen v. *Vallisneria spiralis* mit unterschiedlichen Ansäuerungsmustern

Tafel 1

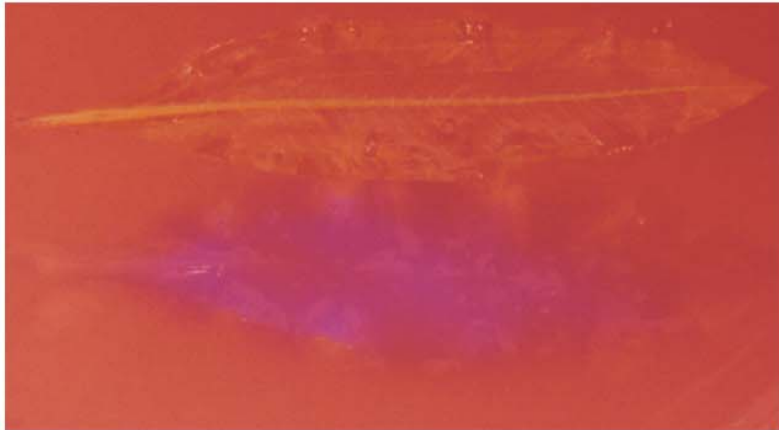


Abb.8

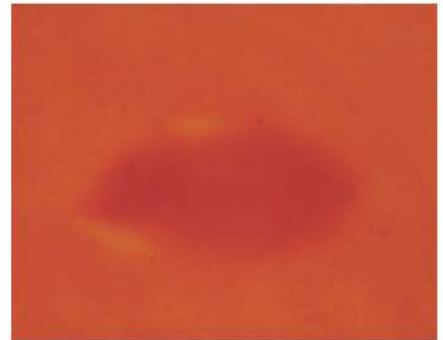


Abb.10



Abb.9

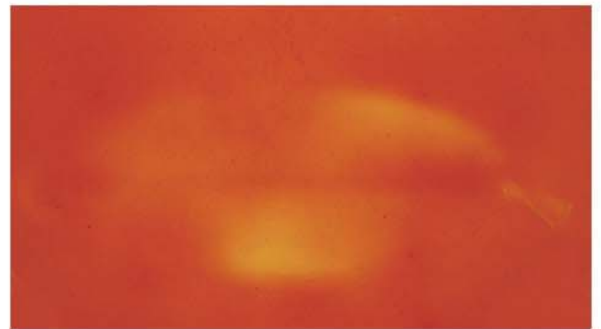


Abb.11

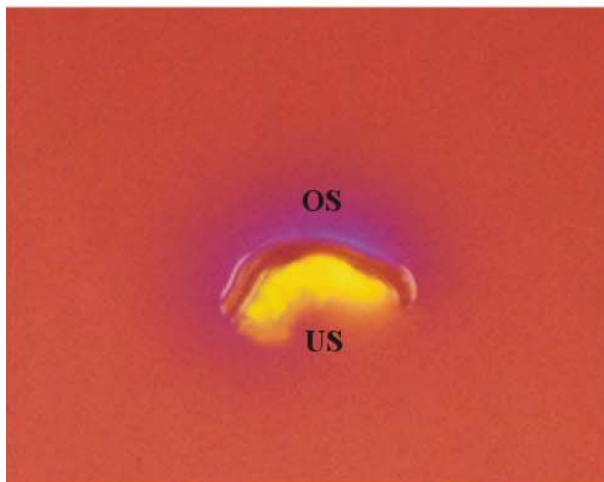


Abb.12

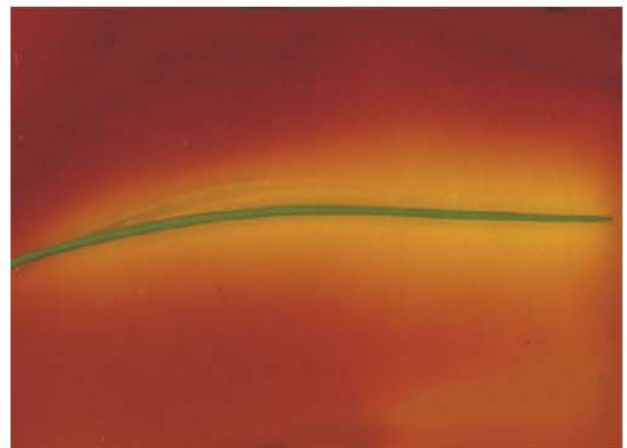


Abb.13

Tafel 2

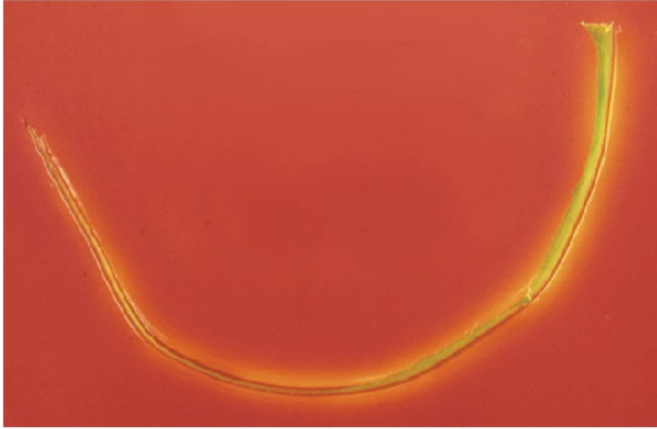


Abb.14

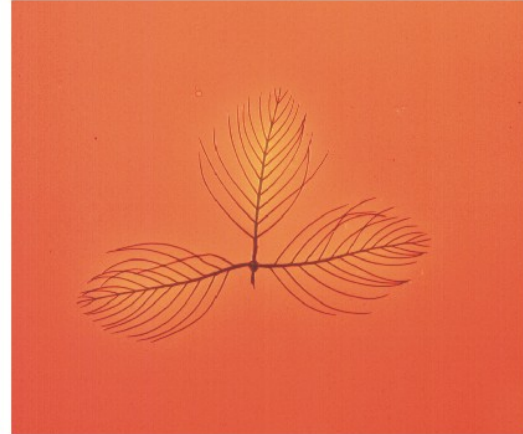


Abb. 15



Abb. 16



Abb. 17



Abb.18



Abb.19

Tafel 3

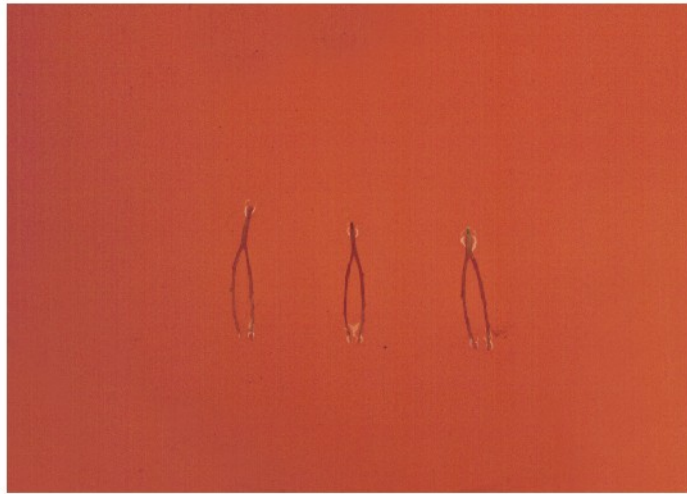


Abb.20

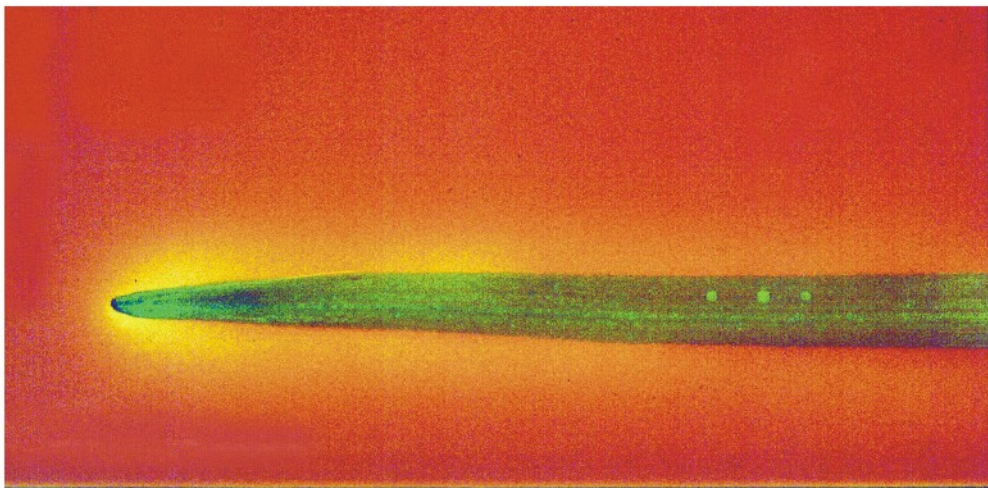


Abb.21

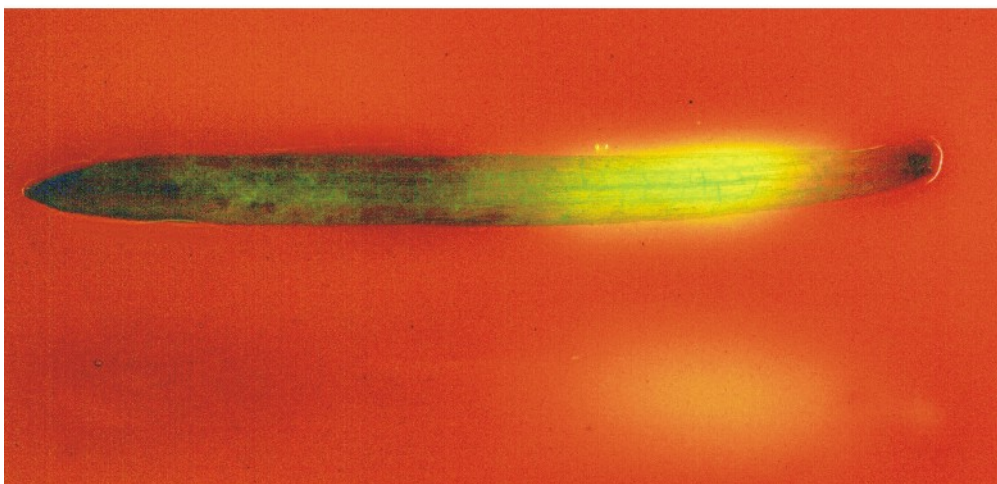


Abb.22

3.2 Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie der Wasserpflanzen

Der Aufbau von Blatt, Stängel und Wurzel bei Hydrophyten weicht in histologischer und cytologischer Hinsicht in manchen Punkten von dem der Landpflanzen ab. In zahlreichen frühen Veröffentlichungen wurde über die unterschiedlichen Strukturen bei Wasserpflanzen berichtet (Sculthorpe, 1967, Napp-Zinn, 1984). Ein Versuch, die Pflanzen aufgrund ihrer morphologischen und histologischen Merkmale in verschiedene Gruppen einzuteilen, gestaltet sich schwierig. Daher erfolgt die Gruppierung der Blätter zunächst nach äußeren Merkmalen.

3.2.1. Die Blätter der Wasserpflanzen

3.2.1.1 Wasserpflanzen mit fein zerschlitzten Blättern

Die feinen Fiederblätter der Tausendblattgewächse *M. spicatum* (Abb. 28), *M. aquaticum* (Abb. 29) und *M. verticillatum* (Abb. 30), sowie von *C. caroliniana* (Abb. 31), *R. penicillatus* (Abb. 32) und *C. demersum* (Abb. 33) sind radiär symmetrisch aufgebaut. Sie ähneln dem Aufbau nach äquifazialen Rundblättern. Nach einer astomatischen Epidermis folgt ein 3-5 reihiges, mit Interzellularen durchsetztes Mesophyll, dessen Zellen bei *M. spicatum* und *C. caroliniana* deutlich größer als die der Epidermis sind, bei *M. verticillatum*, *M. aquaticum* und *R. penicillatus* aber in etwa gleich groß erscheinen. Bei *C. demersum* fallen große Lakunen in der Blattmitte auf, die einen Großteil des Blattvolumens einnehmen.

Während bei *M. verticillatum* (Abb. 34) die periklinen Außenseiten der Epidermiszellen leicht und bei *M. aquaticum* stark nach Außen gewölbt sind (Abb. 29, 35, 36), ist dies bei *M. spicatum* (Abb. 28, 37) und *C. caroliniana* (Abb. 31, 43) nicht zu beobachten. Auch bei *R. penicillatus* weisen die Epidermiszellen eine leichte Außenwölbung an den periklinen Außenseiten auf (Abb. 32, 38). Zusätzlich haben sich bei manchen Epidermiszellen zwischen einer äußeren und einer inneren Zellwand große Spalten (Abb. 39, 42) gebildet, die einen Hohlraum im Apoplasten bilden und sich bis in die periklinen Seitenwände hinein fortsetzen. Dort finden sich dann, ins Cytoplasma hinein ragende Wandprotuberanzen, die für Transferzellen eine typische Struktur (Abb. 39) darstellen. Solche Wandprotuberanzen sind auch bei *C. caroliniana* zu finden (Abb. 43, 46).

Bei allen Wasserpflanzen findet man eine Cuticula auf den periklinen Außenwänden der Epidermiszellen aufliegen. Diese hebt sich mehr oder weniger deutlich von der darunter liegenden Zellwand ab. Während sie bei *M. spicatum* (Abb. 40) und *C. caroliniana* (Abb. 43) kaum zu erkennen ist, zeigt sie sich bei *M. verticillatum* um so deutlicher (Abb. 41). Auch bei *R. penicillatus* hebt sie sich deutlich von der äußeren Zellwand ab (Abb. 39).

Die periklinen Außenzellwände bei *M. spicatum* (Abb. 40), *M. verticillatum* (Abb. 41) und *C. caroliniana* (Abb. 43) sind wesentlich stärker ausgebildet als ihre antiklinen Seitenwände. Bei *M. spicatum* ist der mehrschichtige Aufbau aus primären und sekundären Wandbestandteilen deutlich zu erkennen. Gelegentlich findet man ihre Außenzellwände aufgequollen und die Micellen gelockert vorliegen (Abb. 44). Zu den antiklinen Seitenwänden hin verjüngen sich die Außenwände rasch und zeigen keine auffälligen Strukturen mehr. Die Zellwände von *M. aquaticum* sind dagegen auf allen Seiten gleich dick und weisen keine besonderen strukturellen Eigenschaften auf (Abb. 35).

Eine Besonderheit von Hydrophyten ist das Vorhandensein von Chloroplasten in den Epidermiszellen. Bei *M. spicatum*, *M. verticillatum*, *R. penicillatus* und *C. caroliniana* findet man in diesen Zellen große Chloroplasten. Die länglich eiförmigen Plastiden ähneln den in Lehrbüchern beschriebenen Schattenchloroplasten (Lütge et al, 1988). Sie enthalten dicke Granathylakoidstapel, einige Plastoglobuli und enthalten i.Allg. keine Stärkekörner (Abb. 41, 42, 43, 44). Die Epidermiszellen der Unterwasserblätter von *M. aquaticum* sind dagegen chloroplastenfrei (Abb. 35). Auch in den großen, nach Außen gewölbten Epidermiszellen der Rhachis sind keine Chloroplasten zu finden (Abb. 36). Neben den Chloroplasten sind auch zahlreiche Mitochondrien in den Epidermiszellen von *M. spicatum*, *C. caroliniana* und *R. penicillatus* lokalisiert. Man findet sie vor allem in der Nähe von Chloroplasten und an den Wandprotuberanzen von *R. penicillatus* und *C. caroliniana* (Abb. 39, 46). Bei *M. spicatum* liegen sie in erster Linie an den antiklinen Seitenwänden (Abb. 45). Im Gegensatz dazu sind Anhäufungen von Zellorganellen auf bestimmte Zellregionen bei *M. verticillatum* und *M. aquaticum* nicht zu finden. Hier sind die vereinzelt vorhandenen Mitochondrien gleichmäßig auf allen Seiten der Zelle verteilt (ohne Abb.)

In den meist wesentlich größeren Mesophyllzellen findet man von *M. spicatum*, *R. penicillatus* und *C. caroliniana* deutlich weniger Chloroplasten (Abb. 37, 38, 49). Ihre Anzahl nimmt zur Blattmitte hin noch weiter ab. Bei *M. aquaticum*, deren Epidermiszellen frei von Chloroplasten sind, findet man im Mesophyll zahlreiche Chloroplasten, die neben dicken Granastapeln und einigen Plastoglobuli, z.T. recht große Stärkekörner enthalten (Abb. 36).

Tafel 4: Fiederblattquerschnitte, gefärbt mit Toluidinblau. Abb. 28: *M. spicatum*. Abb. 29: *M. aquaticum*. Abb. 30: *M. verticillatum*. Abb. 31: *C. caroliniana*. Abb. 32: *R. penicillatus*. Abb. 33: *C. demersum*.

Tafel 5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Fiederblattquerschnitten. Abb. 34: Übersicht v. *M. verticillatum*. Abb. 35: Epidermiszelle v. *M. aquaticum*. Abb. 36: Epidermis u. Mesophyll d. Rhachis v. *M. aquaticum*. Abb. 37: Übersicht v. *M. spicatum*.

Tafel 6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Fiederblattquerschnitten. Abb. 38: Übersicht v. *R. penicillatus*. Abb. 39: Epidermiszelle mit Spalt v. *R. penicillatus*. Abb. 40: Zellwand v. *M. spicatum*. Abb. 41: Epidermiszelle v. *M. verticillatum*.

Tafel 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen v. Fiederblattquerschnitten. Abb. 42: Epidermiszelle mit Spalt v. *R. penicillatus*. Abb. 43: Epidermiszelle v. *C. caroliniana*. Abb. 44: Zellwandstruktur der periklinen Außenseite einer Epidermiszelle v. *M. spicatum*.

Tafel 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen v. Fiederblattquerschnitten. Abb. 45: Epidermiszelle v. *M. spicatum*. Abb. 46: Epidermiszelle v. *C. caroliniana*. Abb. 47: Epidermiszelle mit Spalt v. *R. penicillatus*. Abb. 48: Epidermis v. *M. verticillatum*.

Tafel 9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen v. Fiederblattquerschnitten. Abb. 49: Mesophyll v. *C. caroliniana*. Abb. 50: Ausschnitt d. Querschnittes d. Rhachis v. *M. spicatum*. Abb. 51: Leitgewebe v. *R. penicillatus*. Abb. 52: Geleitzelle im Leitgewebe v. *R. penicillatus*.

Tafel 10: Elektronenmikroskopische Aufnahmen v. Fiederblattquerschnitten. Abb. 53: Leitgewebe v. *M. spicatum*. Abb. 54: Leitgewebe d. Rhachis v. *M. spicatum*. Abb. 55: Leitgewebe v. *M. aquaticum*.

Tafel 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen v. Fiederblattquerschnitten. Abb. 56: Epidermis- und Mesophyllzellen v. *C. demersum*. Abb. 57a + b: Übersicht und Detail d. Leitgewebes v. *C. demersum*.

Abkürzungen der Tafeln 4-11:

Äußere Zellwand (Äzw); Chloroplast (Chl); Cuticula (Cu); Cytoplasma (Cy); Epidermis (Ed); Epidermiszelle (Ez); Geleitzelle (Gz); Idioblast (Id); „inner space“ (Is); Interzellulare (Iz); Innere Zellwand (Izw); Lakune (L); Leitbündel (Lb); Leitgewebe (Lg); Mesophyll (Me); Mitochondrium (Mi); Mesophyllzelle (Mz); Plasmamembran (Pm); Phloemparenchym (Pp); Siebröhre (Sr); Transferstruktur(Ts); Vakuole (V); Zellkern (Zk); Zellwand (Zw);

Tafel 4

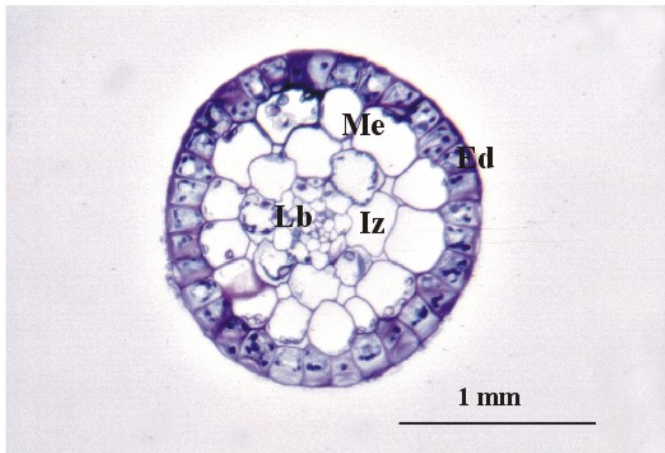


Abb. 28

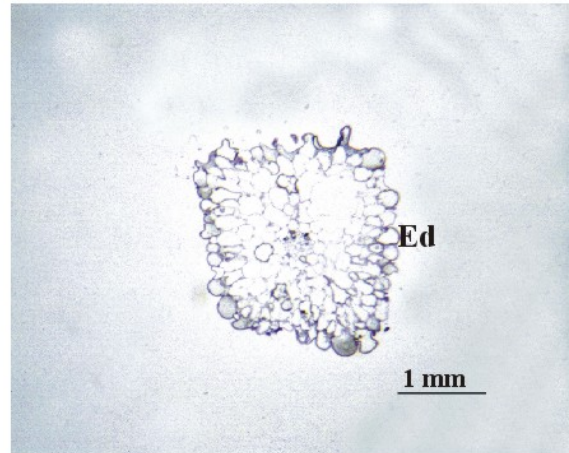


Abb. 29

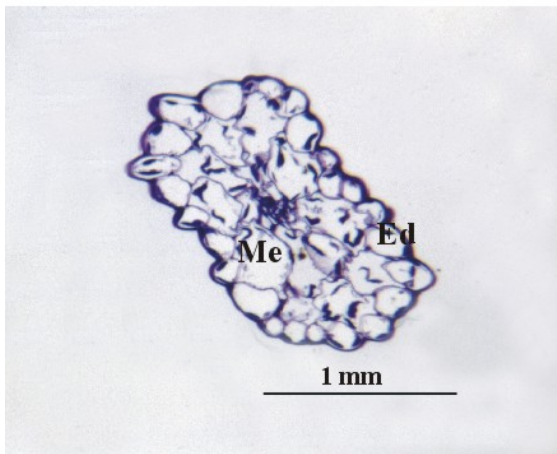


Abb. 30

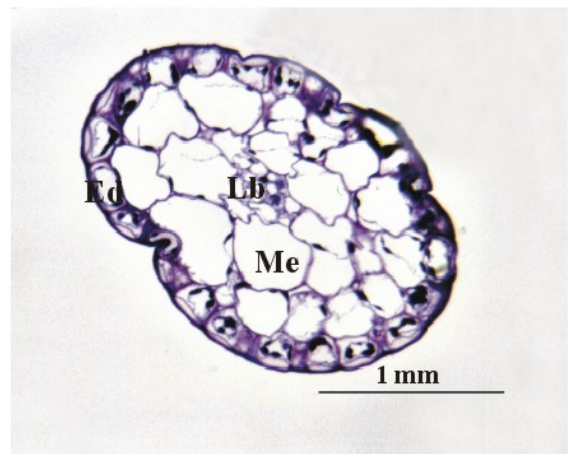


Abb. 31

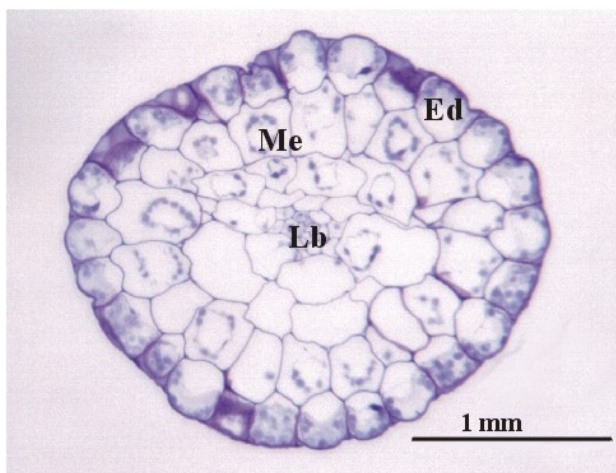


Abb. 32

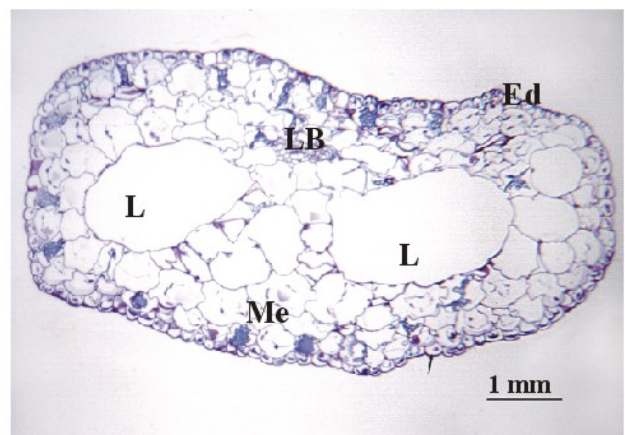


Abb. 33

Tafel 5

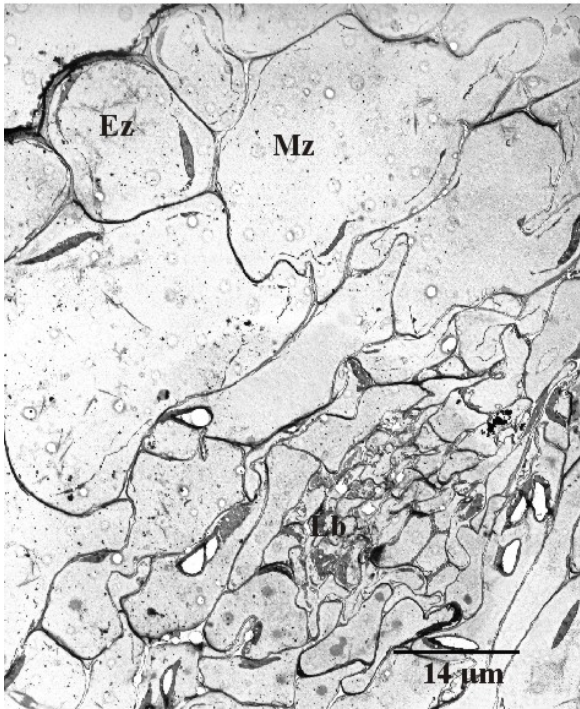


Abb. 34

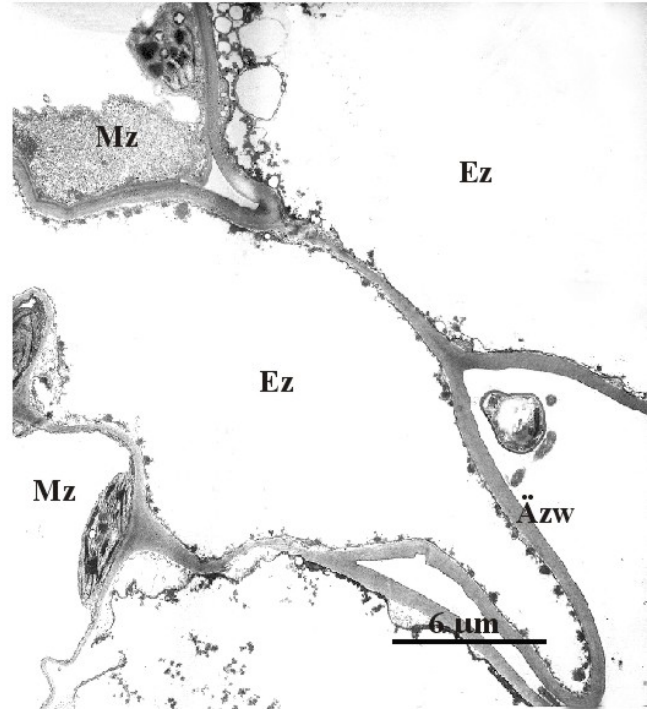


Abb. 35

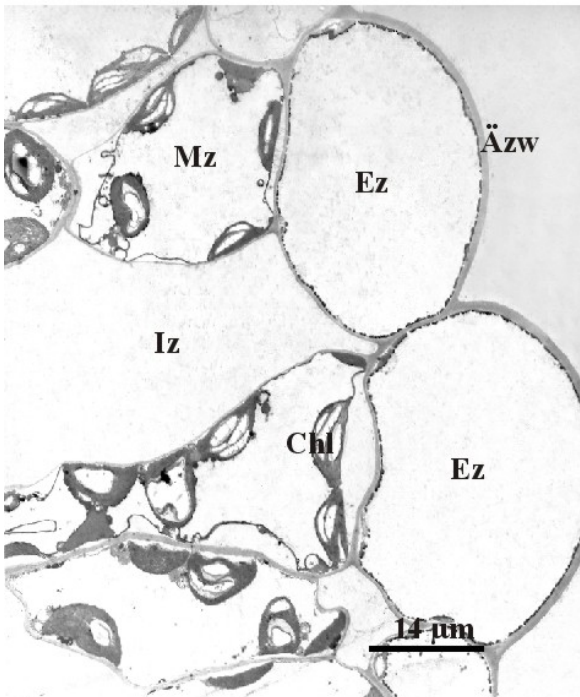


Abb. 36

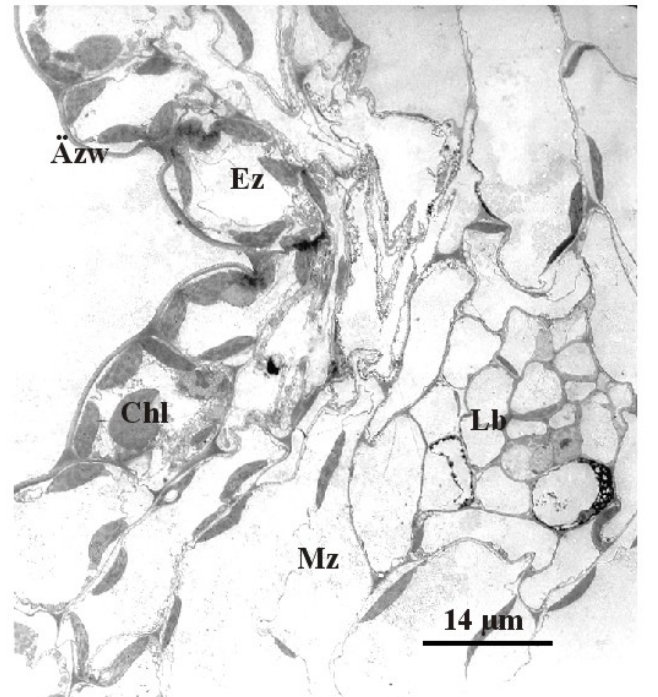


Abb. 37

Tafel 6

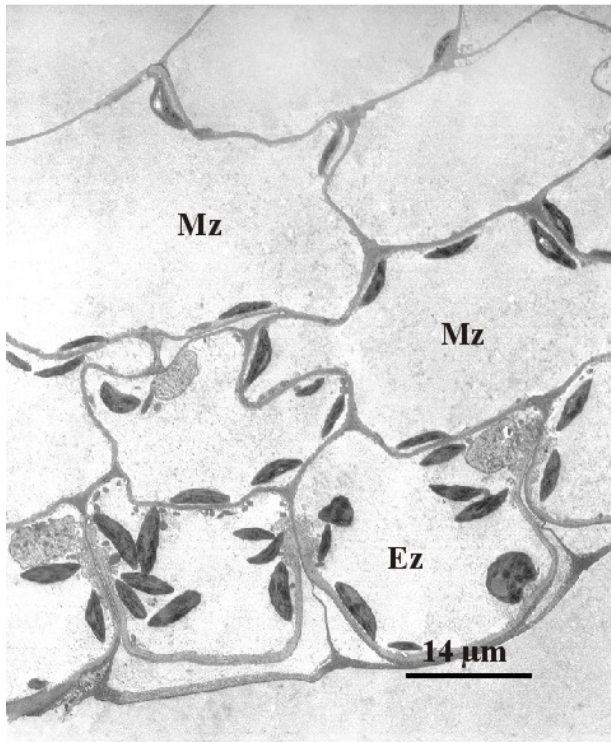


Abb. 38

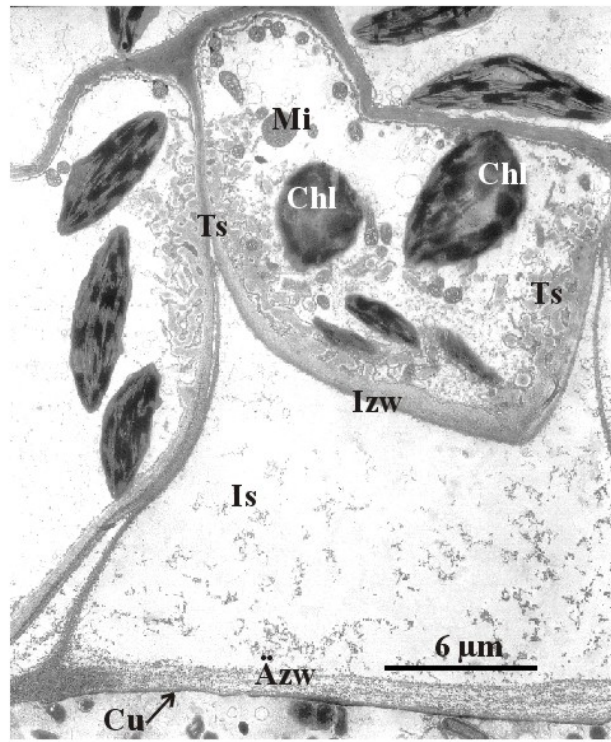


Abb. 39

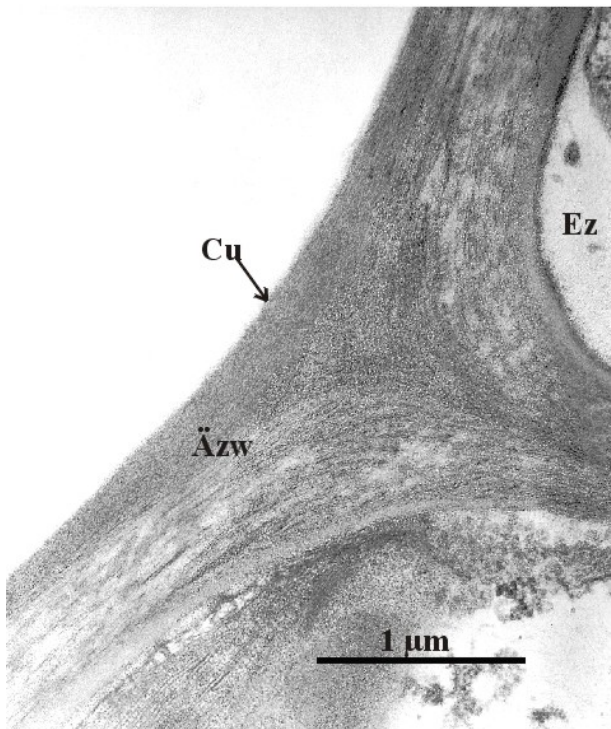


Abb. 40

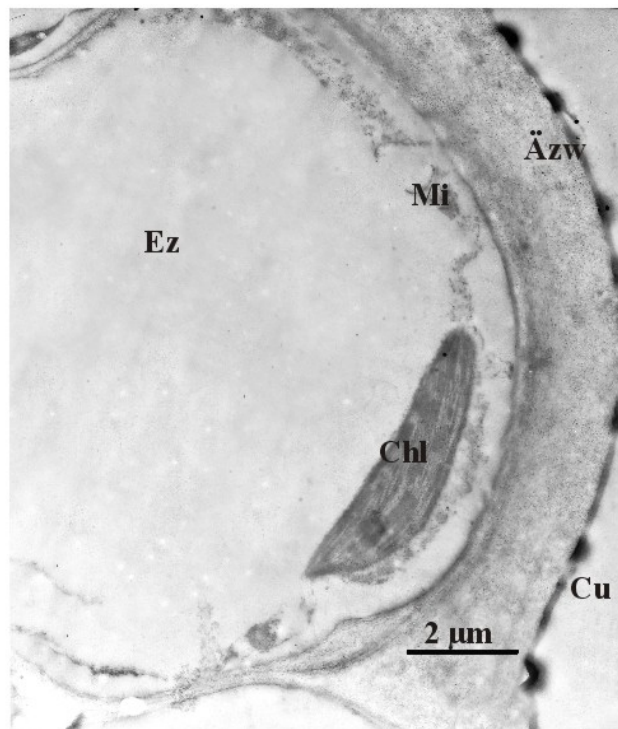


Abb. 41

Tafel 7

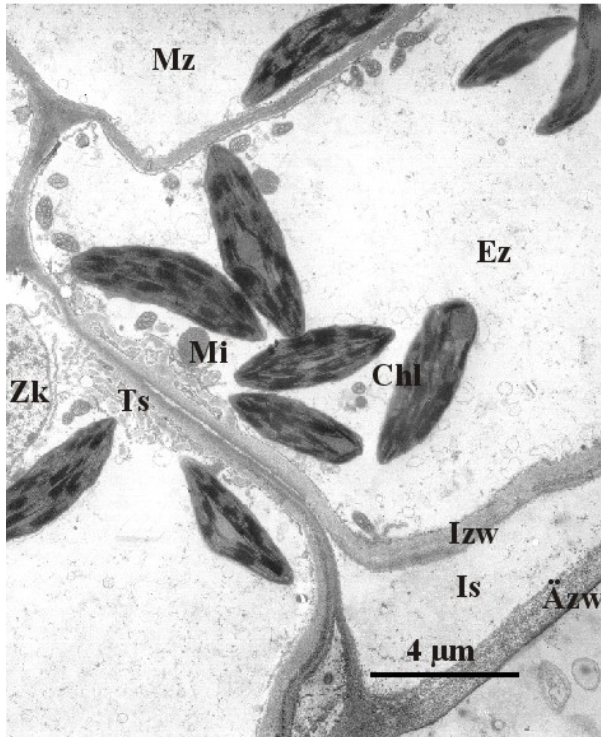


Abb. 42

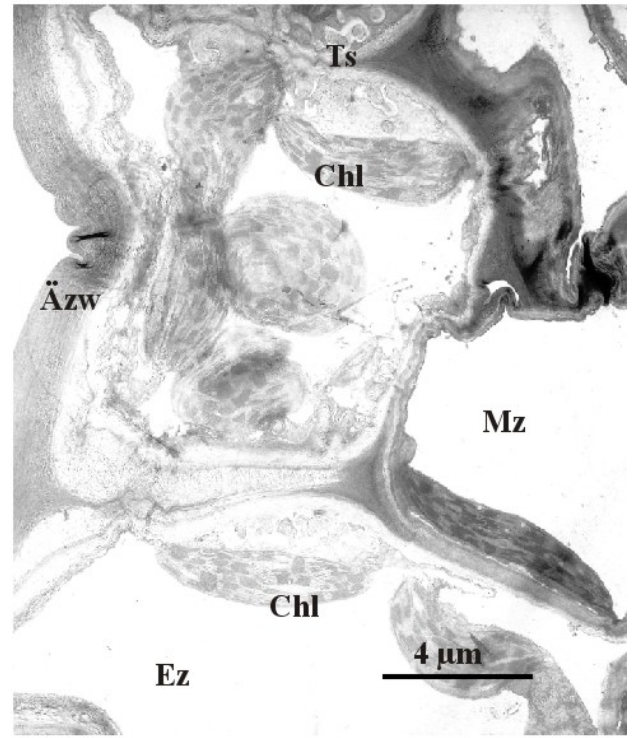


Abb. 43

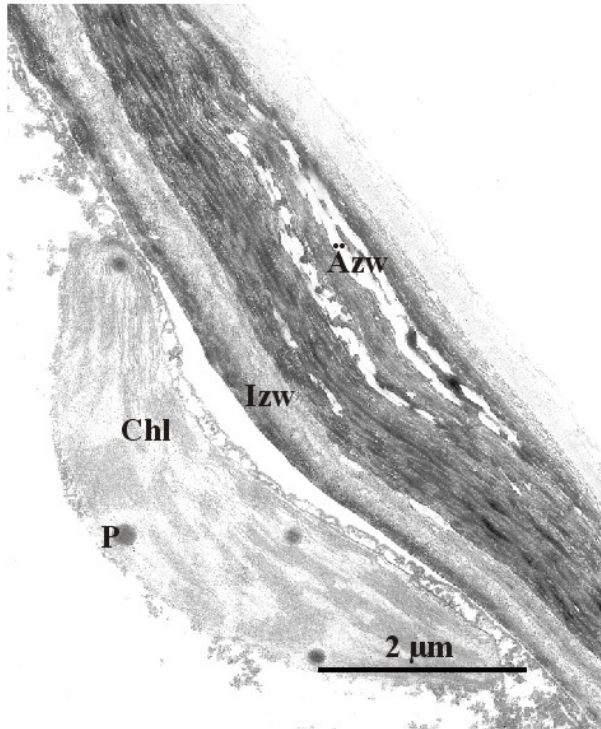


Abb. 44

Tafel 8

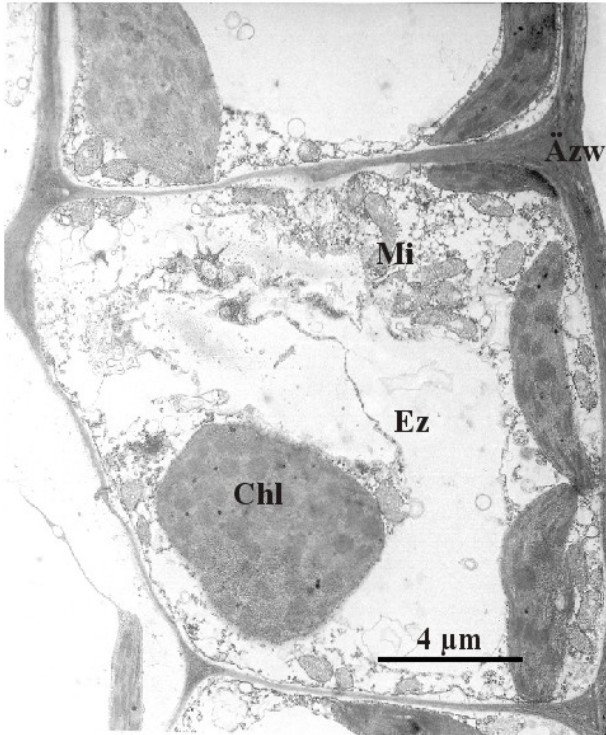


Abb. 45

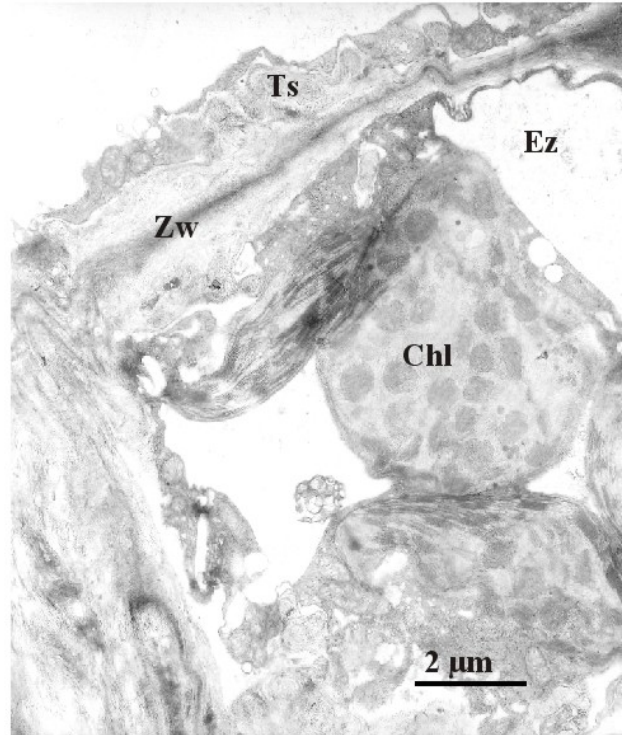


Abb. 46

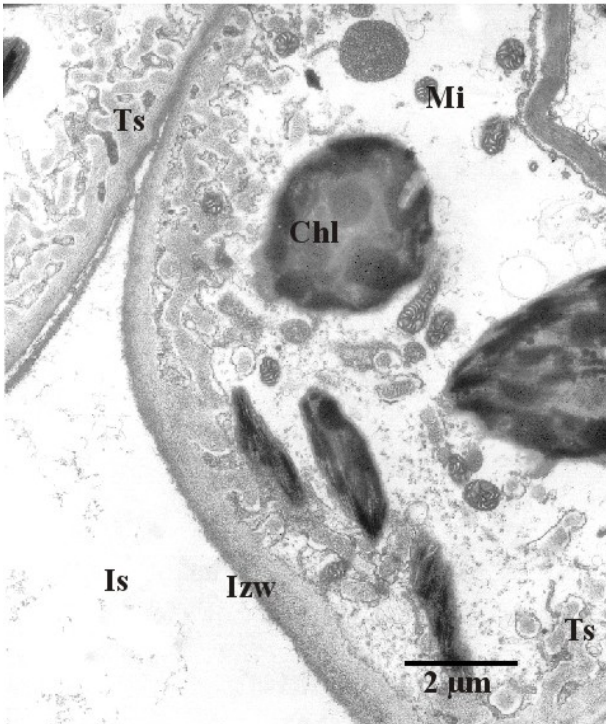


Abb. 47

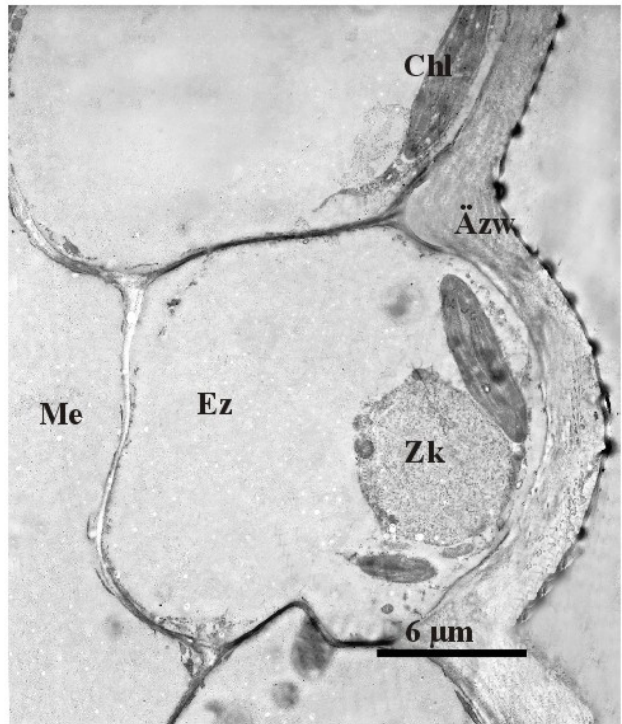


Abb. 48

Tafel 9

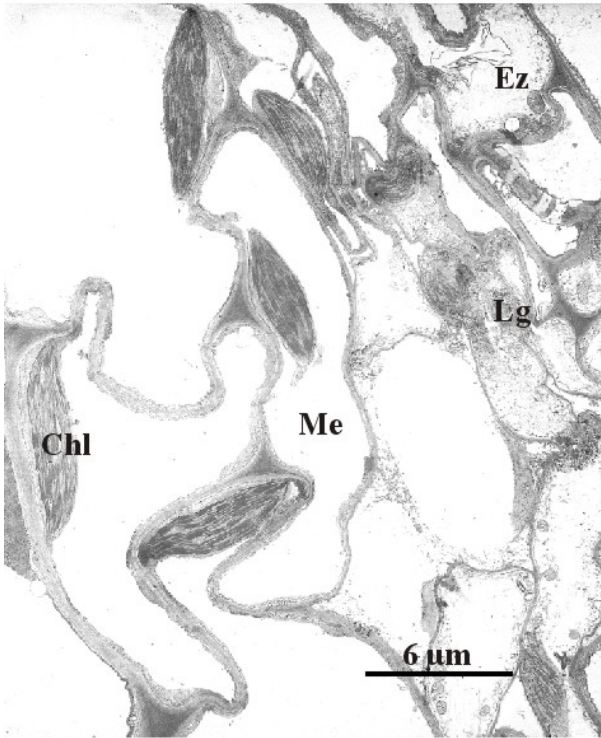


Abb. 49

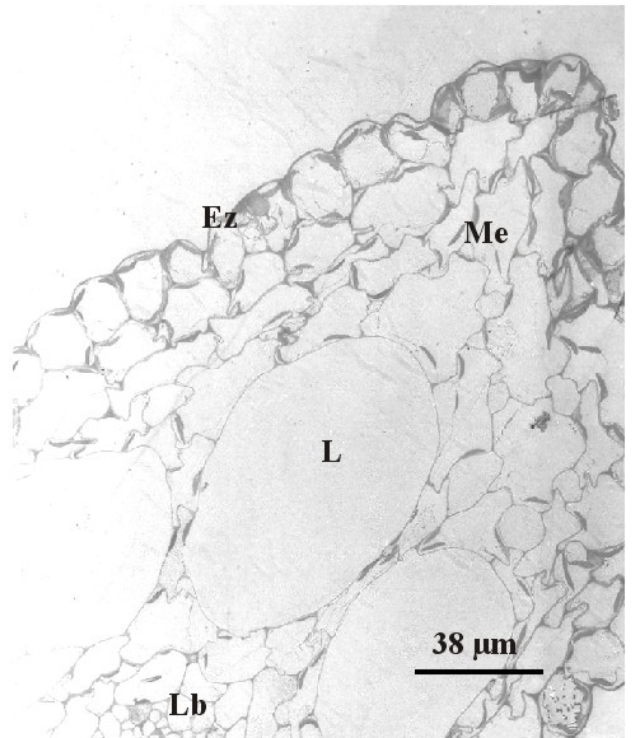


Abb. 50

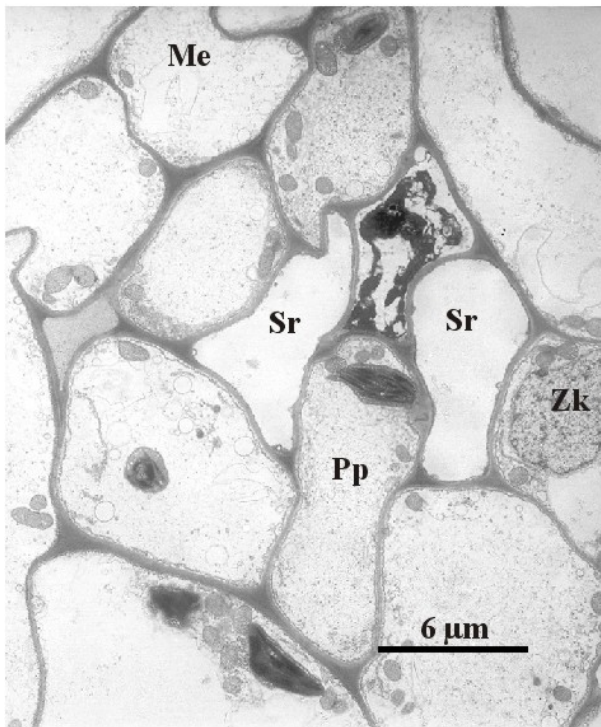


Abb. 51

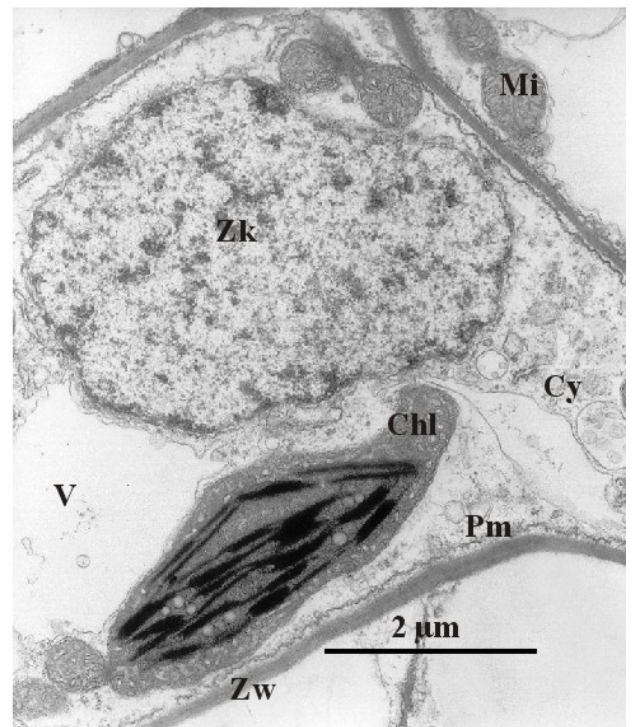


Abb. 52

Tafel 10

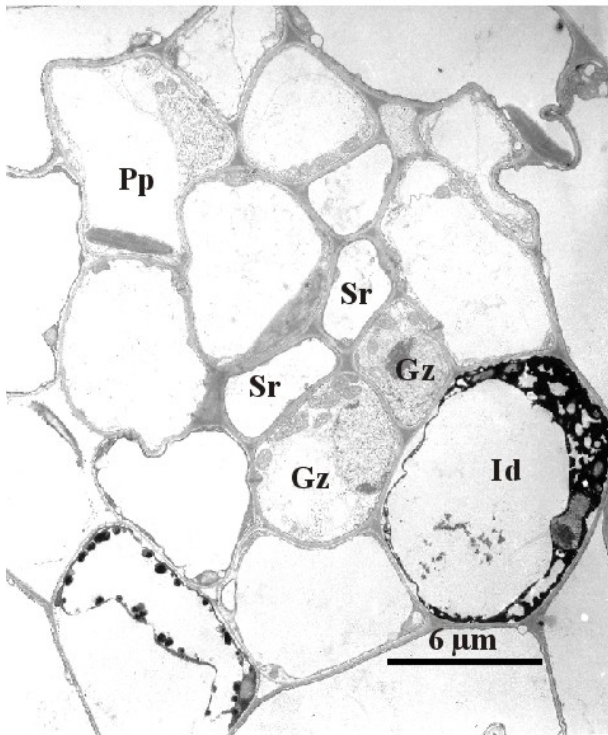


Abb. 53

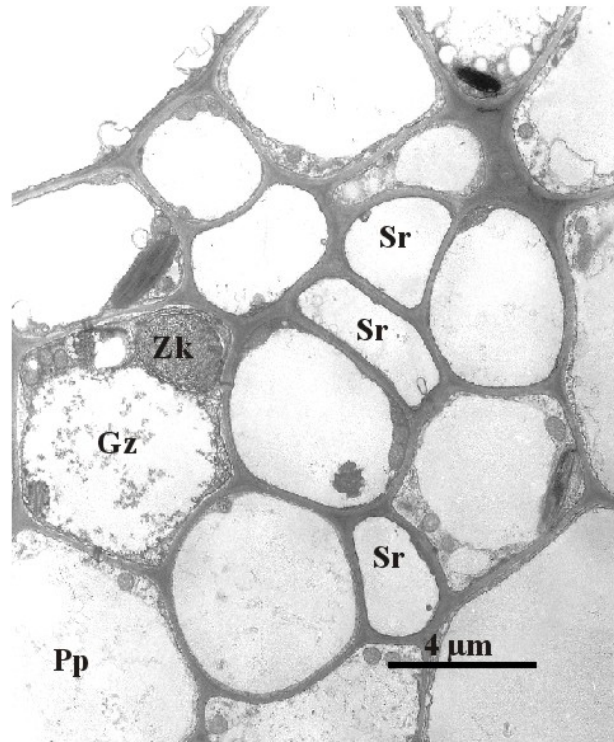


Abb. 54

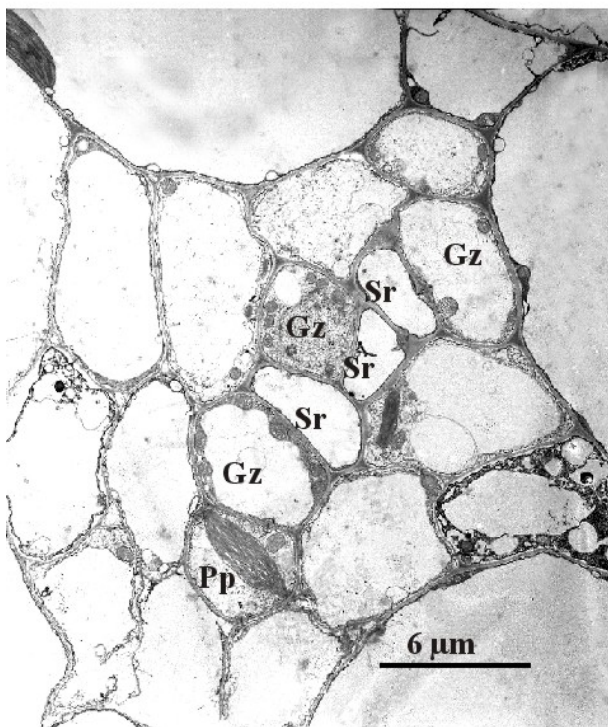


Abb. 55

Tafel 11

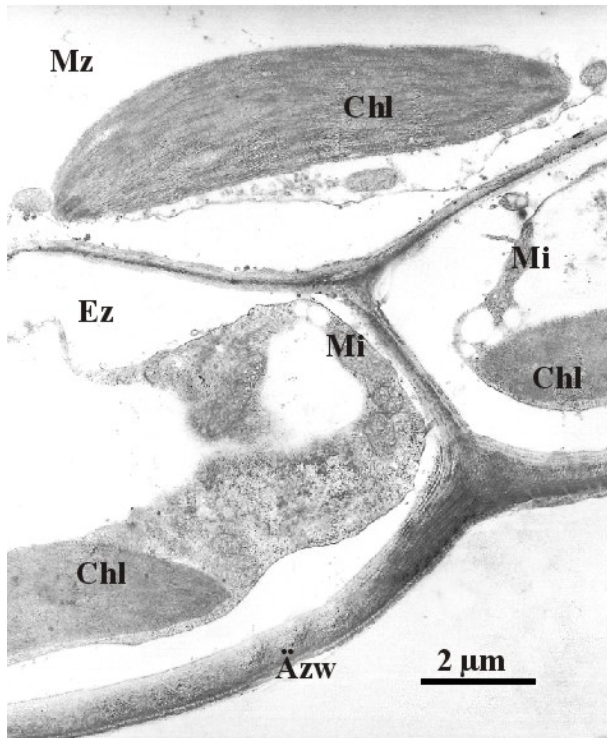


Abb. 56

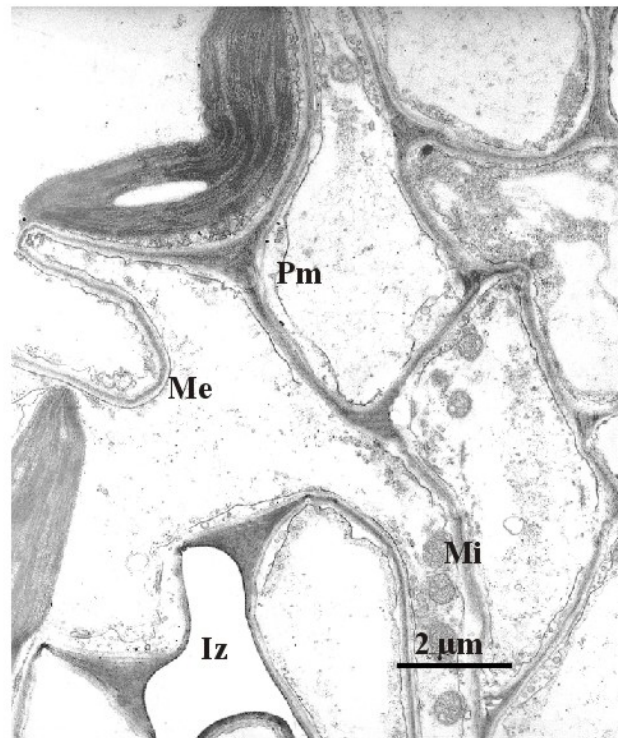


Abb. 57

Während das Plasma und die Zellorganellen der Epidermiszellen einen großen Teil des Zellvolumens ausfüllen, nehmen die Vakuolen der Mesophyllzellen den meisten Raum ein und drängen das Plasma und die darin enthaltenen Zellorganellen an den Rand. Das Mesophyll selbst ist oft von einzelnen Interzellularen unterbrochen, die jedoch selten die Größe von Mesophyllzellen annehmen können. In den Blattspindeln (Rhachis) dagegen werden die Interzellularen recht groß und erinnern z.T. an das Aerenchym in Stängeln von Wasserpflanzen (vgl. 3.2.2).

In den Querschnitten der äquifazialen Blattfiedern aller fünf Arten findet man ein zentrales Leitbündel. Es ist wie bei den meisten Hydrophyten stark reduziert (Napp-Zinn, 1984). Neben plasmareichen Geleitzellen mit zahlreichen Mitochondrien und einigen Phloemparenchymzellen finden sich bei *R. penicillatus* und *C. caroliniana* nur wenige Siebröhren in den Blattfiedern (Abb. 49, 51). Xylem ist nicht zu erkennen. Auch bei *M. spicatum*, *M. verticillatum* und den Unterwasserblättern von *M. aquaticum* findet sich kein Xylem, dafür aber einige Bestandteile des Phloems. Neben Phloemparenchymzellen, Siebröhren mit ihren Geleitzellen finden sich auch große Idioblasten im Leitgewebe, deren Vakuolen mit elektronendichtem Material gefüllt sind (Abb. 53, 55). Die Leitbündel der Rhachis von *M. spicatum* sind deutlich größer, aber auch hier ist kein Xylem zu finden (Abb. 54).

Das Fiederblatt von *Ceratophyllum demersum* unterscheidet sich deutlich von denen der bisher beschriebenen Arten. Die kleinen isodiametrischen Epidermiszellen umschließen ein Mesophyll, dessen Zellen von außen nach innen immer größer werden (Abb. 33). Direkt unterhalb der Epidermis, in der ersten Reihe von Mesophyllzellen, liegen in regelmäßigen Abständen Idioblasten eingestreut. In der Blattmitte befinden sich je nach Schnittebene (außen zur Blattspitze oder zur Blattbasis hin) kleinere oder eine größere Lakunen, die von ein bis zwei Zellstegen durchzogen werden können (Abb. 33).

Während die Epidermiszellen noch zahlreiche Chloroplasten enthalten, nimmt ihre Zahl im Mesophyll zur Mitte hin deutlich ab (Abb. 56, 57a + b). Mitochondrien sind in den Epidermiszellen an den antiklinen Seiten und periklinen Innenseiten verteilt. In den darunter liegenden Mesophyllzellen liegen sie bevorzugt an der zur Epidermis grenzenden Seite (Abb. 56). Die äußeren Zellwände der Epidermiszellen sind etwas dicker als die übrigen und weisen eine deutliche Cuticula auf (Abb. 56). Ein eindeutig als Leitgewebe definierter Bereich findet man in den Fiederblättern von *C. demersum* nicht. An einer Stelle im Mesophyll unterscheiden sich einige Zellen deutlich von den übrigen, sowohl in ihrer Form als auch in ihrer Größe (Abb. 33, 57a + b). Außerdem sind sie recht plasmareich und enthalten zahlreiche Mitochondrien. Dies könnte eine Art Leitgewebe darstellen.

3.2.1.2 Wasserpflanzen mit langen, flachen Blättern

Eine zweite Gruppe von Wasserpflanzen hat lange lanzettliche Blätter, die an unterirdischen Sprossen (*Vallisneria spiralis*, Unterwasserblätter v. *Potamogeton natans*) oder aus einem Rhizoid heraus wachsen (*Posidonia oceanica*, *Stratiotes aloides*). Im Blattquerschnitt weisen sie Merkmale eines äquifazialen Flachblattes auf. Bei allen vier Arten wird ein mehrschichtiges Mesophyll, das aus unterschiedlich großen, meist isodiametrischen Zellen besteht, von einer einschichtigen Epidermis umgeben, deren Zellen wesentlich kleiner sind. Bei *P. oceanica* und *S. aloides* haben die Epidermiszellen ein längliches palisadenartiges Aussehen (Abb. 58, 59). Bei *V. spiralis* dagegen eine isodiametrische Form (Abb. 60). Die kleinen ovalen Epidermiszellen von *P. oceanica* sind von einer dicken Zellwand umgeben, deren Mächtigkeit an der periklinen Außenwand am größten ist (Abb. 62). An der Außenwand, zum Umgebungsmilieu hin, ist ihre Zellwandstruktur blasenartig aufgelockert (Abb. 63). Die Zellen selbst enthalten zahlreiche Chloroplasten, die sich bevorzugt an der periklinen Innenseite ansiedeln. Sie enthalten dicke Granathylakoidstapel, wenige Stromathylakoide und einige kleine Stärkekörner (Abb. 64). Die Epidermiszellen von *S. aloides* und *V. spiralis* sind nicht von solch massiven Zellwänden umgeben. Die periklinen Außenwände sind aber auch dicker als die übrigen Zellwände (Abb. 66, 67).

Die Chloroplasten sind bei *V. spiralis* meist gleichmäßig in der gesamten Zelle verteilt, während sie sich bei *S. aloides* sich oftmals an den periklinen Außenseiten ansiedeln (Abb. 66). Die Mitochondrien findet sich bei beiden Arten jedoch bevorzugt an den antiklinen Seiten und der periklinen Innenseite der Zellen (Abb. 68, 69).

Das Mesophyll von *P. oceanica* besteht aus unterschiedlich großen Zellen (Abb. 58). In den großen Zellen nehmen die Vakuolen den meisten Platz im Zelllumen ein und sind mit unterschiedlichen Vakuoleninhaltsstoffen gefüllt (Abb. 65). Dazwischen liegen kleinere Zellen, deren Vakuolen ebenfalls den meisten Platz des Zelllumens einnehmen und sowohl die Chloroplasten als auch die Mitochondrien an den Rand drängen (Abb. 62, 65).

Tafel 12: Blattquerschnitte, gefärbt mit Toluidinblau. Abb. 58: *Posidonia oceanica*. Abb. 59: *Stratiotes aloides*. Abb. 60: *Vallisneria spiralis*. Abb. 61: Unterwasserblatt v. *Potamogeton natans*.

Tafel 13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen v. Blättern. Abb. 62: Epidermis u. Mesophyll v. *P. oceanica*. Abb. 63: Zellwand der periklinen Außenseite einer Epidermiszelle v. *P. oceanica*. Abb. 64: Epidermiszelle v. *P. oceanica*. Abb. 65: Mesophyllbereich mit Idioblasten v. *P. oceanica*. Abb. 66: Epidermiszellen v. *S. aloides*. Abb. 67: Epidermiszellen v. *V. spiralis*.

Tafel 14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen v. Blättern: Abb. 68: Antikline Seiten d. Epidermiszellen v. *S. aloides*. Abb. 69: Nebeneinander liegende Epidermiszellen v. *V. spiralis*. Abb. 70: Epidermis u. Mesophyll v. *V. spiralis*. Abb. 71: Mesophyllzellen v. *V. spiralis*.

Tafel 15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen v. Blättern Abb. 72: Leitgewebe v. *S. aloides*. Abb. 73: Leitgewebe v. *V. spiralis*. Abb. 74: Kollaterales Leitbündel im Unterwasserblatt v. *Potamogeton natans*. Abb. 75: Phloem im Leitgewebe eines Unterwasserblattes v. *P. natans*.

Tafel 16: Elektronenmikroskopische Aufnahmen v. Blättern: Abb. 76: Epidermis u. Mesophyll mit Stegzellen im Unterwasserblatt v. *P. natans*. Abb. 77: Antikline Seiten der Epidermiszellen im Unterwasserblatt v. *P. natans*. Abb. 78: Stegzelle d. Mesophylls im Unterwasserblatt v. *P. natans*

Abkürzungen der Tafeln 12-16:

Aerenchym (Ae); Chloroplast (Chl); Cytoplasma (Cy); Epidermis (Ed); Epidermiszelle (Ez); Geleitzelle (Gz); Idioblast (Id); Interzellulare (Iz); Lakune (L); Leitbündel (Lb); Leitgewebe (Lg); Mesophyll (Me); Mitochondrium (Mi); Nucleolus (N); Plasmodesmos (Pd); Phloem (Ph); Plasmamembran (Pm); Phloemparenchym (Pp); Skerenchym (Sk); Siebröhre (Sr); Stärke (St); Vakuole (V); Xylem (X); Zellkern (Zk); Zellwand (Zw); Zellwandprotuberanzen (Zwp);

Tafel 12

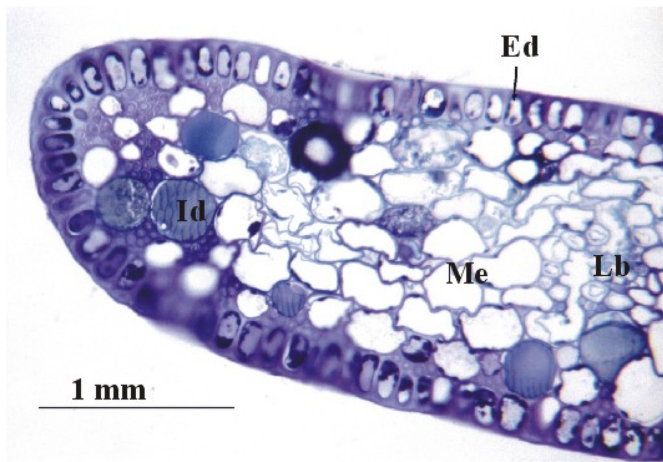


Abb. 58

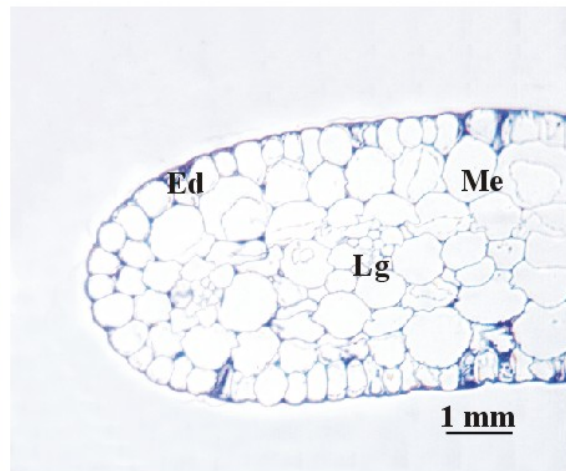


Abb. 59

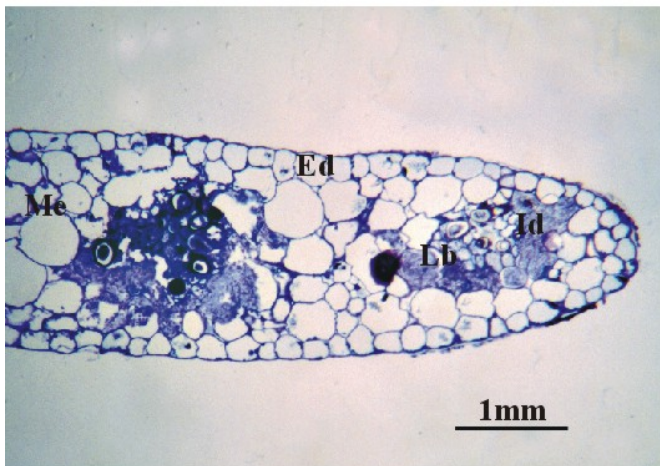


Abb. 60

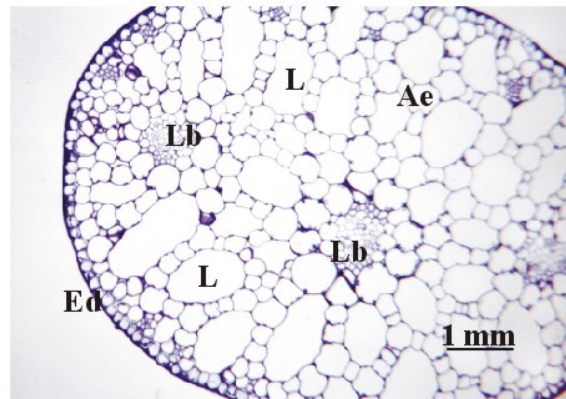


Abb. 61

Tafel 13

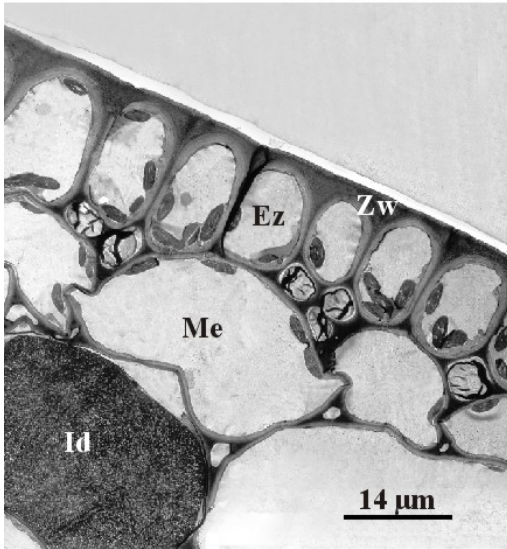


Abb. 62

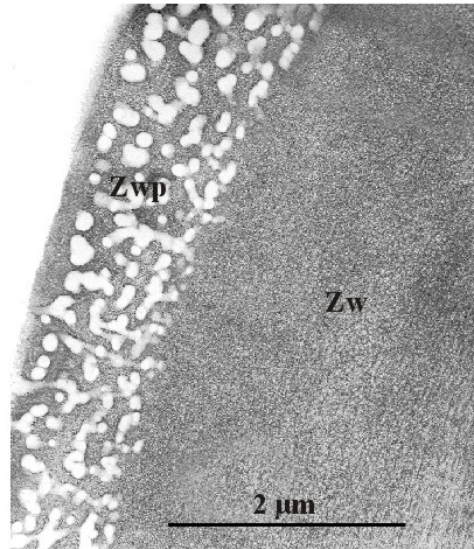


Abb. 63

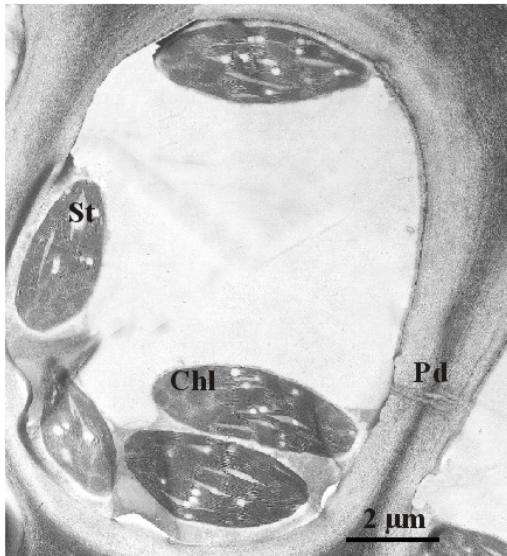


Abb. 64

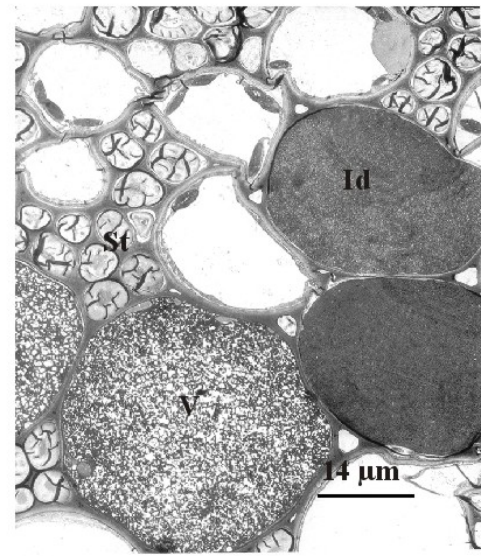


Abb. 65

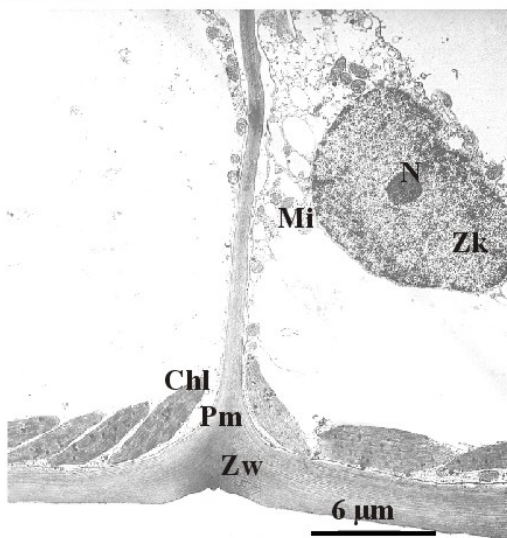


Abb. 66

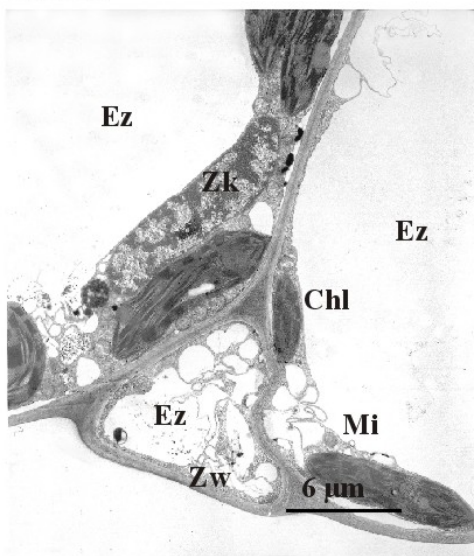


Abb. 67

Tafel 14

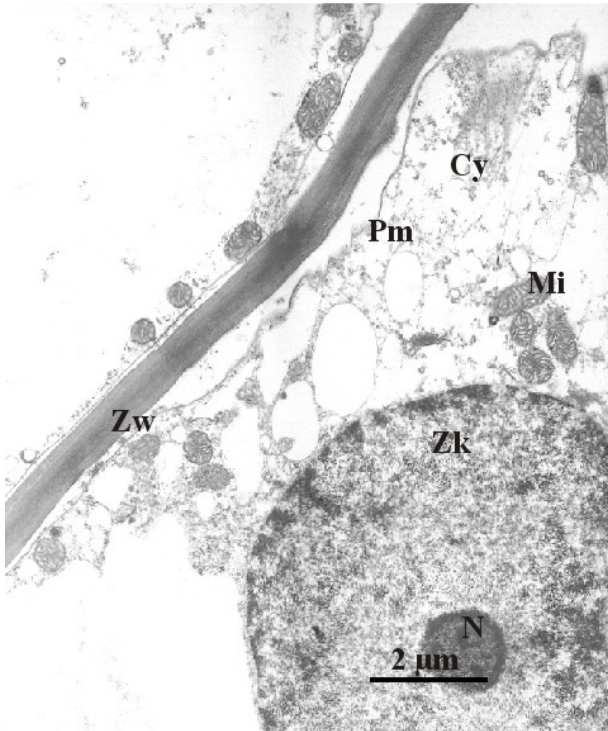


Abb. 68

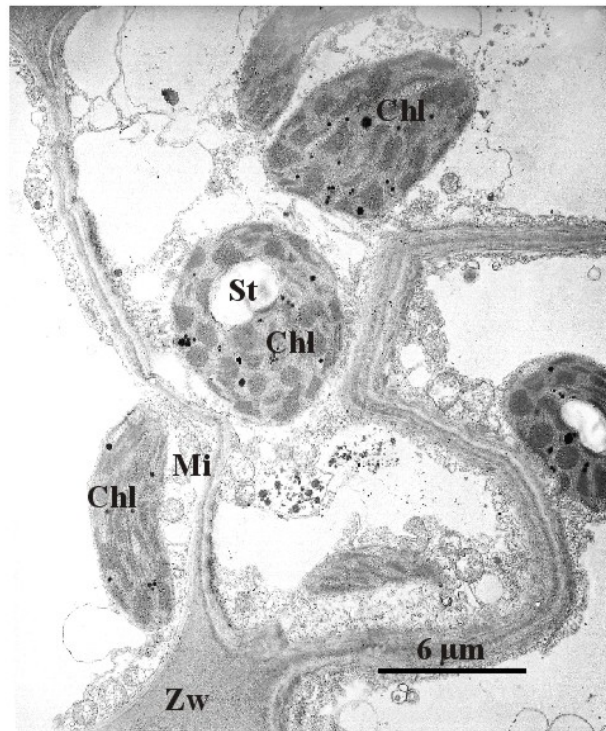


Abb. 69

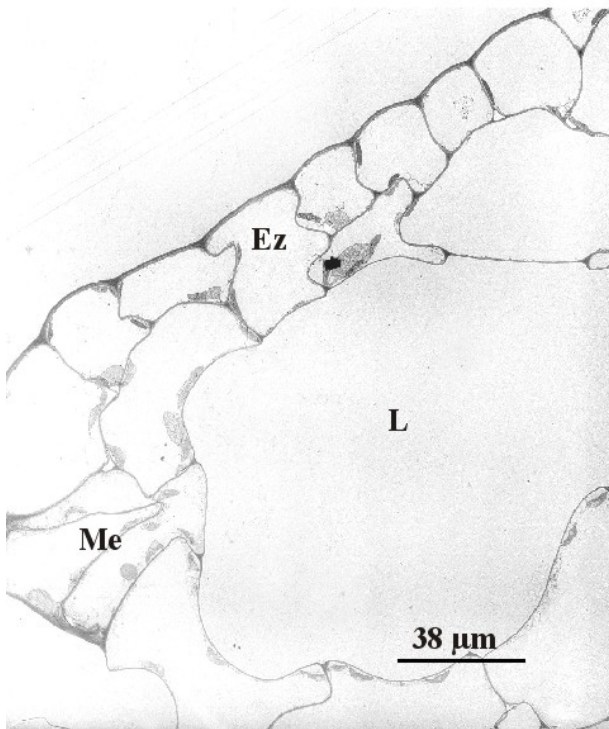


Abb. 70

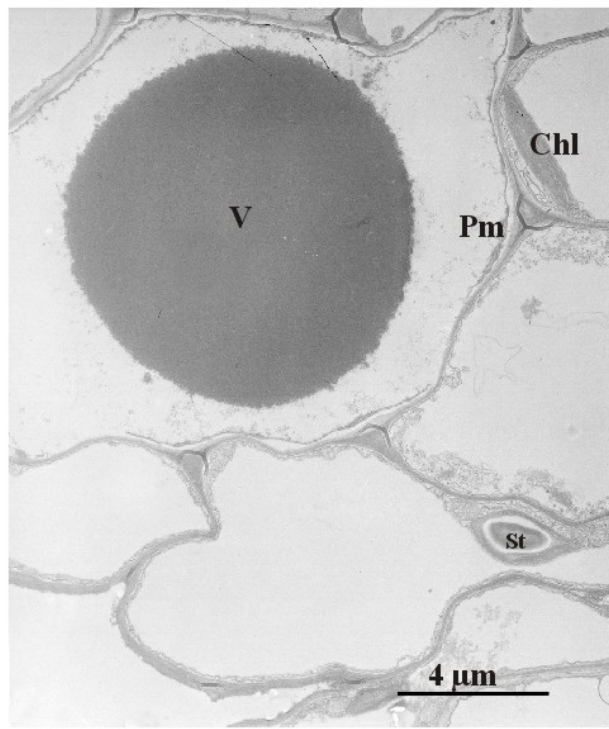


Abb. 71

Tafel 15

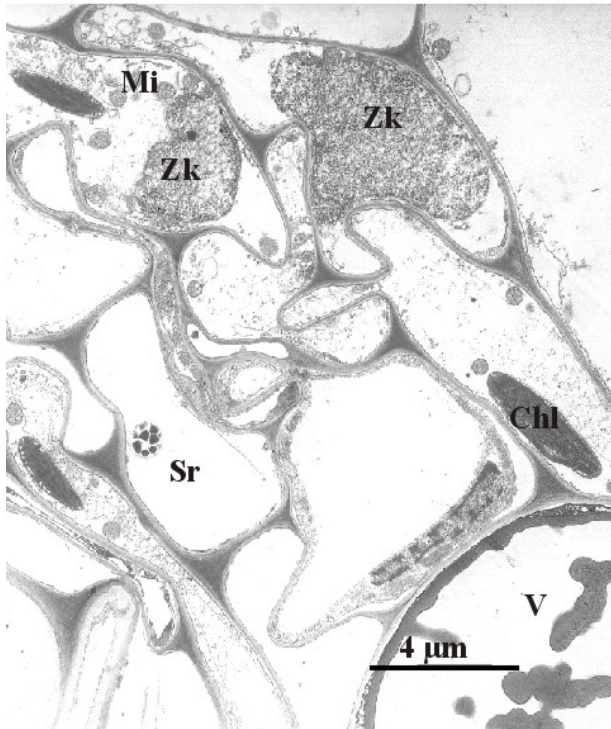


Abb. 72

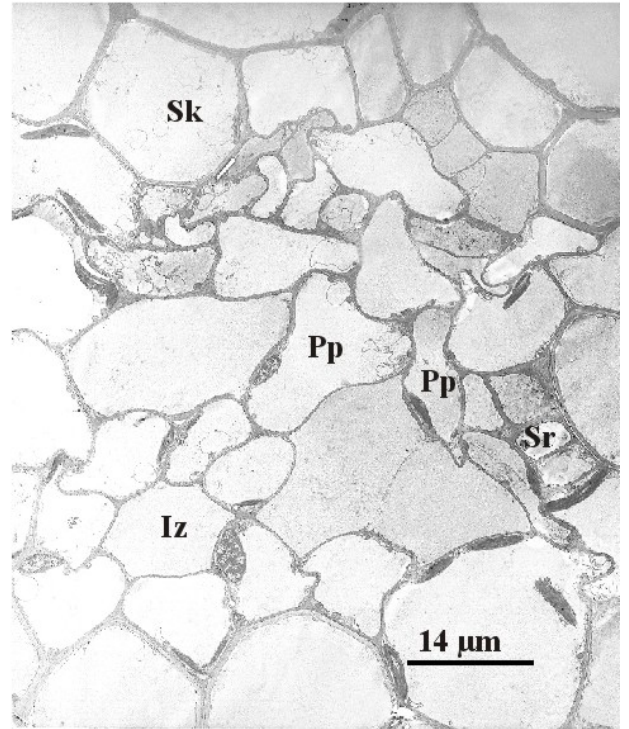


Abb. 73

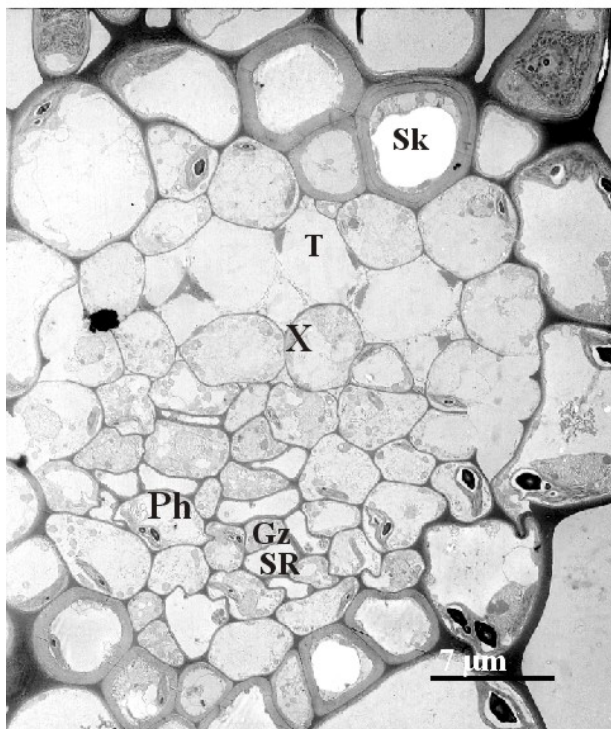


Abb. 74

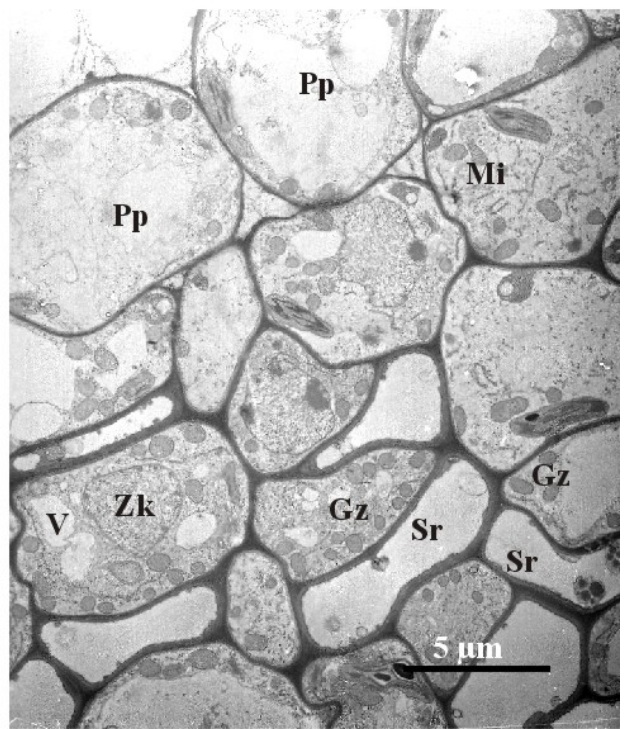


Abb. 75

Tafel 16

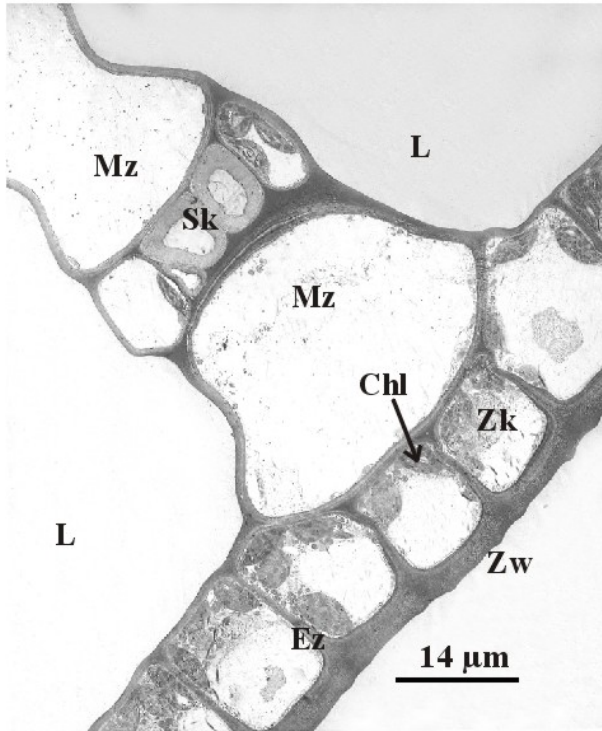


Abb. 76

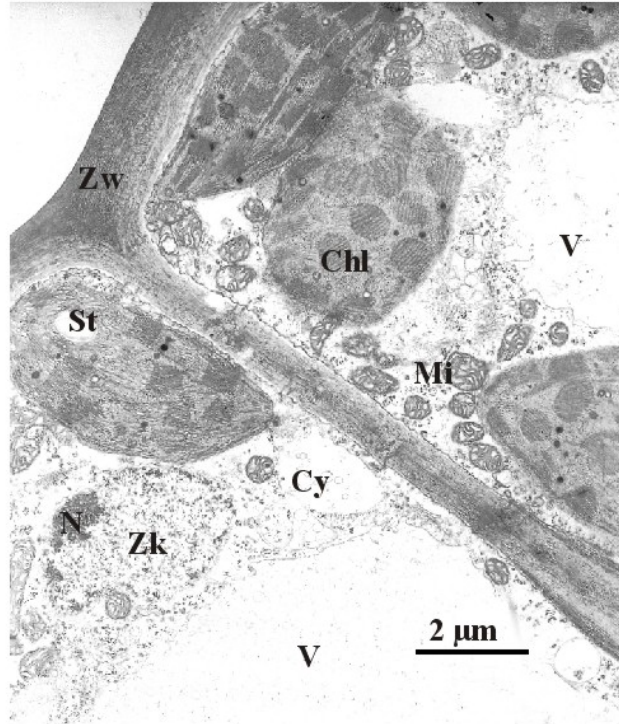


Abb. 77

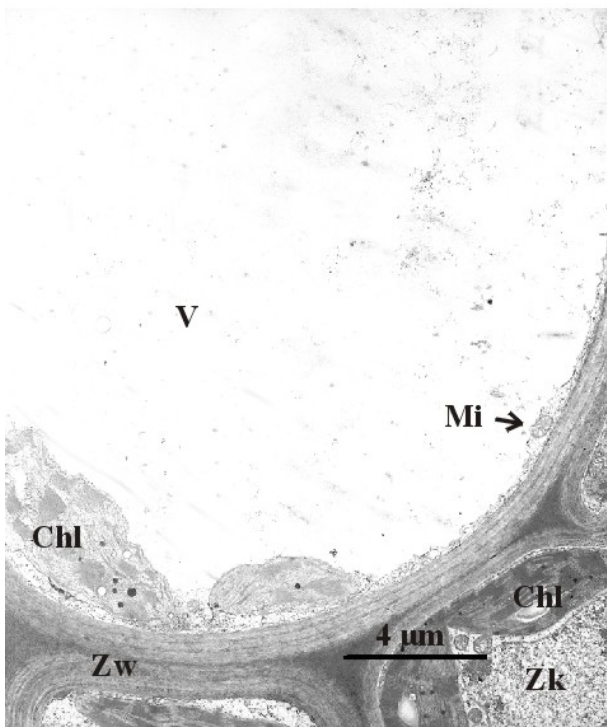


Abb. 78

Zwischen diesen beiden Zelltypen findet man im äußeren Mesophyllbereich weitere, noch kleinere Zellen, die in kleinen Gruppen beieinander liegen. Diese sind, zusammen mit den anderen Zellen, durch massive Zellwände miteinander „verkittet“ (Abb. 65).

Die großen Mesophyllzellen von *S. aloides* und *V. spiralis* enthalten nur wenige Zellorganellen und ihre Vakuolen haben ebenfalls ein beträchtliches Volumen. Sie sind aber deutlich seltener mit sichtbaren Vakuoleninhaltsstoffen gefüllt. Bei *V. spiralis* findet man bisweilen um die kleinen Leitbündel, die im Blattquerschnitt in einer äquatorialen Ebene angeordnet sind, einige Idioblasten (Abb. 60, 71). Zur Mitte des Querschnitts hin ist ihr Mesophyll durch große Lakunen aufgelockert. Diese entstehen durch einzellreihige Verbindungszellen, welche die dichteren Mesophyllbereiche miteinander verbinden (Abb. 70).

In den Leitgeweben von *P. oceanica* und *S. aloides* sind weder Phloem noch Xylem eindeutig zu erkennen. Die Zellen in diesen Bereichen unterscheiden sich gegenüber den restlichen Mesophyllzellen darin, dass sie plasmareicher und extrem ineinander verschlungen sind (Abb. 72). Bei *V. spiralis* können einige Siebröhren mit ihren Geleitzellen identifiziert werden. Xylem ist aber auch hier nicht zu erkennen (Abb. 73).

Der Blattaufbau des Unterwasserblattes von *Potamogeton natans* weicht von den oben beschriebenen Merkmalen der anderen Wasserpflanzen deutlich ab. Auch hier liegt ein äquifaziales Blatt vor, das jedoch weder ein eindeutiges Flachblatt noch ein Rundblatt ist. Nach einer einschichtigen Epidermis, in der gelegentlich auch Stomata auftreten können, folgt ein gut durchlüftetes Mesophyll mit relativ großen Lakunen, die durch zahlreiche kleine Stege aus Mesophyllzellen gebildet werden (Abb. 61). Drei Leitbündel liegen im Querschnitt in einer Reihe nebeneinander, wobei das zentral liegende einen kollateralen Aufbau aufweist, mit Xylem- und Phloem-Elementen (Abb. 74). Die anderen beiden Leitbündel, die näher am Blattrand liegen, sind eher indifferent und weisen kein Xylem auf (Abb. 75). Die Epidermiszellen haben eine dicke perikline Außenwand. Die übrigen Zellwände sind deutlich dünner (Abb. 76, 77). Die zahlreichen Mitochondrien sowie die Chloroplasten finden sich eher an den periklinen Innenseiten der Epidermiszellen. Die Chloroplasten besitzen einige dicke Granastapel, Plastoglobuli und gelegentlich kleine Stärkekörner (Abb. 77). Der Übergang von der Epidermis zum Mesophyll wird mit zahlreichen Sklerenchymzellen verstärkt (Abb. 76), ebenso liegt rund um die Leitbündel Festigungsgewebe (Abb. 74). In den Mesophyllzellen selbst nimmt die Vakuole den größten Platz ein und drängt die übrigen Zellorganellen an den Rand (Abb. 78).

3.2.1.3 Wasserpflanzen mit Blattwirteln

Eine andere Form der Blattanordnung sind die Blattwirtel. Die Blätter dieser Pflanzen sind klein, spitz-oval bis länglich und meistens nur wenige Zellschichten dick.

Die Blätter von *Elodea canadensis* und *E. nuttallii* bestehen im Intercostalbereich aus zwei Zellreihen, einer oberen (adaxialen) und einer unteren (abaxialen) Epidermis (Abb. 79, 80). Zu den Blattadern hin verbreitert sich der Blattquerschnitt, da um ein Leitbündel einige Mesophyllzellen angeordnet sind (Abb. 80). Die Zellen der oberen Epidermis sind bei beiden Arten deutlich größer und breiter als die Zellen der unteren Epidermis. Sie sind an ihren antiklinen Seiten leicht ineinander verzahnt (Abb. 84). Die periklinen Außenwände auf beiden Seiten des Blattes sind deutlich dicker als die übrigen Zellwände. Die kleineren Zellen der unteren Epidermis liegen mit geraden antiklinen Zellwänden nebeneinander. Gelegentlich liegen sog. Kanalzellen dazwischen angeordnet (Abb. 80). An den antiklinen Seitenwänden und periklinen Außenwänden der unteren Epidermiszellen treten ab und zu Wandprotuberanzen auf, an denen sich

zahlreiche Mitochondrien und einige Chloroplasten sammeln (Abb. 84, 86). Die Verteilung der Mitochondrien beschränkt sich jedoch nicht nur auf diesen Teil der Zelle. Auch an den antiklinen Außenseiten sind sie zahlreich vertreten (Abb. 85). Die Chloroplasten sind über das gesamte Zelllumen verstreut. In den Zellen der oberen Epidermis läßt sich keine Anhäufung von Zellorganellen auf bestimmte Bereiche erkennen. Die stärkehaltigen Chloroplasten sind an allen Seiten der Zellen vertreten (Abb. 84, 86). An den periklinen Innenseiten der Zellen fällt eine leichte Verzahnung miteinander auf, an deren Kontaktstellen die Zellen durch Plasmodesmen miteinander in Verbindung stehen (Abb. 86). An anderen Stellen haben sich mehr oder weniger große Interzellularen gebildet.

Das Unterwasserblatt von *H. vulgaris* besteht aus drei Zellreihen, einer oberen und unteren Epidermis und einer Reihe aus deutlich größeren Mesophyllzellen (Abb. 81). Die kleinen, länglich-ovalen bis isodiametrisch geformten Epidermiszellen enthalten keine Chloroplasten. Eine Vakuole füllt den größten Teil des Zelllumens aus (Abb. 88). Ihre perikline Außenwand ist sehr mächtig, die übrigen Zellwände sind vergleichsweise dünn. Eine dicke Cuticula liegt wellenartig auf der Außenwand auf (Abb. 88). Zwischen den großen Mesophyllzellen und den Epidermiszellen findet man zahlreiche, zum Teil recht große Interzellularen die miteinander in Verbindung stehen und ein Hohlraumsystem bilden (Abb. 89). Die Mesophyllzellen enthalten zahlreiche Chloroplasten, die z.T. größer als die Epidermiszellen sind (Abb. 89). Auch in den Mesophyllzellen drängt eine große Vakuole die Zellorganellen in die Randbereiche der Zellen (Abb. 88, 89). Im Bereich der Blattadern nimmt die Anzahl der Mesophyllzellen zu und ihre Größe ab. Das Leitgewebe selbst besteht aus Siebröhren mit Geleitzellen, sowie einigen weiteren plasmareichen Zellen, die Chloroplasten und Vakuolen mit elektronendichtem Material enthalten. Ein Xylem ist nicht zu erkennen (Abb. 90).

Tafel 17: Blattquerschnitte, gefärbt mit Toluidinblau. Abb. 79: *E. canadensis*. Abb. 80: *E. nuttallii*. Abb. 81: Unterwasserblatt v. *H. vulgaris*. Abb. 82: Unterwasserblatt v. *C. hamulata*, Abb. 83: Schwimmblatt v. *C. hamulata*.

Tafel 18: Elektronenmikroskopische Aufnahmen v. Blättern. Abb. 84: Blattübersicht v. *E. canadensis*. Abb. 85: Perikline Außenseite einer abaxialen Epidermiszelle v. *E. canadensis*. Abb. 86: Abaxiale und adaxiale Epidermiszellen von *E. canadensis*. Abb. 87: Perikline Außenseite einer adaxialen Epidermiszelle v. *E. nuttallii*.

Tafel 19: Elektronenmikroskopische Aufnahmen v. Blättern. Abb. 88: Epidermiszellen u. Mesophyllzelle an der Blattkante v. *H. vulgaris*. Abb. 89: Blattquerschnitt v. *H. vulgaris*. Abb. 90: Leitgewebe im Blatt v. *H. vulgaris*. Abb. 91: Perikline Außenseite einer Epidermiszelle eines Unterwasserblattes v. *C. hamulata*.

Tafel 20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen v. Blättern. Abb. 92: Mesophyllzellen im Unterwasserblatt v. *C. hamulata*. Abb. 93: Leitgewebe im Schwimmblattes v. *C. hamulata*. Abb. 94: Epidermis- u. Mesophyllzellen im Schwimmblatt v. *C. hamulata*

Abkürzungen der Tafeln 17-20:

Chloroplast (Chl); Cuticula (Cu); Cytoplasma (Cy); Drüsenzelle (Dz); Epidermiszelle (Ez); Geleitzelle (Gz); Interzellulare (Iz); Kanalzellen (Kaz); Leitbündel (Lb); Mesophyll (Me); Mitochondrium (Mi); Mesophyllzelle (Mz); Obere Epidermis (OEd); Plastoglobuli (P); Plasmodesmen (Pd); Plasmamembran (Pm); Phloemparenchym (Pp); Siebröhre (Sr); Stärke (St); Transferstruktur (Ts); Untere Epidermis (UEd); Vakuole (V); Zellkern (Zk); Zellwand (Zw);

Tafel 17

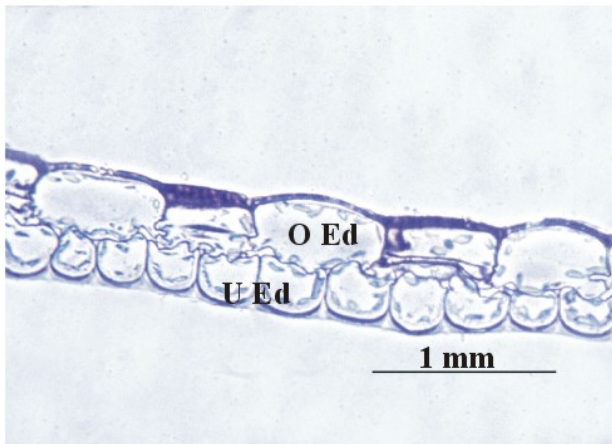


Abb. 79

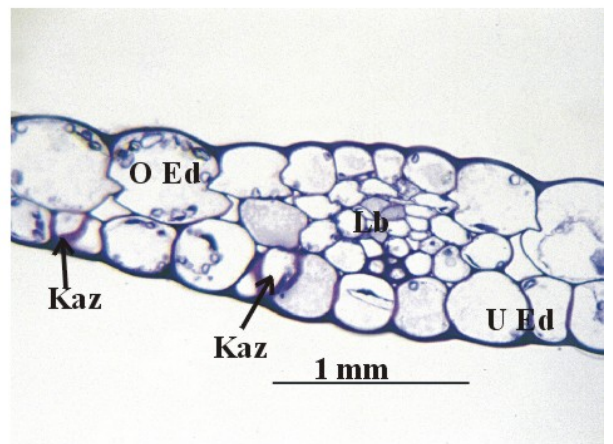


Abb. 80

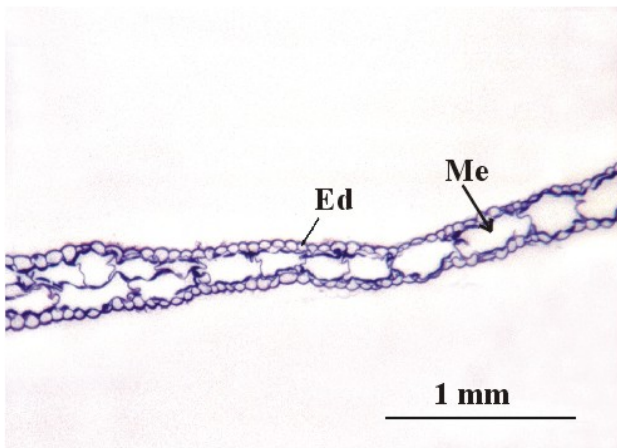


Abb. 81

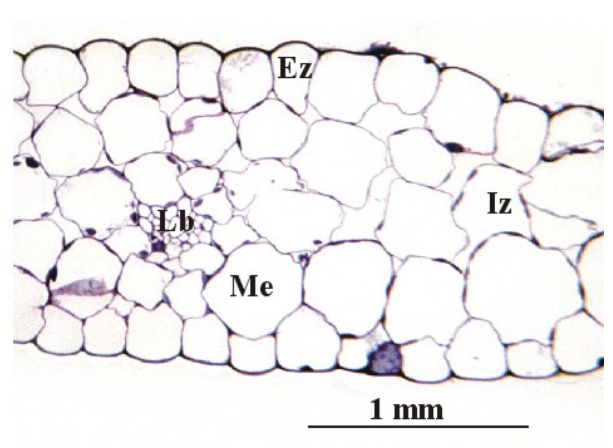


Abb. 82

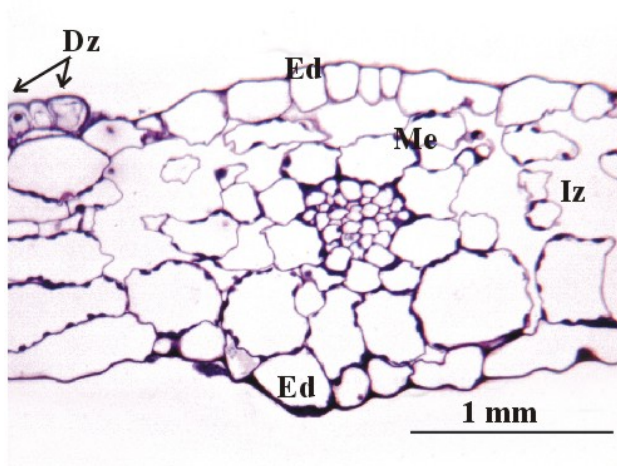


Abb. 83

Tafel 18

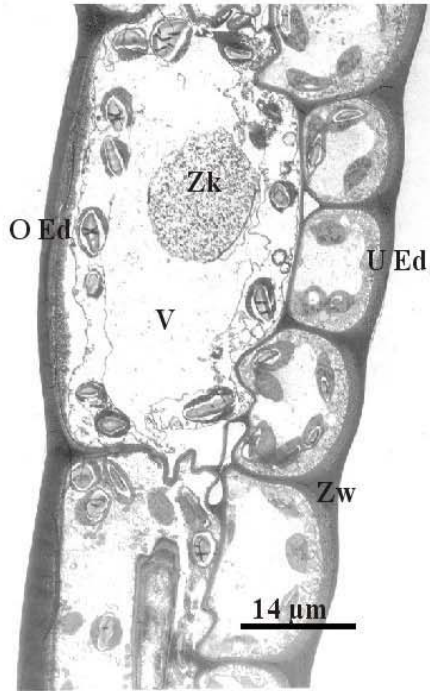


Abb. 84

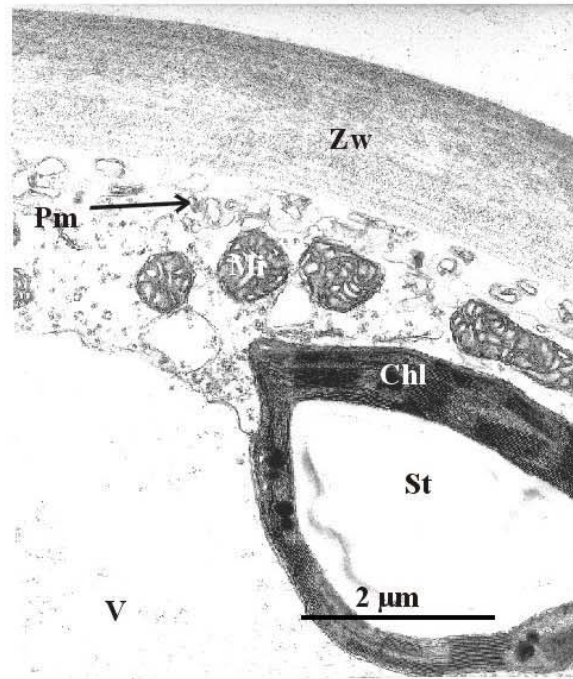


Abb. 85

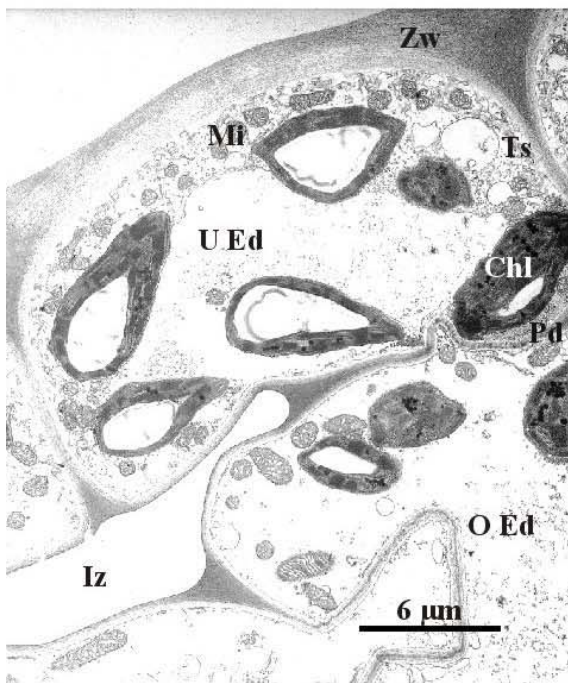


Abb. 86

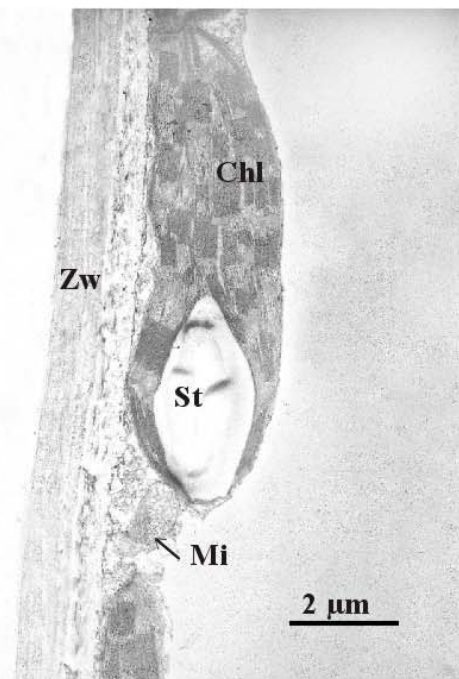


Abb. 87

Tafel 19

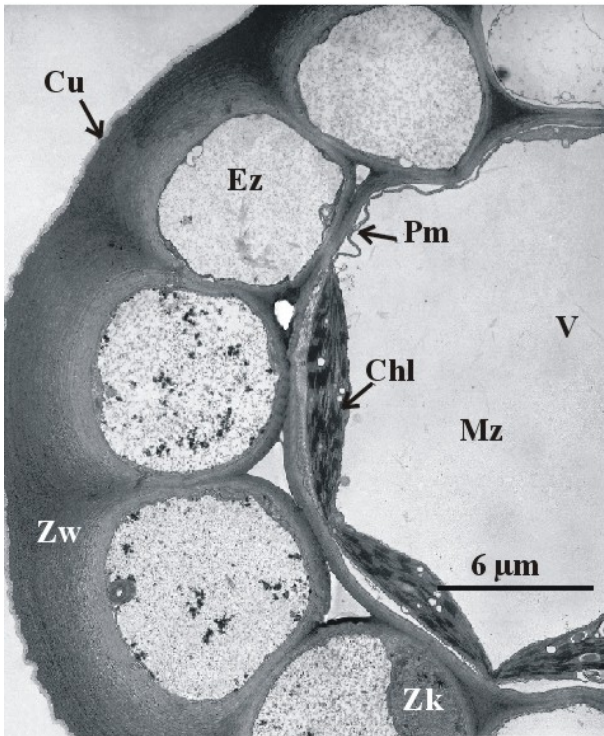


Abb. 88

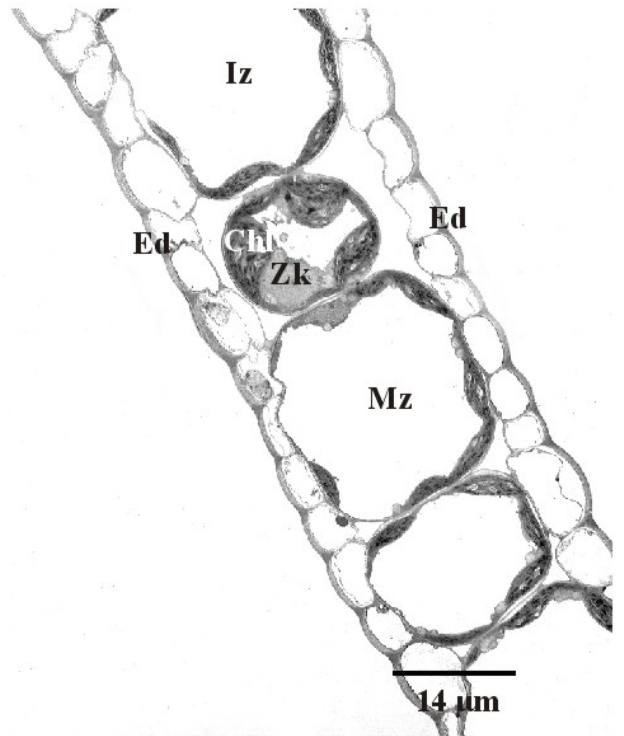


Abb. 89

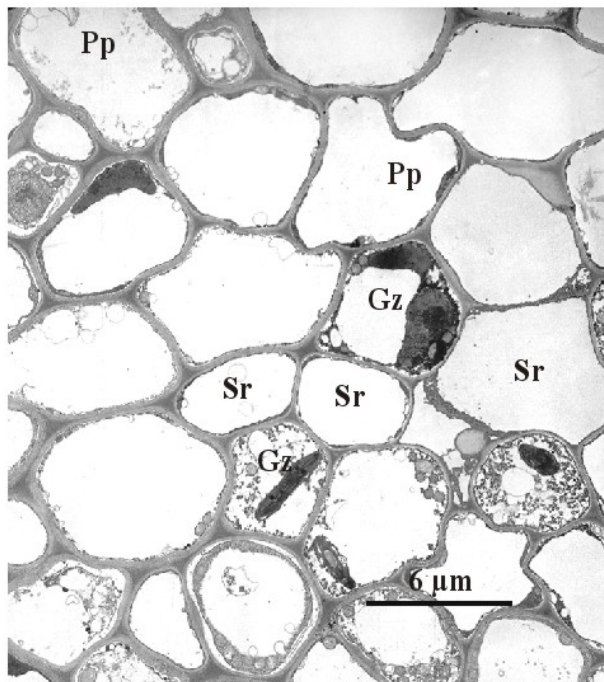


Abb. 90



Abb. 91

Tafel 20

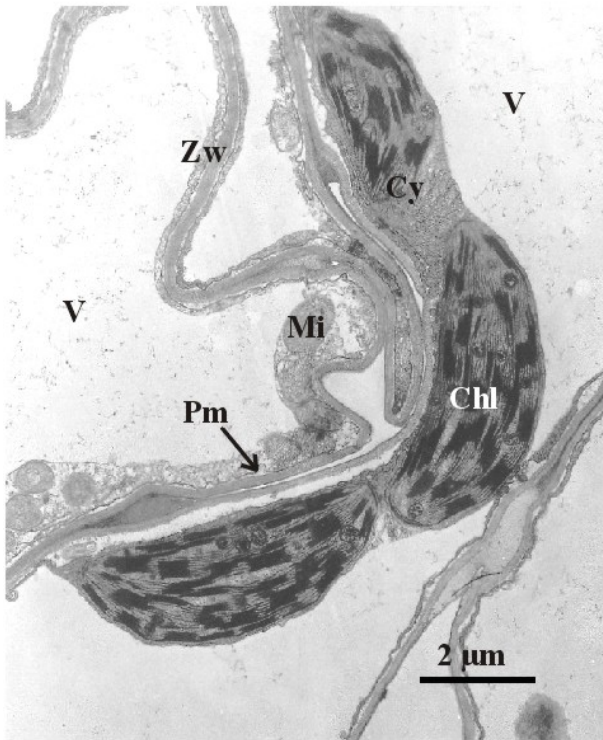


Abb. 92

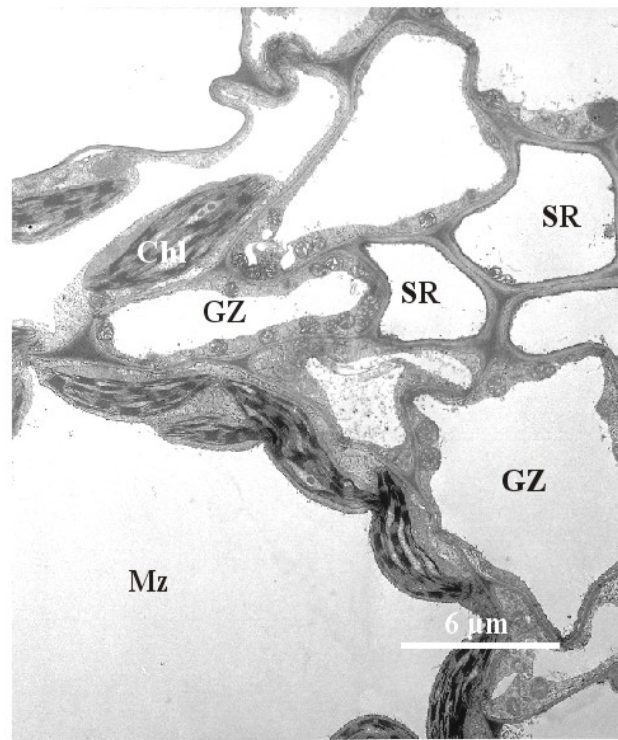


Abb. 93

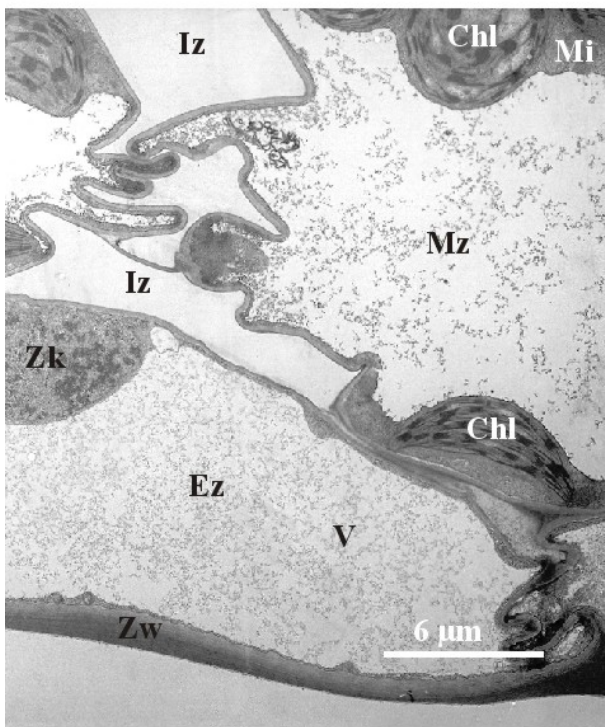


Abb. 94

Das Unterwasserblatt von *C. hamulata* ist aus einer oberen und unteren Epidermis aufgebaut, mit einem dazwischenliegenden 3-5 schichtigen Mesophyll mit zahlreichen kleinen Interzellularen (Abb. 82). Die Epidermiszellen sind etwas kleiner als die Mesophyllzellen, haben eine rundliche bis quadratische Form und sind an der Außenseite leicht nach Außen gebogen. Die äußeren Zellwände sind etwas dicker als die übrigen und haben eine dünne Cuticula aufliegen (Abb. 91). Meistens enthalten sie linsenförmige Chloroplasten mit weniger dicken Granastapeln und zahlreichen Plastoglobuli. Die Zellen des Mesophylls sind an einigen Stellen miteinander „verzahnt“. In solchen „Fingern“ finden sich häufig Ansammlungen von Mitochondrien und Chloroplasten, ihr Vorkommen beschränkt sich jedoch nicht allein auf solche Bereiche (Abb. 92). Die Chloroplasten des Mesophylls enthalten keine Plastoglobuli. Das Leitgewebe besteht aus einigen plasmareichen Zellen, die reich an Mitochondrien sind, sowie aus einigen Siebröhren und Geleitzellen (Abb. 93).

Das Schwimmblatt des Wassersterns *C. hamulata* ist ähnlich aufgebaut wie das Unterwasserblatt. Es sitzt rosettenartig am Ende des Sprosses und treibt auf dem Wasser. Die Zellen des Mesophylls sind etwas kleiner und kompakter als beim Unterwasserblatt. Es treten Drüsenköpfchen und Stomata in der oberen Epidermis auf und die Interzellularen im Mesophyll sind etwas größer als im Unterwasserblatt (Abb. 83). Das Vorkommen von Chloroplasten beschränkt sich auf das Mesophyll (Abb. 94).

3.2.1.4 Wasserpflanzen mit „normalen Laubblättern“

Bei einer vierten Gruppe von Wasserpflanzen haben die Blätter das Aussehen von „normalen Laubblättern“. Die ovalen bis lanzettlich spitzen Blätter sitzen mit einem Blattstiel (*P. lucens*) oder mit dem Blattgrund direkt (*P. perfoliatus*) am Pflanzenstängel.

Die Laminae von *P. lucens* und *P. perfoliatus* sind im Intercostalbereich dreischichtig aufgebaut. Während bei *P. lucens* die Zellen der adaxialen (oberen) und abaxialen (unteren) Epidermis etwa gleich groß erscheinen, sind die Zellen der adaxialen Epidermis bei *P. perfoliatus* deutlich größer als die der abaxialen Epidermis (Abb. 95, 97). Die periklinen Außenwände der Epidermiszellen sind deutlich kräftiger als die übrigen Zellwände. Ein Unterschied in der Wanddicke von Ober- und Unterseite ist nicht zu erkennen. Die Epidermiszellen selbst sind bei *P. lucens* etwa dreimal so lang wie breit, die Mesophyllzellen sind etwa doppelt so lang wie breit (Abb. 100). Die Zellen von *P. perfoliatus* haben eher eine isodiametrisch bis rechteckige Form. Ihre Mesophyllzellen liegen in vielfältigen Formen zwischen den beiden Abschlussgeweben und sind häufig ineinander verzahnt (Abb. 101, 102). Diese Verzahnung findet sich auch bei den Mesophyllzellen von *P. lucens* (Abb. 103). Während die Chloroplasten in allen Zellen beider Arten gleichmäßig verteilt sind und keine signifikanten Unterschiede zwischen ihnen auffallen, tritt die Verteilung der Mitochondrien an bestimmten Stellen gehäuft auf. Bei beiden Pflanzen finden sich zahlreiche Mitochondrien in den fingerartigen Fortsätzen der Verzahnungen der Mesophyllzellen (Abb. 102, 104). Ebenso findet man sie an den periklinen Innenseiten der abaxialen Epidermiszellen von *P. lucens*. Die Zellen der adaxialen Epidermis stehen häufig durch Plasmodesmen mit den Mesophyllzellen in Verbindung. In diesen Bereichen sind nur wenige Mitochondrien zu finden (Abb. 103, 104). In der Umgebung der Leitbündel ist das Mesophyll bei beiden Laichkräutern mehrschichtig. Auf der zur Blattunterseite (abaxialen Seite) gerichteten Seite wird das Leitbündel durch mehrere große Sklerenchymzellen gestützt (Abb. 105, 107). Daran grenzt sich das Phloem mit seinen Siebröhren und Geleitzellen an. Es ist in plasmareiches Phloemparenchym eingebettet. In Richtung Blattoberseite (adaxiale Seite) schließen sich einige Tracheiden an, die ebenfalls von plasmareichen Zellen

umgeben sind (Abb. 106). Im Bereich der kleineren Leitbündel, am Rand der Blattspreite, oder zur Blattspitze hin, finden sich keine Xylemelemente mehr.

Das epistomatische Schwimmblatt von *P. natans* hat einen bifazialen Blattaufbau. Nach einer oberen Epidermis, die mit zahlreichen Stomata besetzt ist, folgt ein „luftiges“, nicht zu dicht gepacktes, Palisadenparenchym, das aus 2-3 Zellreihen besteht (Abb. 99). Daran schließt sich ein weitlumiges Schwammparenchym an, in welchem die Blattleitbündel liegen. Den Abschluss bildet die untere Epidermis (Abb. 99). Die äußeren Zellwände der oberen Epidermiszellen sind etwas dicker als die übrigen Seiten und haben eine dünne Cuticula aufliegen (Abb. 108). Die periklinen Außenzellwände der adaxialen Epidermiszellen sind wesentlich dicker als die der abaxialen Epidermiszellen (Abb. 109). Die Zellen des Palisadenparenchyms weisen an einigen Stellen Zellwandauflagerungen auf. Viele dieser Zellen sind durch eine Zellwandmatrix miteinander verbunden (Abb. 108). Alle Zellen des Schwimmblattes enthalten Chloroplasten, auch die der beiden Epidermen. Die Chloroplasten in der adaxialen Epidermis enthalten nur wenige dünne Granastapel, im Gegensatz zu denen in der unteren Epidermis. Hier findet sich auch Stärkekörner in den Chloroplasten. Bei den Leitgeweben handelt es sich um kollaterale Leitbündel. Sie liegen im Schwammparenchym und werden dort durch einige kreisförmig angeordnete Sklerenchymzellen gestützt. Das Phloem, mit seinen Siebröhren und Geleitzellen, liegt zur Blattunterseite hin gerichtet, das Xylem zeigt zur Blattoberseite (Abb. 110, 111).

Tafel 21: Blattquerschnitte, mit Toluidinblau gefärbt. Abb. 95: Übersicht v. *P. lucens*. Abb. 96: Costaler Blattbereich v. *P. lucens*. Abb. 97: Übersicht v. *P. perfoliatus*. Abb. 98: Costaler Blattbereich v. *P. perfoliatus*. Abb. 99: Schwimmblatt v. *P. natans*.

Tafel 22: Elektronenmikroskopische Aufnahmen v. Blättern. Abb. 100: Blattaufbau v. *P. lucens*. Abb. 101: Blattaufbau v. *P. perfoliatus*. Abb. 102: Antikline Seiten v. Mesophyllzellen bei *P. perfoliatus*. Abb. 103: Epidermis- u. Mesophyllzellen v. *P. lucens*.

Tafel 23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen v. Blättern. Abb. 104: Verzahnung der antiklinen Seiten einer Mesophyllzelle in der Nachbarschaft einer adaxialen Epidermiszelle v. *P. lucens*. Abb. 105: Blattleitbündel v. *P. lucens*. Abb. 106: Blattleitbündel v. *P. lucens* zur adaxialen Blattseite gerichtet. Abb. 107: Blattleitbündel v. *P. perfoliatus* zur abaxialen Blattseite gerichtet.

Tafel 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Schwimmblattes v. *P. natans*. Abb. 108: Obere Epidermis u. Palisadenparenchym. Abb. 109: Untere Epidermis u. Schwammparenchym. Abb. 110: Kollaterales Leitbündel. Abb. 111: Detail des Phloems im Leitgewebe.

Abkürzungen der Tafeln 21-24:

Chloroplast (Chl); Cytoplasma (Cy); Epidermiszelle (Ez); Endoplasmatisches Retikulum (ER); Geleitzelle (Gz); Interzellulare (Iz); Kanalzellen (Kaz); Leitbündel (Lb); Mesophyll (Me); Mitochondrium (Mi); Mesophyllzelle (Mz); Obere Epidermis (OEd); Obere Epidermiszelle (Oez); Plastoglobuli (P); Palisadenparenchym (Pal); Plasmodemesmen (Pd); Phloemparenchym (Pp); Palisadenparenchymzelle (Pz); Sklerenchymzellen (Sk); Stoma (So); Siebröhre (Sr); Schwammparenchym (Sw); Schwammparenchymzelle (Sz); Tracheide (T); Untere Epidermis (UEd); Untere Epidermiszelle (Uez); Vakuole (V); Xylem (X); Zellkern (Zk); Zellwand (Zw);

Tafel 21

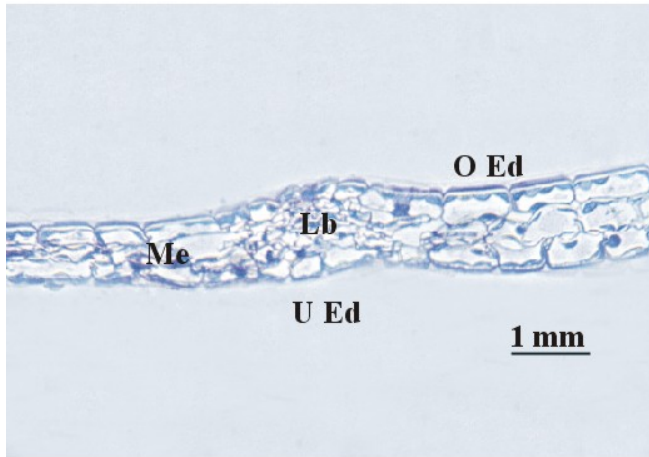


Abb. 95

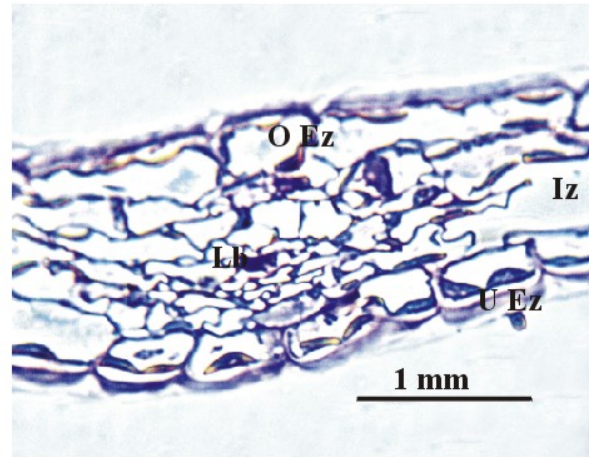


Abb. 96

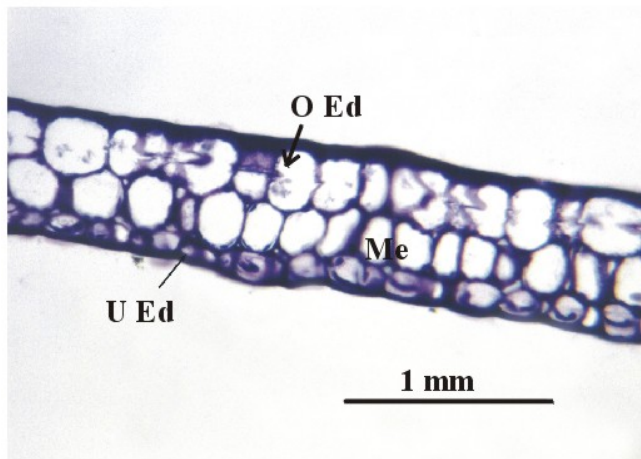


Abb 97

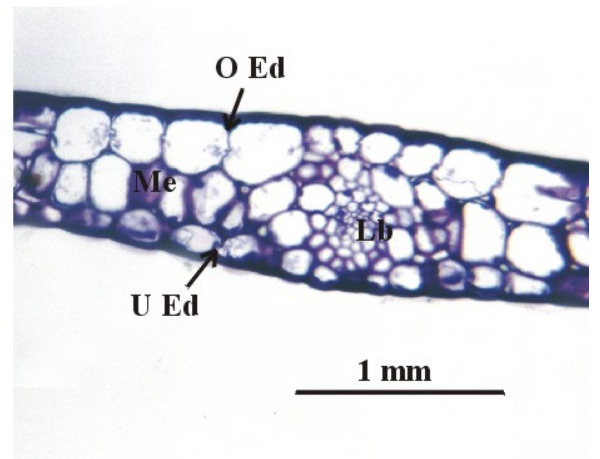


Abb. 98

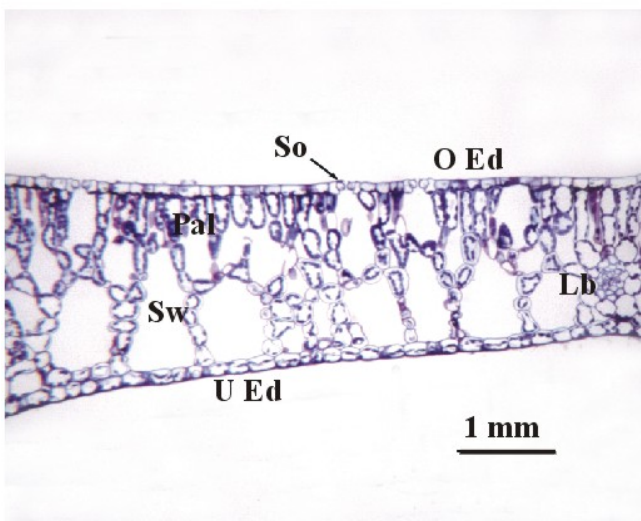


Abb. 99

Tafel 22

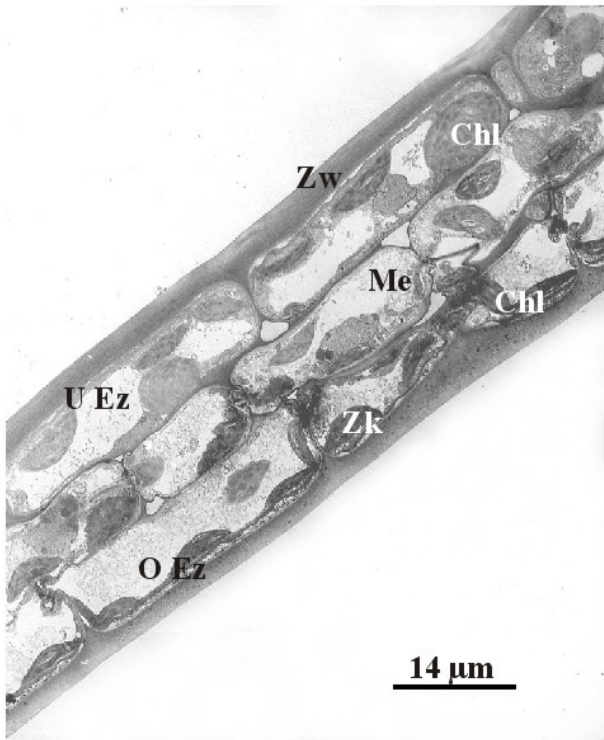


Abb. 100

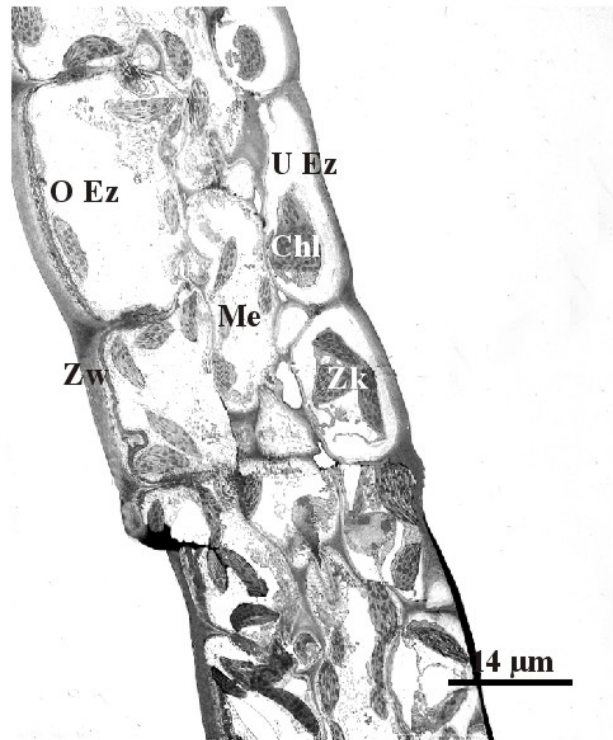


Abb. 101

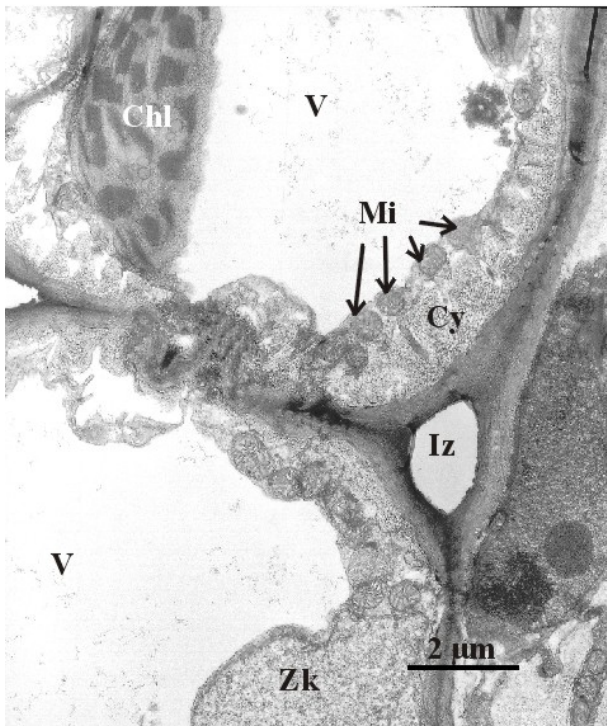


Abb. 102

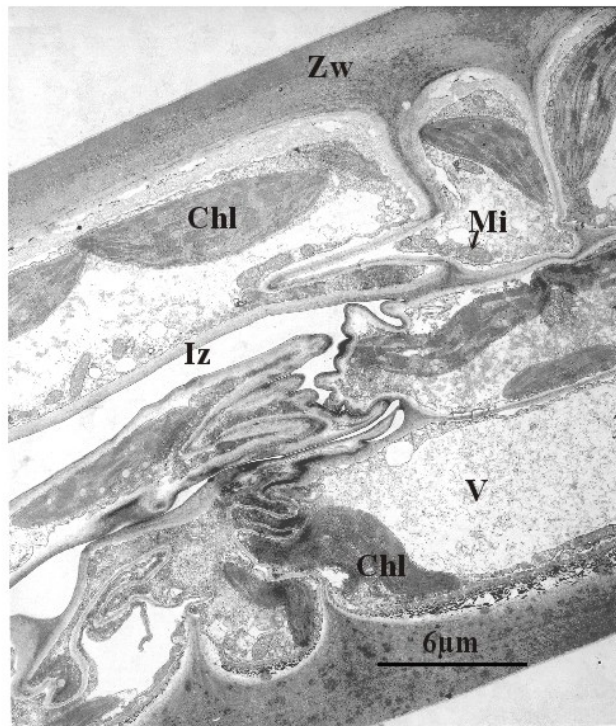


Abb. 103

Tafel 23

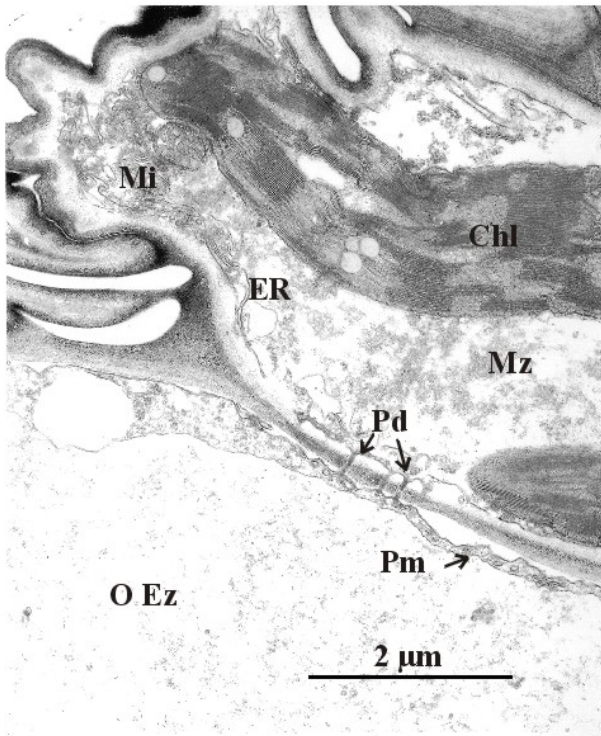


Abb. 104

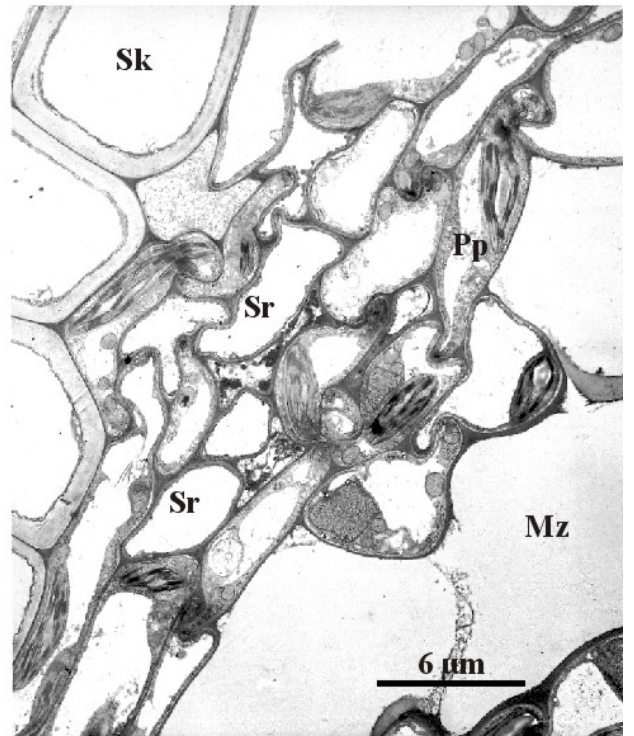


Abb. 105

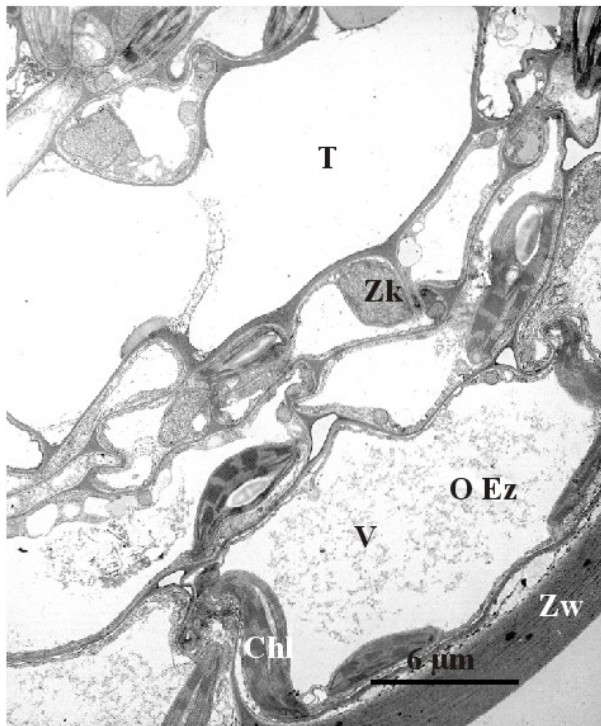


Abb. 106

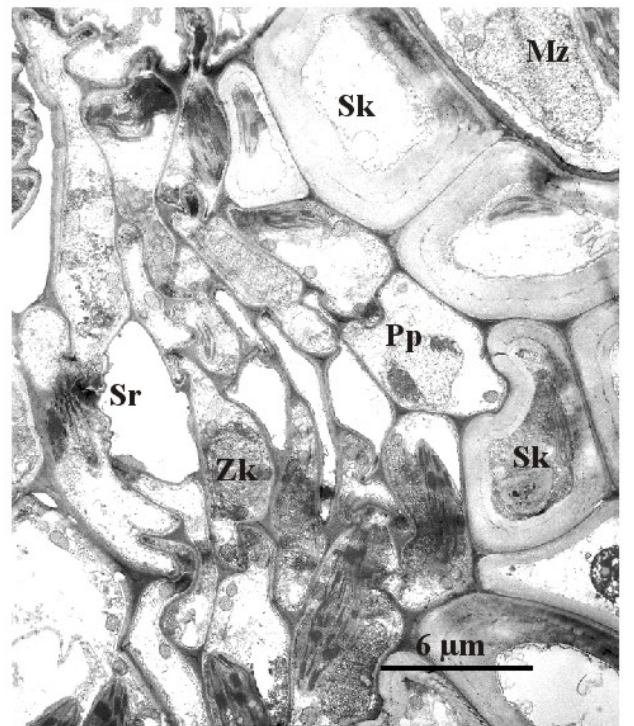


Abb. 107

Tafel 24

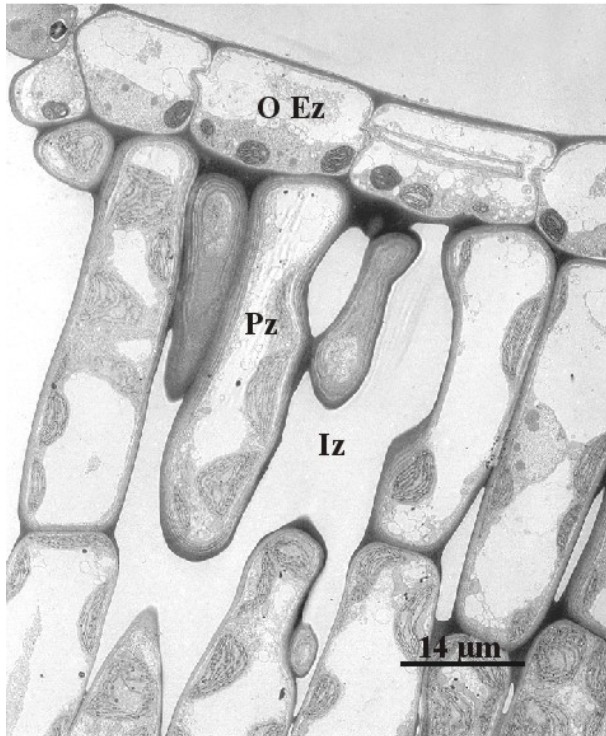


Abb. 108

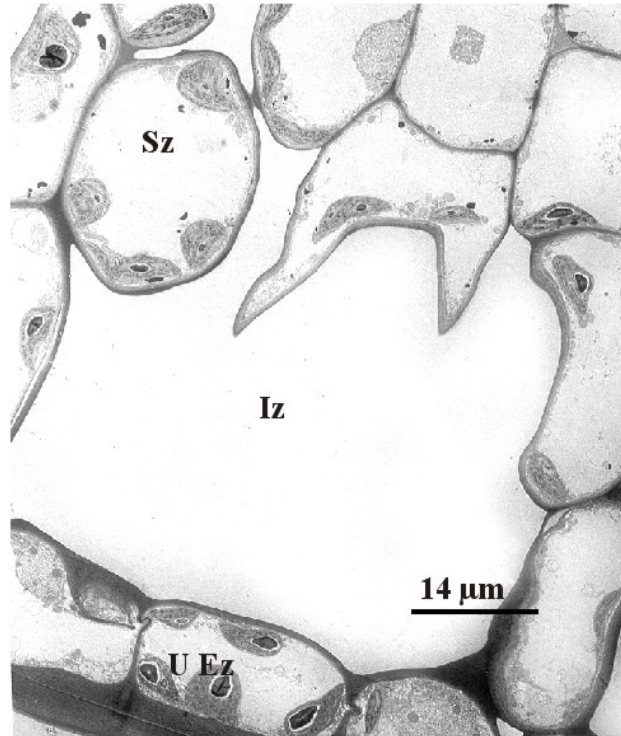


Abb. 109

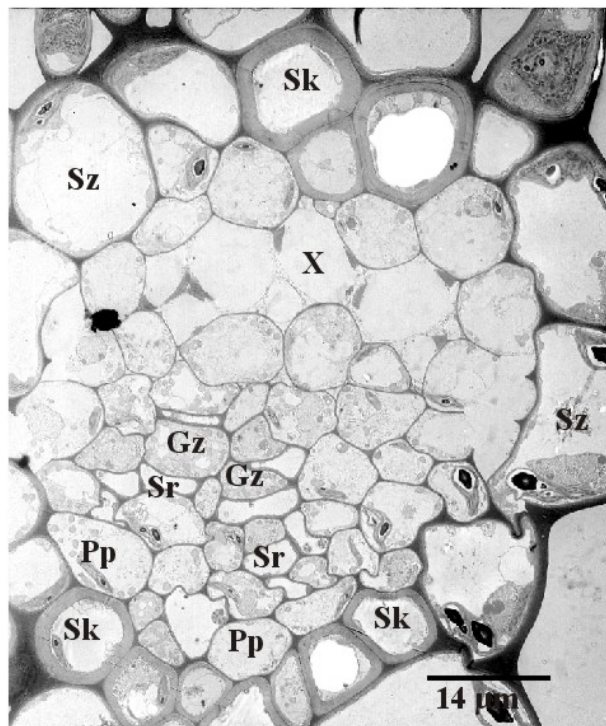


Abb. 110

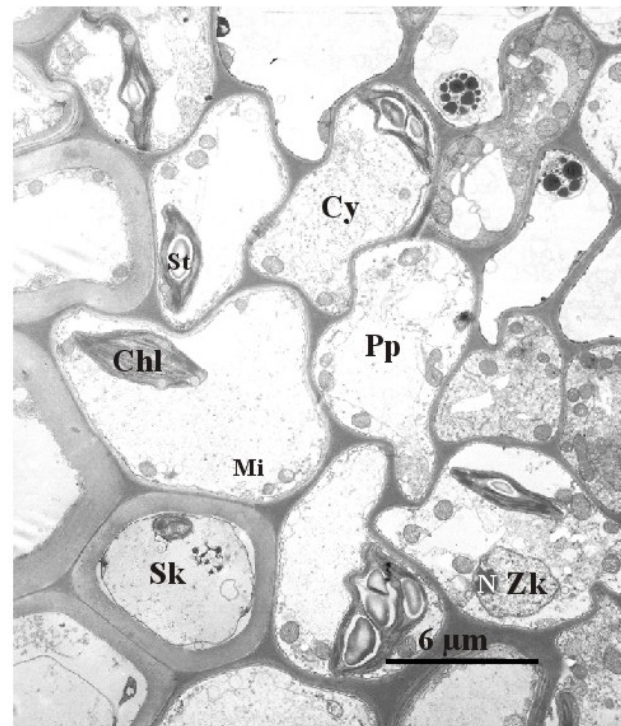


Abb. 111

3.2.2 Die Stängel der Wasserpflanzen

Die Stängel der hier untersuchten Hydrophyten sind radiär symmetrisch aufgebaut, mit Ausnahme des von *C. caroliniana*. Dieser weist einen dreikantigen Querschnitt auf (Abb.112).

Den deutlich kleineren Zellen der Epidermis folgen median eine Reihe aus dicht aneinander liegenden Parenchymzellen, die den äußeren Cortex des Aerenchyms bilden (Abb. 117). Anschließend folgt bei den *Myriophyllum*-, *Potamogeton*- und *Elodea*-Arten sowie bei *H. vulgaris* der mittlere Cortex, dessen große oval erscheinende Lakunen durch ein Netz aus hintereinander liegenden Parenchymzellen gebildet werden (Abb. 117, 121, 122). Um den Zentralzylinder herum, werden diese Lakunen wieder kleiner, und dichter beieinander stehende Parenchymzellen bilden den inneren Cortex (Abb. 113). Bei *R. penicillatus*, *C. demersum* und *C. hamulata* finden sich keine großen Lakunen im Stängelquerschnitt. Hier wird das Rindenparenchym durch eine Vielzahl kleinerer Interzellularen aufgelockert, die zur Mitte hin größer werden (Abb. 118, 119, 120). Bei *R. penicillatus* findet sich kein zentrales Leitbündel. Die kleineren kollateralen Leitbündel liegen, kreisförmig angeordnet, im äußeren Drittel des Rindenparenchyms (Abb. 120). In der Mitte befindet sich eine Markhöhle. Die Zentralzylinder in den Stängeln der anderen Wasserpflanzen sind durch eine, meist primäre Endodermis vom Parenchym getrennt. Gelegentlich können auch sekundäre Wandauflagerungen vorkommen (Abb. 114). Die Leitbündel sind konzentrisch, mit Innenxylem und Außenphloem (Abb. 113, 116) organisiert, in den Stängeln von *P. natans* zeigt sich ein tetrarcher konzentrischer Aufbau (Abb. 114).

Der dreieckige Stängel von *C. caroliniana* ist anders organisiert. Das Rindenparenchym ist lediglich von kleinen Interzellularen durchsetzt. In der Mitte des Querschnitts befindet sich eine große, dreieckige Markhöhle, mit der sie in Verbindung stehen. In den drei Ecken des Stängels liegt im Rindenparenchym je ein kollaterales Leitbündel (Abb. 112).

Auf den dicken periklinen Außenwänden der Epidermiszellen ist meist eine Cuticula aufgelagert, die bei den verschiedenen Arten unterschiedlich mächtig sein kann (Abb. 123, 124). Die Zellen enthalten neben den üblichen Zellorganellen auch Chloroplasten. Ein Anhäufung von Zellorganellen, insbesondere Chloroplasten und Mitochondrien, an bestimmten Stellen in den Zellen ist jedoch nicht zu erkennen. Meist liegen sie an den antiklinen Seitenwänden. Auch Wandprotuberanzen an den antiklinen Wänden der Epidermiszellen, wie sie in einigen Blättern zu finden sind, treten hier nicht in Erscheinung. Die Chloroplasten können unterschiedliche Mengen an Assimilationsstärke enthalten. Bei *E. nuttallii* (Abb. 126), *M. aquaticum* (Abb. 129), *C. caroliniana* (Abb. 130), und den Parenchym-Chloroplasten von *P. perfoliatus* (Abb. 127) füllen sie große Bereiche des Chloroplasten aus. Bei anderen Pflanzen findet man nur kleine Stärkekörner in den Plastiden, wie z.B. bei *R. penicillatus* (Abb. 128) und in den Epidermis-Chloroplasten von *P. perfoliatus* (Abb. 125).

3.2.3 Die Wurzeln der Wasserpflanzen

Der Bau der Hydrophytenwurzeln wurde von von Guttenberg (1968) ausführlich beschrieben, so dass an dieser Stelle nur kurz darauf eingegangen werden muß. Die radiär aufgebauten Wurzeln sind von einer einschichtigen Rhizodermis umgeben, deren Zellen meist deutlich kleiner als die Rindenparenchymzellen sind (Abb. 133, 136). Bei höheren Vergrößerungen zeigt sich eine z.T. recht eigenwillige Form der Rhizodermiszellen (Abb. 145, 146). Sie sind plasmareich und können eine dichte Verteilung von endoplasmatischem Retikulum aufweisen (Abb. 147), aber sie enthalten in aller Regel keine Chloroplasten. Unmittelbar nach der Rhizodermis folgt eine

einschichtige Hypodermis. Ihre Zellen unterscheiden sich deutlich in Größe und Form von den nachfolgenden Rindenparenchymzellen (Abb. 133, 134, 145).

Bei *M. aquaticum* besteht die Hypodermis aus schmalen, amöboid aussehenden Zellen, deren Vakuolen mit elektronendichtem Material gefüllt sind (Abb. 148).

Tafel 25: Stängelquerschnitte mit Toluidinblau gefärbt. Abb. 112: Stängelausschnitt mit kollateralem Leitbündel von *C. caroliniana*. Abb. 113: Innerer Cortex und Zentralzylinder mit konzentrischem Leitbündel von *M. spicatum*. Abb. 114: Innerer Cortex und Zentralzylinder mit tetrarchem Leitbündel von *P. natans*. Abb. 115: Zentralzylinder mit Leitgewebe von *E. nuttallii*. Abb. 116: Innerer Cortex und Zentralzylinder mit konzentrischem Leitbündel mit Innenxylem von *H. vulgaris*. Abb. 117: Äußerer Cortex und Aerenchym von *M. spicatum*.

Tafel 26: Stängelquerschnitte mit Toluidinblau gefärbt. Abb. 118: Stängelquerschnitt von *C. demersum*. Abb. 119: Stängelquerschnitt von *C. hamulata*. Abb. 120: Rindenparenchym mit kollateralem Leitbündel von *R. penicillatus*. Abb. 121: Aerenchym von *P. natans*. Abb. 122: Aerenchym von *H. vulgaris*.

Tafel 27: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Stängeln. Abb. 123: Perikline äußere Zellwand von *R. penicillatus*. Abb. 124: Perikline Außenwand von Epidermiszellen von *P. perfoliatus*. Abb. 125: Chloroplasten an den antiklinen Seiten d. Epidermiszellen von *P. perfoliatus*. Abb. 126: Chloroplasten in der Epidermis von *E. nuttallii*.

Tafel 28: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Stängeln. Abb. 127: Chloroplast einer Rindenparenchymzelle von *P. perfoliatus*. Abb. 128: Chloroplast einer Rindenparenchymzelle von *R. penicillatus*. Abb. 129: Rindenparenchymzellen mit Chloroplasten von *M. aquaticum*. Abb. 130: Chloroplast einer Rindenparenchymzelle von *C. caroliniana*.

Tafel 29: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Stängeln. Abb. 131: Epidermis- und Rindenparenchymzellen von *H. vulgaris*. Abb. 132 Perikline und antikline Zellwände von *M. aquaticum*.

Tafel 30: Wurzelquerschnitte, mit Toluidinblau gefärbt. Abb. 133: Übersicht von *M. aquaticum*. Abb. 134: Übersicht von *M. spicatum*. Abb. 135: Übersicht von *P. perfoliatus*. Abb. 136: Äußerer Bereich von *P. oceanica*. Abb. 137: Äußerer Bereich von *S. aloides*. Abb. 138: Zentralzylinder mit tetrarchem Leitbündel von *M. aquaticum*.

Tafel 31: Wurzelquerschnitte, mit Toluidinblau gefärbt. Abb. 139: Übersicht von *C. caroliniana*. Abb. 140: Innerer Cortex mit Leitbündel von *S. aloides*. Abb. 141: Innerer Cortex mit konzentrischem Leitbündel von *P. oceanica*. Abb. 142: Übersicht von *P. lucens*. Abb. 143: Übersicht von *H. vulgaris*. Abb. 144: Äußerer Cortex von *R. penicillatus*.

Tafel 32: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Wurzel. Abb. 145: Rhizodermis von *C. caroliniana*. Abb. 146: Rhizodermis von *R. penicillatus*. Abb. 147: Rhizodermis von *P. perfoliatus*.

Tafel 33: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Wurzel. Abb. 148: Rhizodermis und Rindenparenchym von *M. aquaticum*. Abb. 149: Amyloplasten in Rindenparenchymzellen von *C. caroliniana*. Abb. 150: Chloroplasten in Rindenparenchymzellen von *M. spicatum*.

Tafel 34: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Wurzel. Abb. 151: Chloroplasten im Rindenparenchym von *P. perfoliatus*. Abb. 152: Zentralzylinder mit konzentrischem Leitbündel mit Innenxylem von *M. spicatum*. Abb. 153: Zellen des zentralen Leitsystems von *V. spiralis*.

Abkürzungen der Tafeln 25-34:

Aussenseite (A); Äußerer Cortex (AC); Aerenchym (Ae); Amyloplast (Am); Chloroplast (Chl); Cuticula (Cu); Cytoplasma (Cy); Dictyosom (Di); Drüsenzellen (Dz); Epidermis (Ed); Endodermis (En); Endoplasmatisches Retikulum (ER); Epidermiszelle (Ez); Exodermis (Ex); Granathylakoid (GT); Hypodermis (Hd); Innerer Cortex (IC); Idioblast (Id); Interzellulare (Iz); Lakune (L); Leitbündel (Lb); Markhöhle (Mh); Mesophyll (Me); Mitochondrium (Mi); Plastoglobuli (P); Parenchym (Pa); Plasmodesmos (Pd); Perizykel (Pz); Phloem (Ph); Plasmamembran (Pm); Rhizodermis (Rh); Rhizodermiszelle (RhZ); Rindenparenchym (Rp); Rindenparenchymzelle (Rpz); Skerenchym (Sk); Stärke (St); Tonoplast (To); Vakuole (V); Wandprotuberanz (Wp); Xylem (X); Zellkern (Zk); Zellwand (Zw); Zentralzylinder (Zz);

Tafel 25

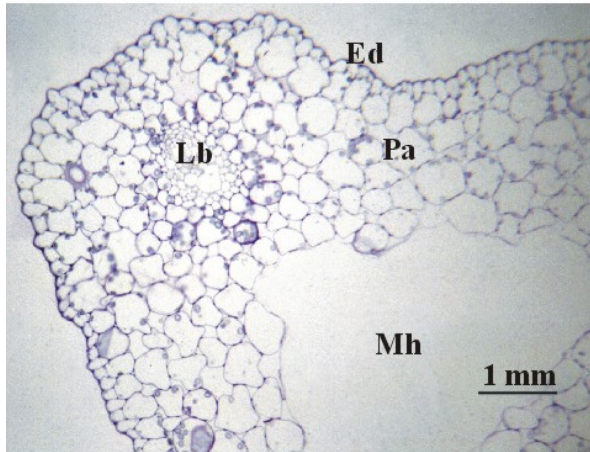


Abb. 112

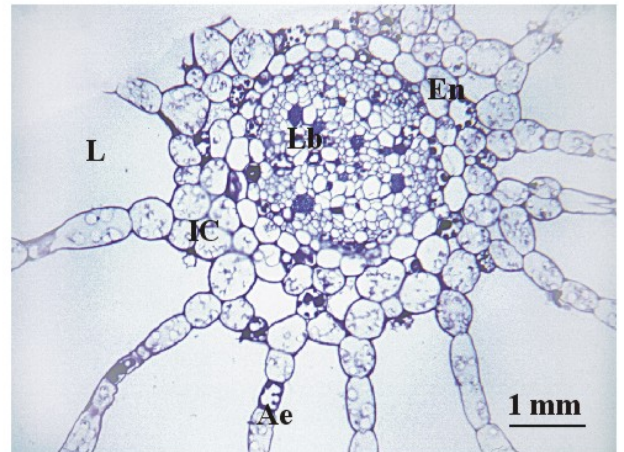


Abb. 113

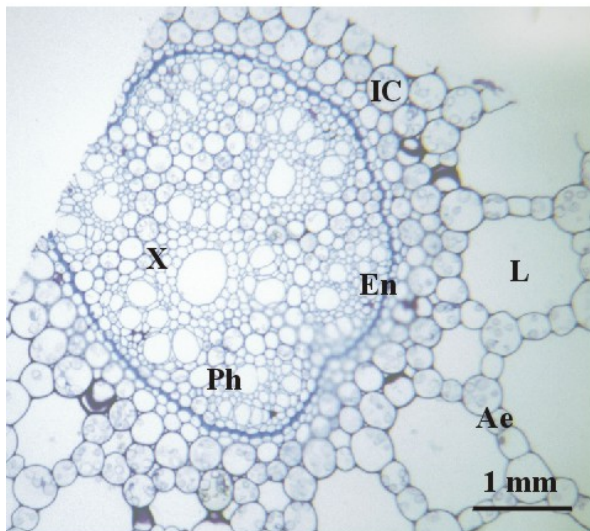


Abb. 114

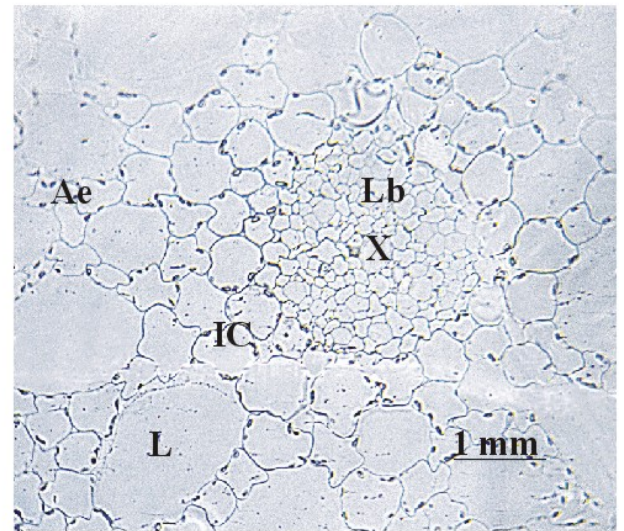


Abb. 115

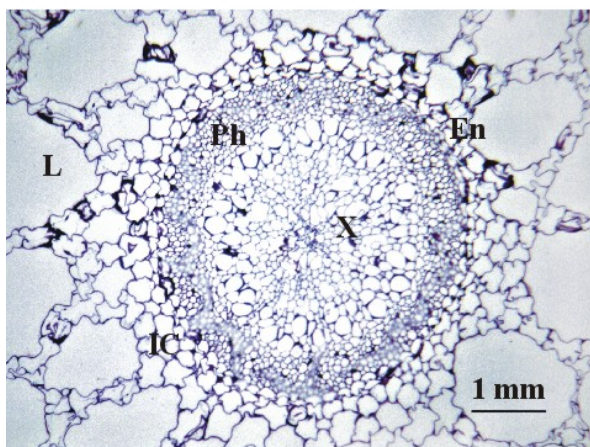


Abb. 116

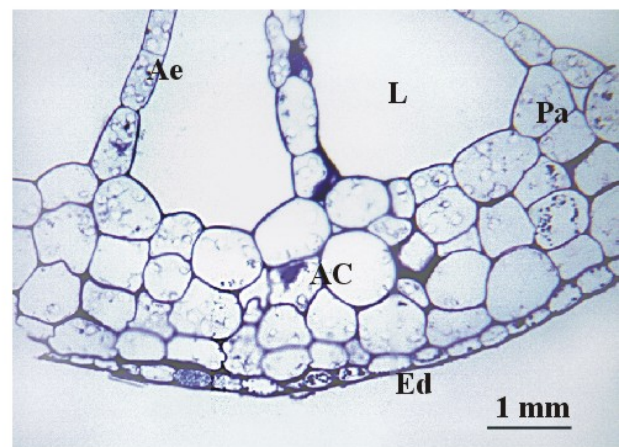


Abb. 117

Tafel 26

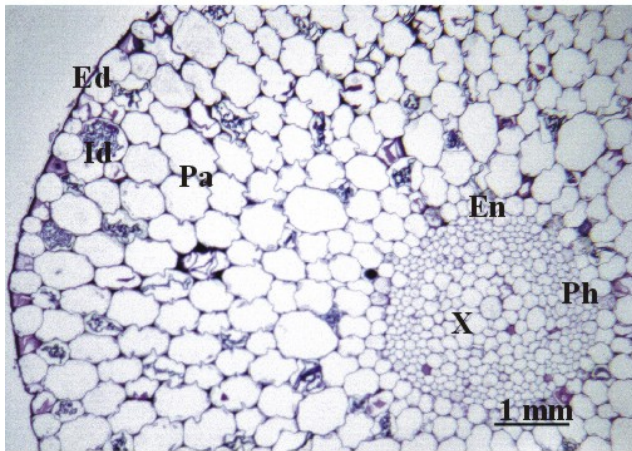


Abb. 118

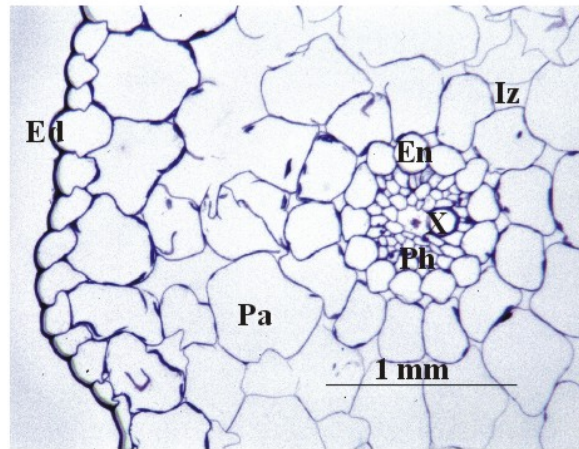


Abb. 119

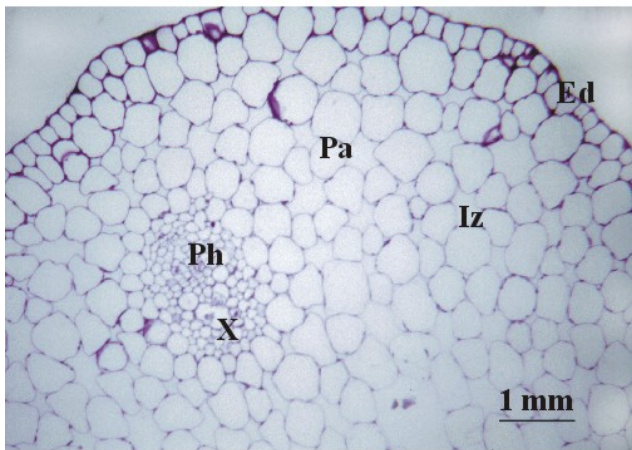


Abb. 120

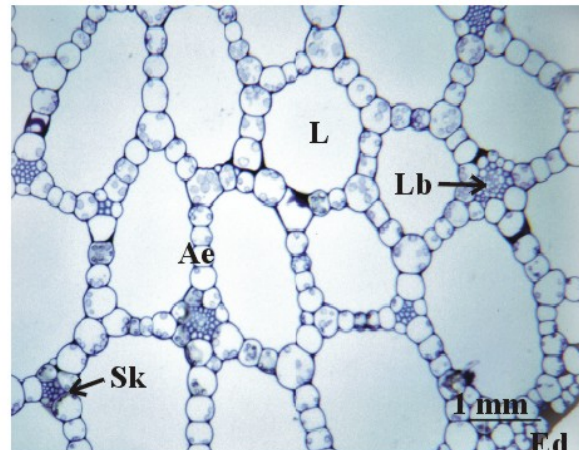


Abb. 121

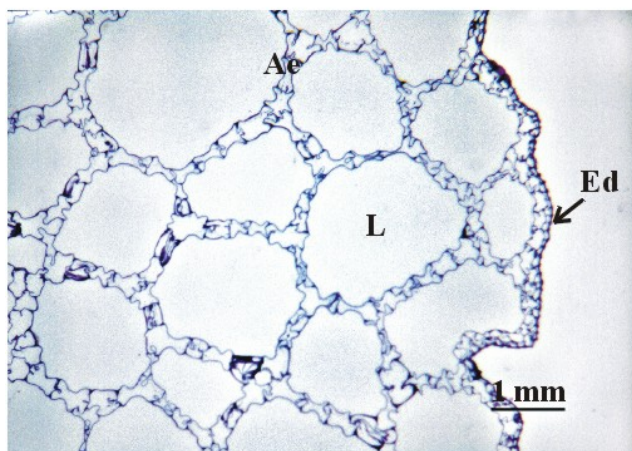


Abb. 122

Tafel 27

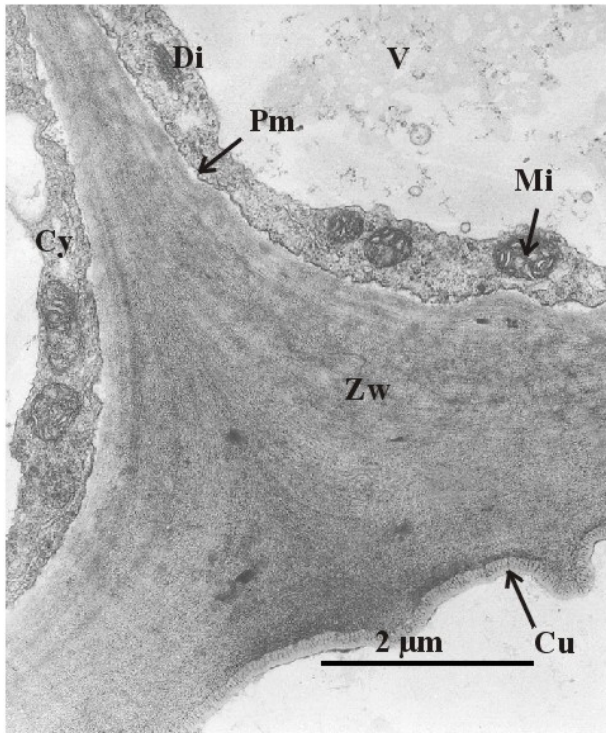


Abb. 123

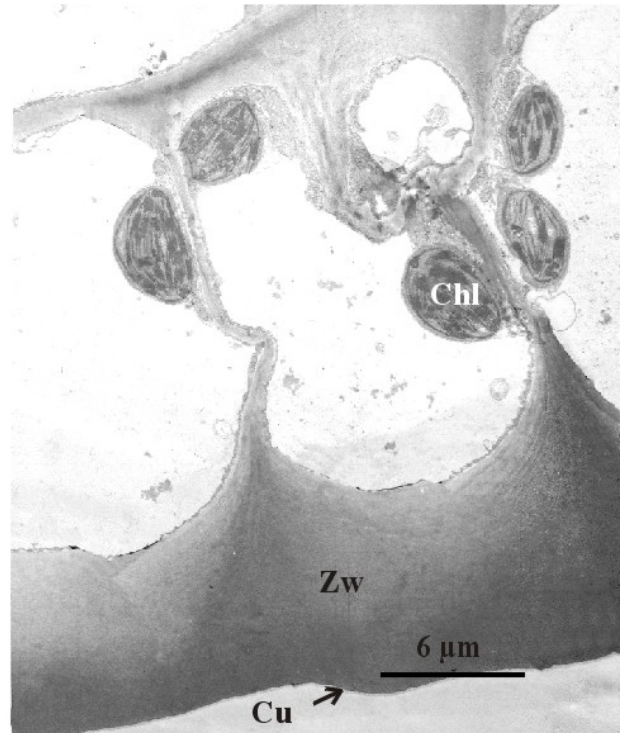


Abb. 124

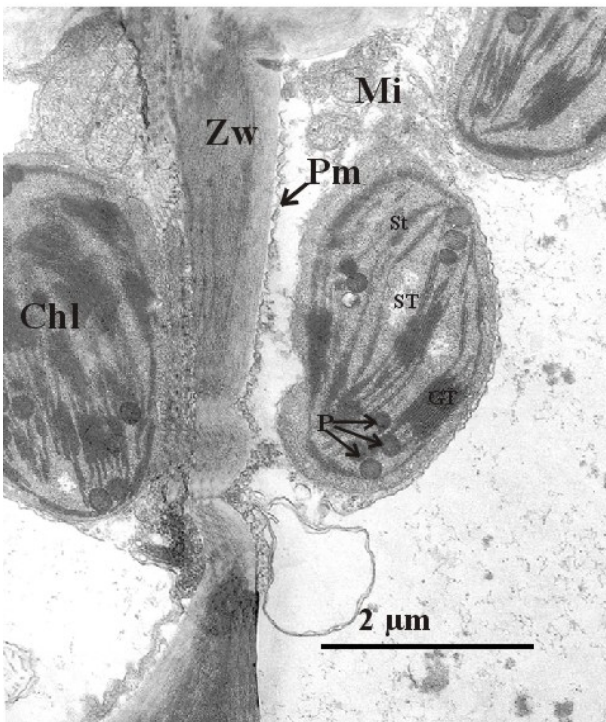


Abb. 125

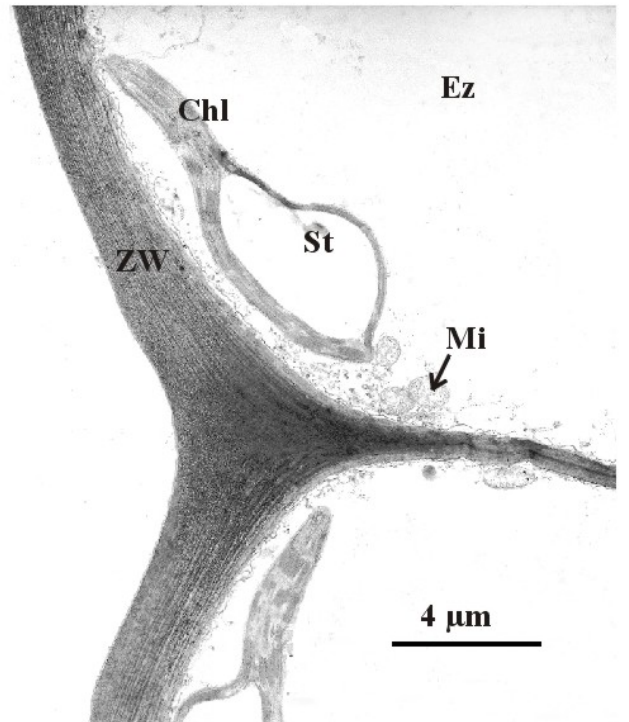


Abb. 126

Tafel 28

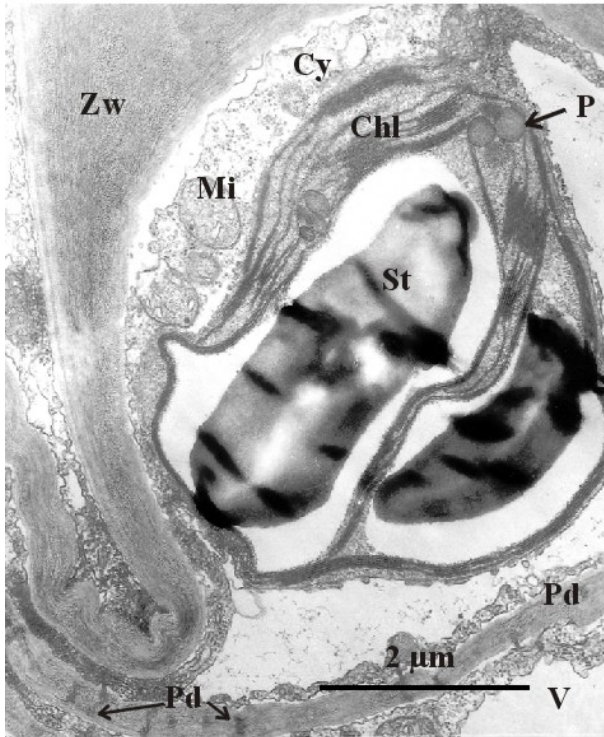


Abb. 127

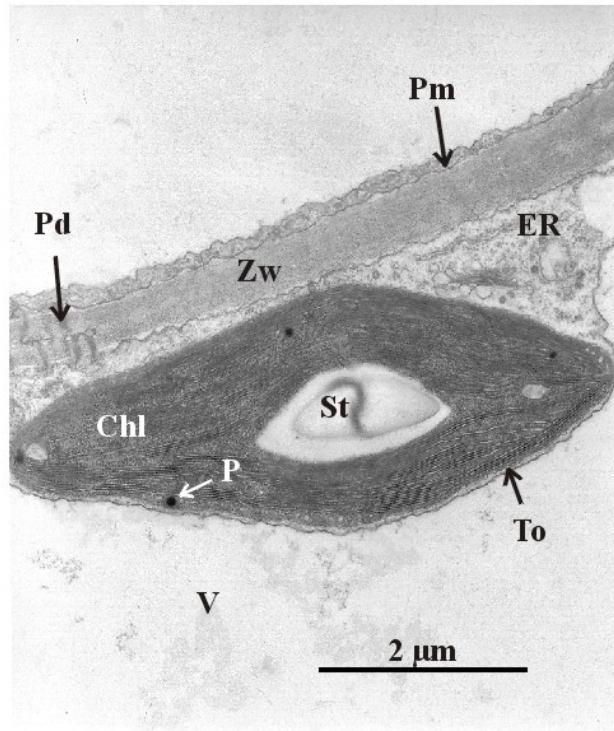


Abb. 128

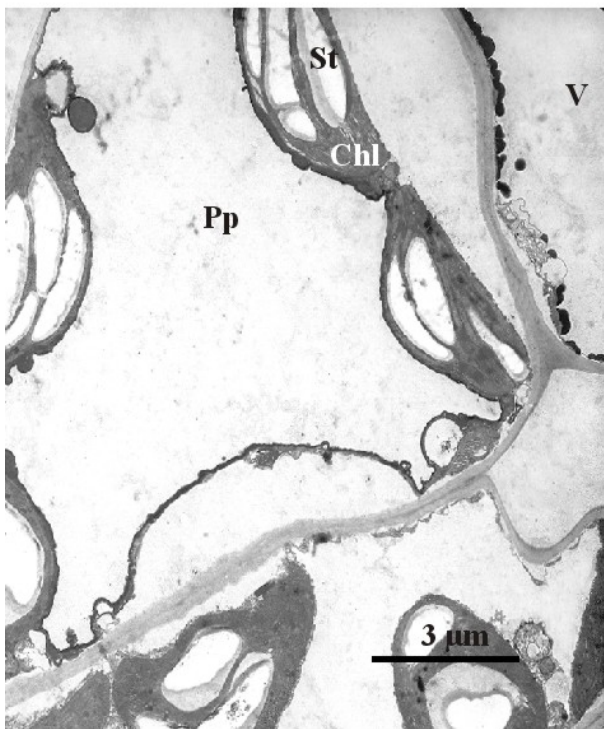


Abb. 129

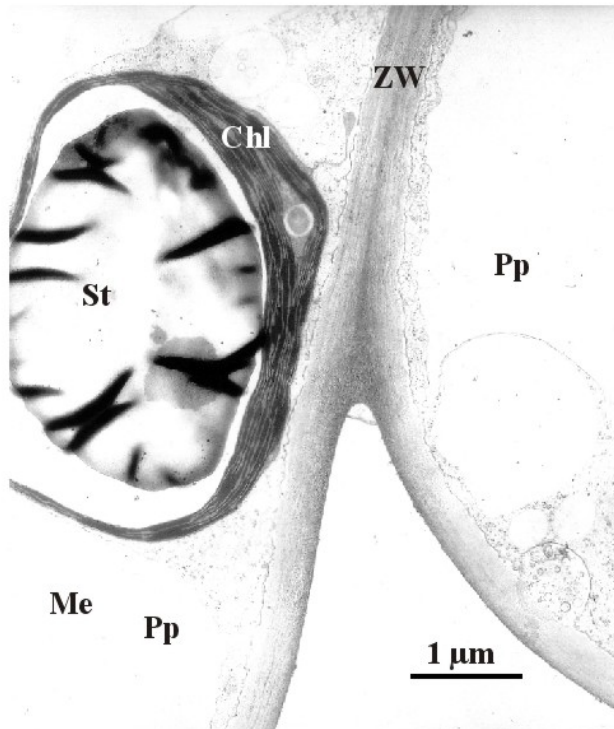


Abb. 130

Tafel 29

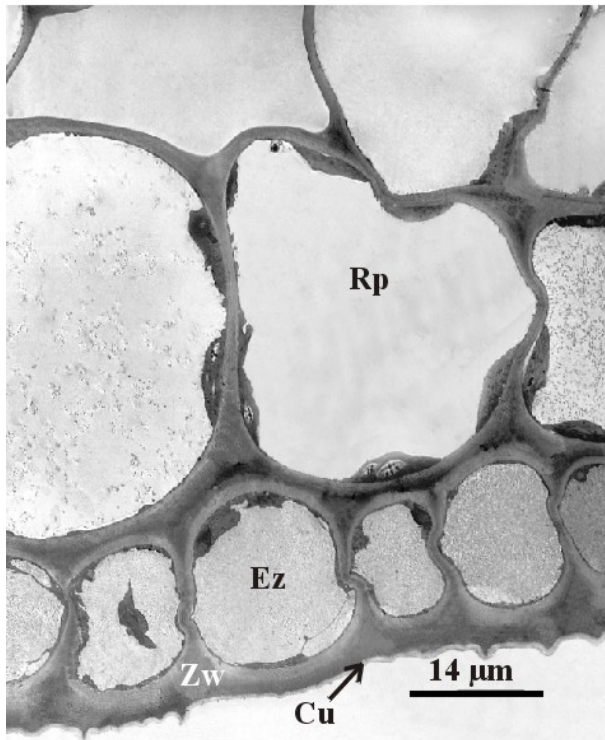


Abb. 131

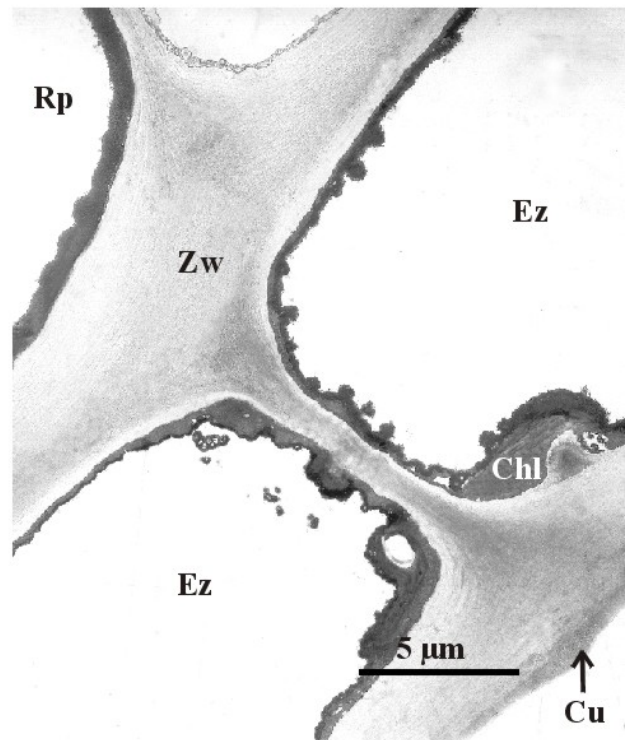


Abb. 132

Tafel 30

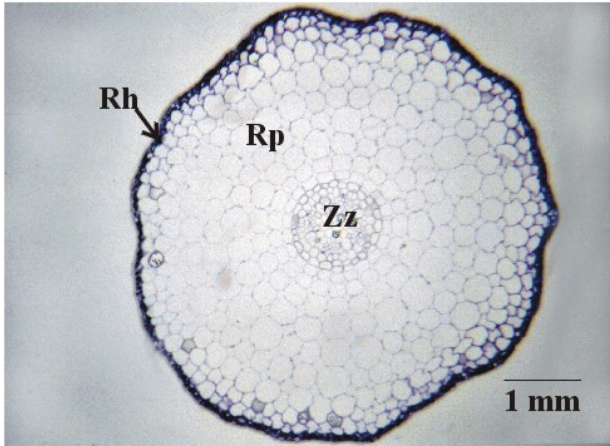


Abb. 133

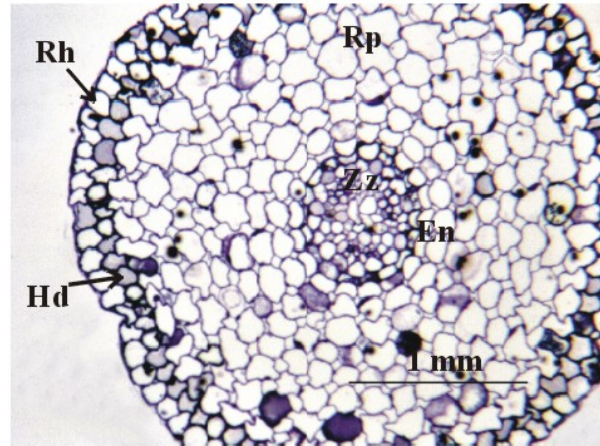


Abb. 134

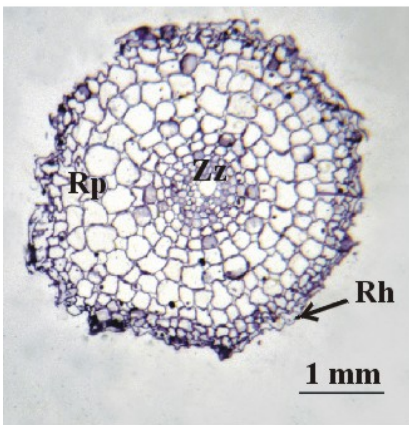


Abb. 135

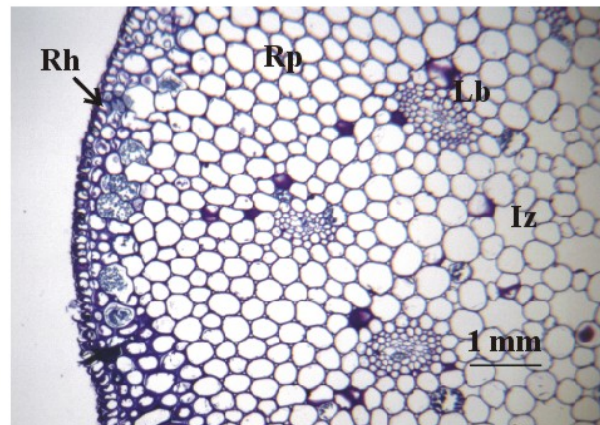


Abb. 136

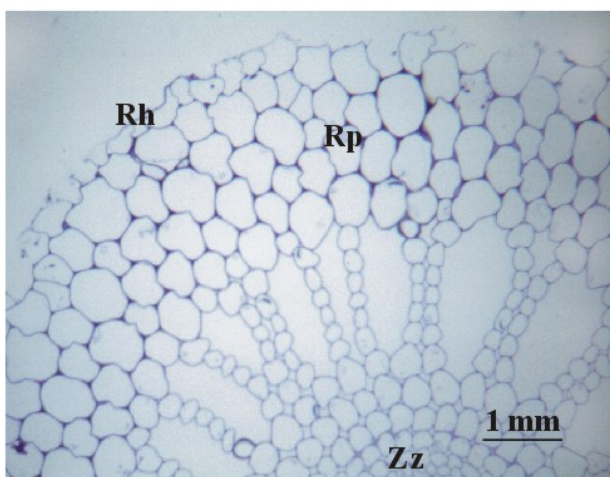


Abb. 137

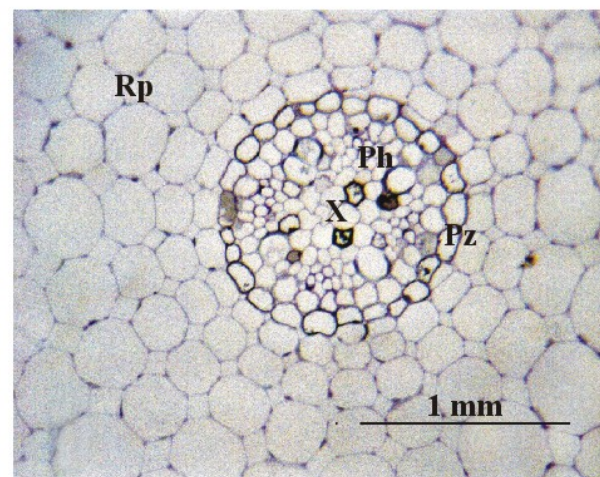


Abb. 138

Tafel 31

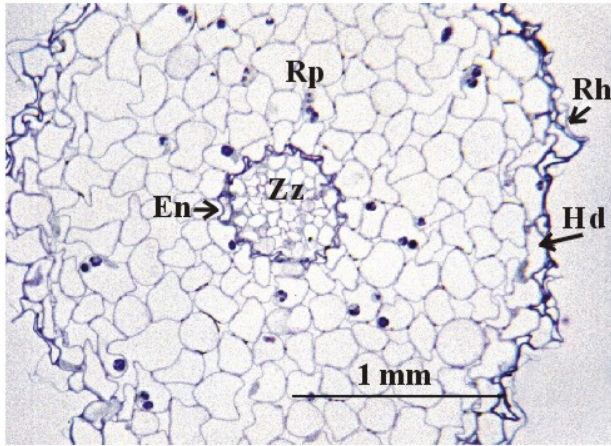


Abb. 139

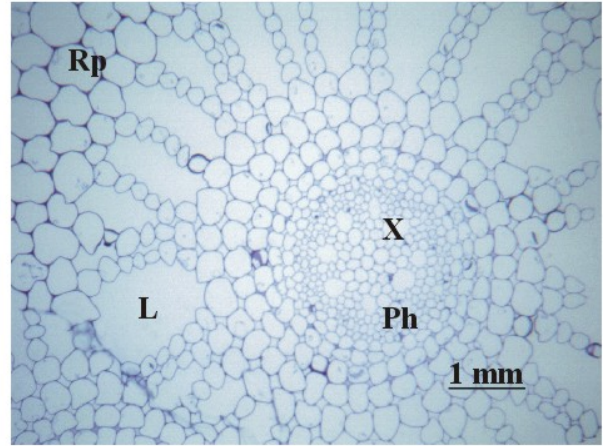


Abb. 140

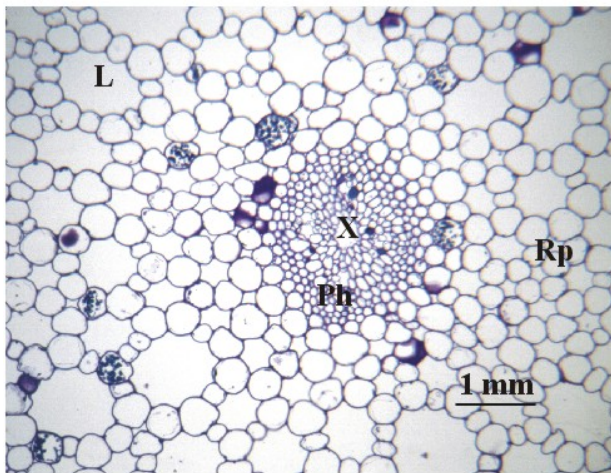


Abb. 141

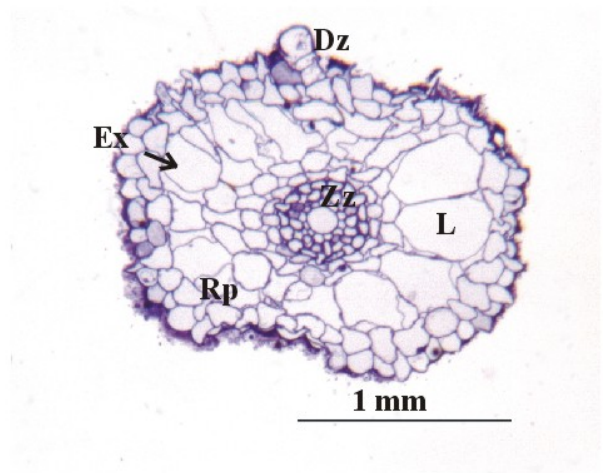


Abb. 142

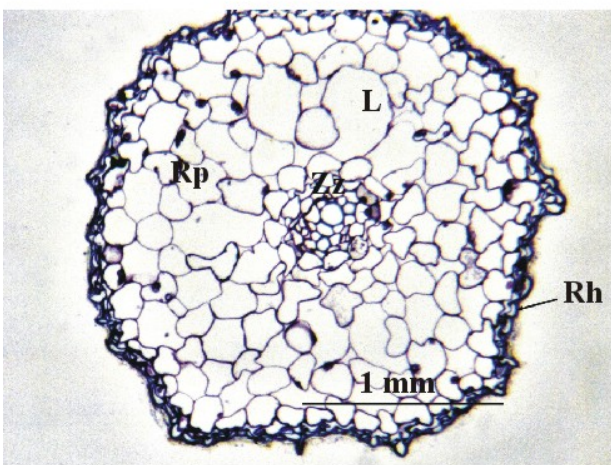


Abb. 143

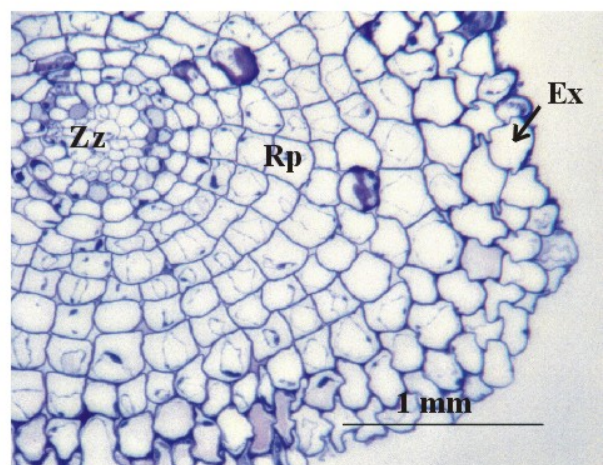


Abb. 144

Tafel 32

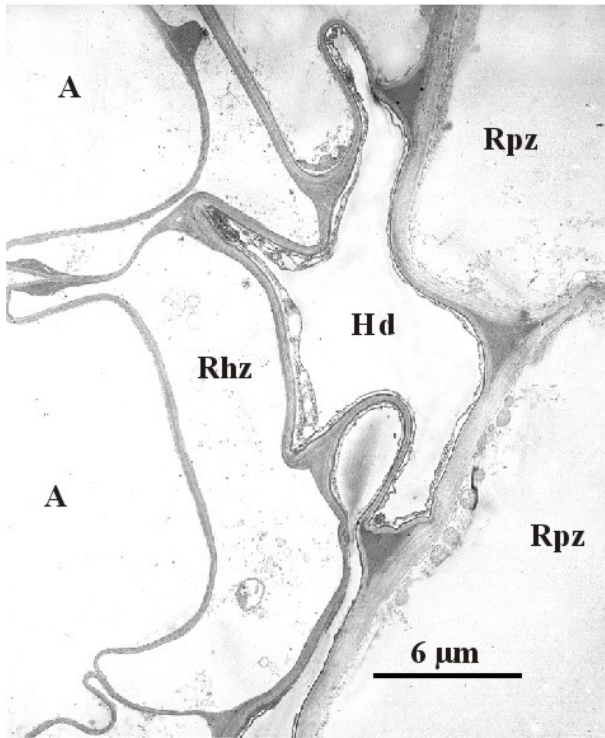


Abb. 145

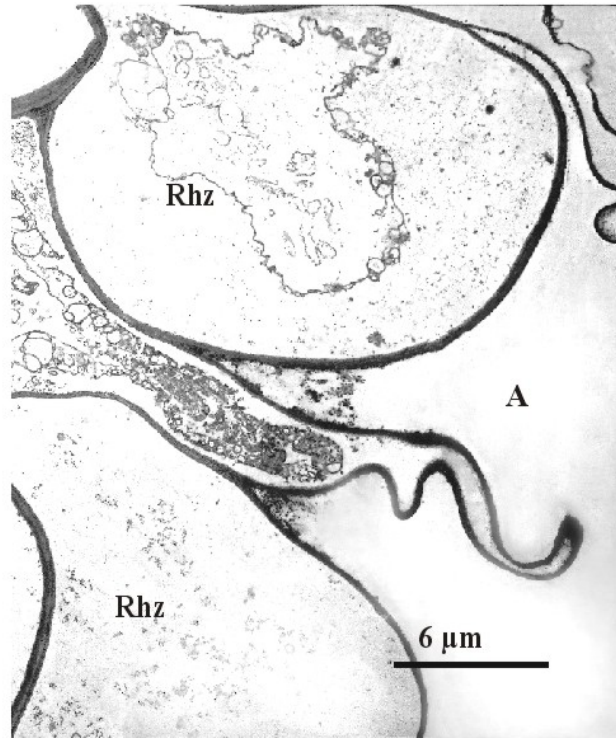


Abb. 146

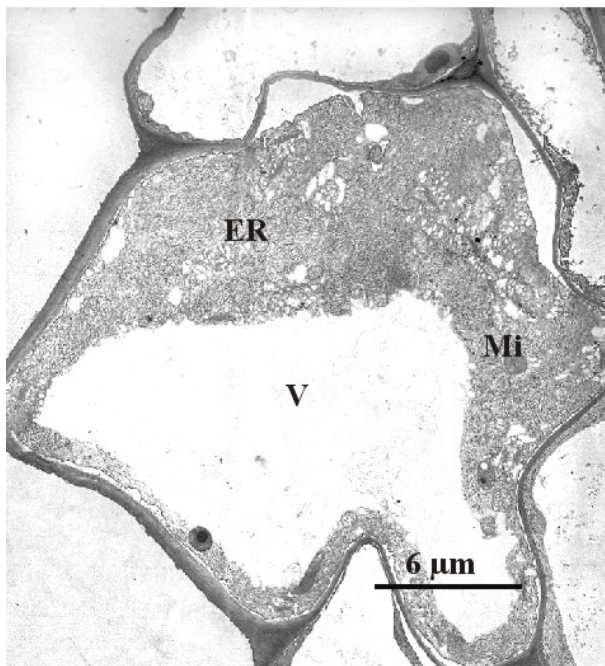


Abb. 147

Tafel 33

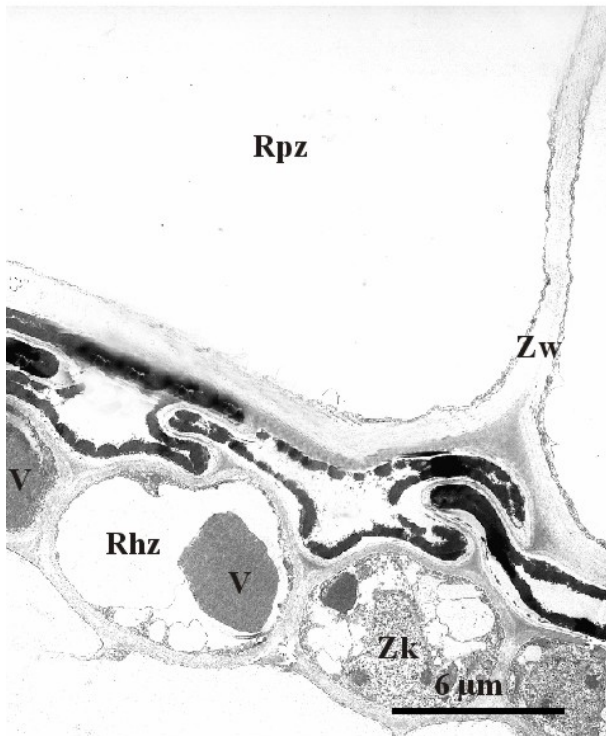


Abb. 148

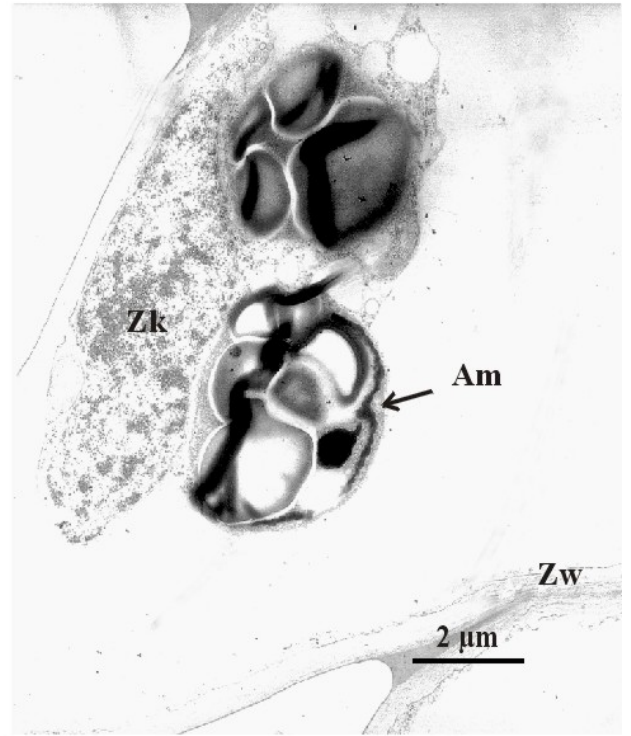


Abb. 149

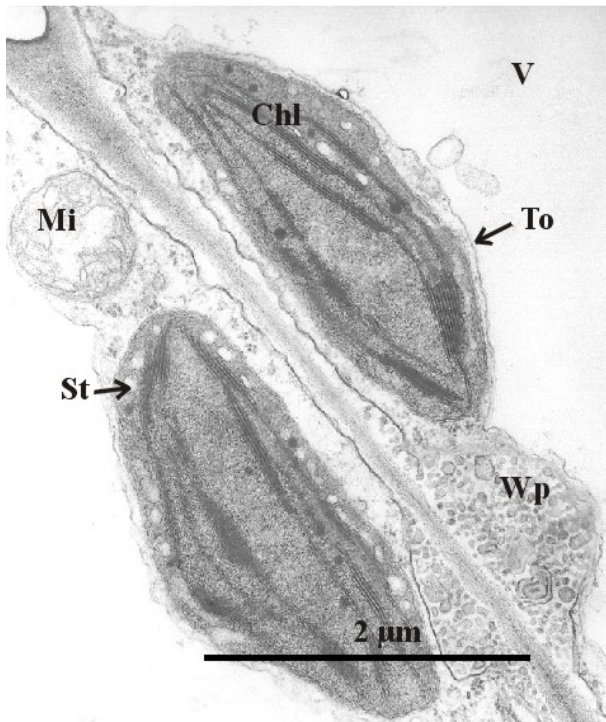


Abb. 150

Tafel 34

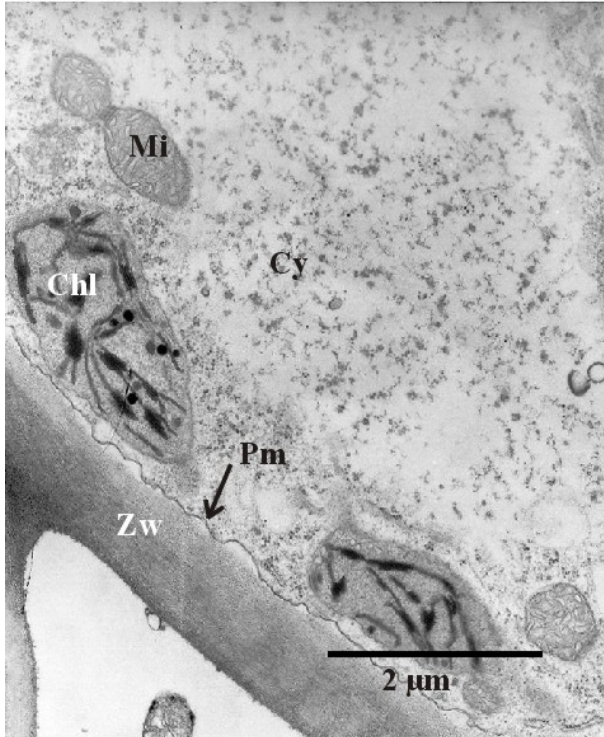


Abb. 151

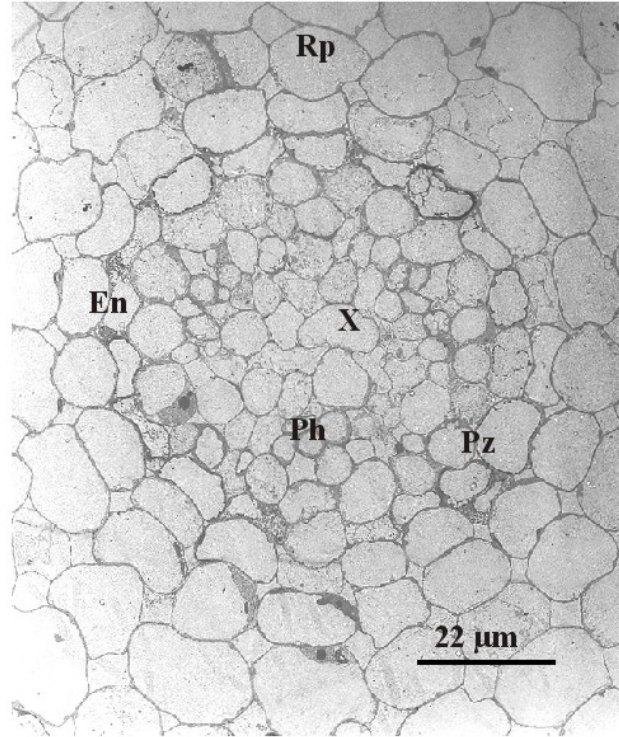


Abb. 152

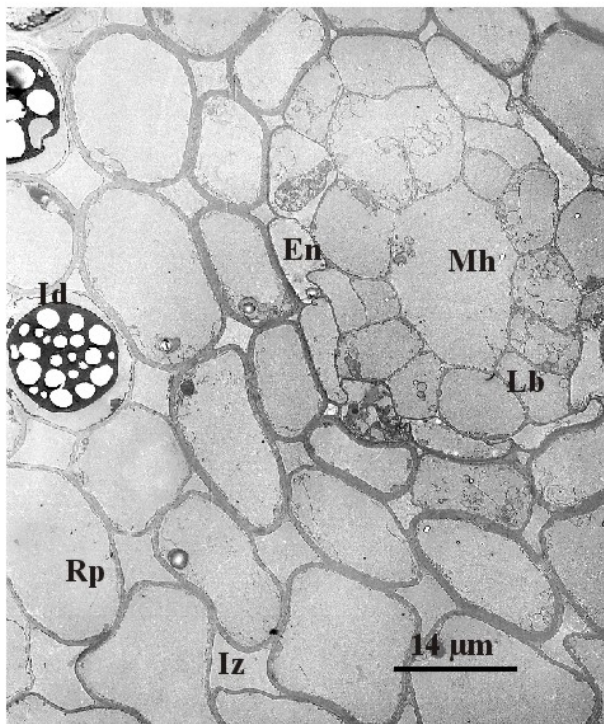


Abb. 153

Die isodiametrischen Rindenparenchymzellen sind entweder versetzt zueinander angeordnet (Abb. 134), oder liegen in Reihen strukturiert vor (Abb. 135). Bei *Stratiotes aloides* treten beide Formen auf. Im äußeren Rindenbereich sind die Zellen zunächst versetzt angeordnet, so dass nur kleine Interzellularen auftreten. Vereinzelt sind Zellen eines Kantenkollenchyms eingestreut. Weiter zur Querschnittmitte hin reihen sich die Parenchymzellen hintereinander an und bilden so größere Lakunen aus. Um den Zentralzylinder herum verdichten sie sich wieder (Abb. 137). Die Zellen des Rindenparenchyms können neben Amyloplasten (Abb. 149) auch Chloroplasten enthalten (Abb. 150, 151). Eine primäre oder sekundäre Endodermis trennt den Zentralzylinder von der Rinde (Abb. 134, 138, 139). Das „Leitsystem“ der Wurzeln (Jurzitza, 1987) ist radiär gebaut, mit einem sternförmig angeordneten Xylem und einem Phloem, das in dessen Buchten liegt. Meist handelt es sich um tetrarche Stränge (Abb. 138, 140). Andere Leitsysteme haben einen konzentrischen Aufbau, mit Innenxylem und Außenphloem (Abb. 141) und wiederum andere zeigen keine eindeutige Strukturierung (Abb. 152). Oftmals ist nur eine kleine Markhöhle zu erkennen (Abb. 142, 143, 144). Der Aufbau des Leitsystems bei *Vallisneria spiralis* unterscheidet sich etwas von dem der anderen Arten. Um eine kleine Markhöhle liegen mehrere konzentrische Kreise aus Rindenparenchymzellen und nach Napp-Zinn (1984) auch einige Zellen des Phloems. Tracheiden sind nicht zu erkennen (Abb. 153).

3.3 Immunlokalisation der PM-H⁺-ATPase

3.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers und des Fluorochroms FITC wurde die PM-H⁺-ATPase in den Blättern, Stängeln und Wurzeln unterschiedlicher Hydrophyten mit Hilfe des Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskops (CLSM) lokalisiert.

3.3.1.1 Lokalisation der FITC-Fluoreszenz in Blättern von Hydrophyten

Die Lokalisation der PM-H⁺-ATPase in den Blättern der Wasserpflanzen war in unterschiedlichen Blattgeweben erfolgreich. Oftmals fand sich eine Markierung nur in den Epidermiszellen. Bei anderen Blättern konnten neben der FITC-Fluoreszenz in der Epidermis auch im Mesophyll Markierungen beobachtet werden. In einer dritten Gruppe von Pflanzenblättern waren lediglich einige Zellen der zentralen Leitbündel mit FITC markiert. Viele der untersuchten Pflanzen zeigten jedoch überhaupt keine FITC-Fluoreszenz.

3.3.1.1.1 Allgemeiner Überblick

Die folgende Tabelle (8) gibt zunächst einen Überblick über die untersuchten Pflanzen und das Auftreten einer FITC-Fluoreszenz. Dabei wurden mit Hilfe einer Literatur-Recherche, soweit dies möglich war, die HCO₃⁻-Nutzer bei Wasserpflanzen ermittelt und den Ergebnissen der FITC-Fluoreszenzmarkierung zugeordnet. Die hervorgehobenen Pflanzenarten wurden in weiteren Versuchen eingesetzt (siehe 2.1.2).

Tabelle 8: Immunfluoreszenz-Markierung mit FITC in den Blättern von Wasserpflanzen

Pflanze	Fluoreszenz	HCO₃⁻-Nutzer	Literaturstelle
<i>Aponogeton distachios</i>	ja		
<i>Bacoba japonica</i>	nein		
<i>Cabomba caroliniana</i>	ja		
<i>Callitriche hamulata</i>	nein		
<i>Ceratophyllum demersum</i>	ja	ja	van Haller & Bows, 1976
<i>Ceratophyllum submersum</i>	ja	ja	
<i>Cryptocoryne beckettii</i>	nein		
<i>Elodea canadensis</i>	ja	ja	Marberly & Spence, 1983 Prins et al., 1980, 1982
<i>Elodea nuttallii</i>	ja	ja	
<i>Fontinalis antipyretica</i>	nein	nein	Bain & Procter, 1980 Marberly & Spence, 1983
<i>Hippuris vulgaris</i> T/S	nein/nein	nein	Marberly & Spence, 1983
<i>Hottonia inflata</i>	nein		
<i>Isoetes setacea</i>	nein		

Fortsetzung Tabelle 8: Immunfluoreszenz-Markierung mit FITC in den Blättern von Wasserpflanzen

Pflanze	Fluoreszenz	HCO₃⁻-Nutzer	Literaturstelle
<i>Lobelia dortmanna</i>	nein	nein	Spence & Marberly, 1985
<i>Ludwigia perennis</i>	nein		
<i>Mentha aquatica</i>	nein		
<i>Microsorium pteropus</i>	nein		
Myriophyllum aquaticum	ja im LB	nein	Prins et al., 1982
Myriophyllum spicatum	ja	ja	Marberly & Spence, 1983 Prins et al., 1980,1982
Myriophyllum verticillatum	ja im LB	nein	Prins et al., 1982
<i>Najas mariana</i>	nein		
<i>Oeanthe aquatica</i>	nein		
Posidonia oceanica	ja	ja	Invers et al. 1999
Potamogeton lucens	ja	ja	Prins et al., 1980, 1982
Potamogeton natans T/S	ja/ja im LB	ja	
Potamogeton perfoliatus	ja	ja	Kadono, 1980 Marberly & Spence, 1983
Ranunculus penicillatus	ja	ja	Newman & Raven, 1999
<i>Rotala rofundifolia</i>	nein		
Stratiotes aloides	ja	ja	Prins & DeGuia, 1986
<i>Utricularia vulgaris</i>	nein	nein	Marberly & Spence, 1983
Vallisneria spiralis	ja	ja	Steeman-Nielsen, 1947 Prins et al., 1980

(T: Tauchblatt; S: Schwimmblatt; LB: Leitbündel)

3.3.1.1.2 FITC-Fluoreszenz in den Epidermiszellen von Blättern

Bei den Blättern der beiden Wasserpestarten *E. canadensis* (Abb. 154a) und *E. nuttallii* (Abb. 155a) waren in den Zellen der abaxialen (unteren) Epidermis deutliche FITC-Markierungen in medial gelegenen Bereichen direkt an den Zellwänden zu erkennen. Leichte Plasmolyseerscheinungen an den Zellen zeigten, dass die FITC-Markierungen am Plasmalemma lokalisiert sein müssen. Während bei *E. canadensis* alle Seiten der abaxialen Epidermiszellen und die periklinen Innenseiten der adaxialen Epidermiszellen intensiv grün fluoreszierten, leuchteten bei *E. nuttallii* die periklinen Innenseiten der Zellen beider Epidermen deutlich stärker (Abb. 155a). Oft war in den Zellen der adaxialen Epidermis aber auch keine Fluoreszenz zu erkennen. Auch in dem kleinen Leitbündel in der Mitte des Blattes zeigte sich keine Fluoreszenz.

Bei den äquifazialen Flachblättern von *Stratiotes aloides*, *Vallisneria spiralis* und *Posidonia oceanica* fand sich eine FITC-Fluoreszenz in allen Zellen der Epidermis (Abb. 156a, 157a, 158a). Die Intensitäten der Markierungen waren dabei deutlich unterschiedlich verteilt. Die periklinen Innenseiten der Epidermiszellen leuchteten kräftig grün, während an den periklinen Außenseiten wenig oder keine Markierung zu erkennen war. An den antiklinen Seiten der Zellen fand sich eine geringe Fluoreszenz, die von innen nach außen hin abnahm.

In den Leitbündeln von *S. aloides* und *V. spiralis* konnte keine Markierung festgestellt werden, während bei *P. oceanica* eine eindeutige Fluoreszenz in einzelnen Zellen des Leitgewebes zu erkennen war. Ein Vergleich mit der Kontrolle (Abb. 158c) zeigt, daß es sich dabei nicht um Primärfluoreszenzen handelte, sondern um eine FITC-Fluoreszenz.

In den Fiederblättern von *C. demersum* (Abb. 159a) und dem Unterwasserblatt von *P. natans* (Abb. 160a) waren nur in den Epidermiszellen FITC-Markierungen zu finden. Auch hier fiel eine unterschiedliche Intensität der FITC-Fluoreszenz auf. An den periklinen Innenseiten der Zellen war sie deutlich stärker, als an den antiklinen Seiten. Im den Mesophyllzellen sowie den Leitbündeln waren keine Markierungen zu lokalisieren. In den Schwimmblättern von *P. natans* konnte eine leichte FITC-Fluoreszenz in den Epidermiszellen der Blattunterseite registriert werden (Abb. 161a). Die Grünfluoreszenz in den Sklerenchymzellen, die das Leitbündel umgeben, beruhten dagegen auf einer Primärfluoreszenz der verdickten Zellwände. Sie war auch in der Kontrolle zu finden (161c).

In den äquifazialen Rundblätter von *R. penicillatus* (Abb. 162a) und *C. caroliniana* (Abb. 163a) waren ebenfalls alle Epidermiszellen markiert. An den periklinen Innenseiten, zum Mesophyll hin, fluoreszierten sie dabei deutlich stärker als an den antiklinen Seiten der Zellen. An der periklinen Außenseite war die Fluoreszenz schwächer oder fehlte ganz.

3.3.1.1.3 FITC-Fluoreszenz in Epidermis- und Mesophyllzellen von Blättern

Bei einigen der untersuchten Pflanzenarten beschränkte sich die FITC-Fluoreszenz nicht nur auf die Zellen der Epidermis, sondern war auch in den Mesophyllzellen direkt darunter zu beobachten. In den äquifazialen Fiederblättchen von *M. spicatum* trat eine FITC-Fluoreszenz sowohl in den Epidermiszellen, als auch in den darunter liegenden Mesophyllzellen auf (Abb. 164a-c, 267). Auch in dem kleinen zentralen Leitbündel zeigten einige Zellen eine eindeutige Markierung. In den Flachblätter von *P. perfoliatus* und *P. lucens* konnte in den intercostalen Bereichen eine ausgeprägte FITC-Fluoreszenz in den Mesophyllzellen. (Abb. 165a-c, 166a-c) beobachtet werden. Während sie sich bei *P. perfoliatus* allein auf die Mesophyllzellen des Blattes beschränkte, zeigt sie sich bei *P. lucens* häufig auch an den periklinen Innenseiten der unteren Epidermiszellen.

Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der PM H^+ -ATPase in Blättern (a: Versuch, b: Differenzialinterferenzkontrast, c: Kontrolle)

Tafel 35: Abb. 154a-c: *E. canadensis*. Abb. 155a-c: *E. nuttallii*.

Tafel 36: Abb. 156a-c: *S. aloides*. Abb. 157a-c: *V. spiralis*.

Tafel 37: Abb. 158a-c: *P. oceanica*. Abb. 159a-c: *C. demersum*.

Tafel 38: Abb. 160a-c: Unterwasserblatt v. *P. natans*., Abb. 161a-c: *P. natans*, Schwimmblatt

Tafel 39: Abb. 162a-c: *R. penicillatus*. Abb. 163a-c: *C. caroliniana*.

Tafel 40: Abb. 164a-c: *M. spicatum*. Abb. 165a-c: *P. perfoliatus*

Tafel 41: Abb. 166a-c: *P. lucens* (Fixierung im Sommer). Abb. 167: *P. lucens* (Fixierung im Frühjahr).

Abb. 168: *P. lucens* (Fixierung im Sommer). Abb. 169: *P. lucens* (Fixierung im Herbst)

Tafel 42: Abb. 170a-c: *M. verticillatum*. Abb. 171a-c: *M. aquaticum*

Tafel 43: Abb. 172a-c: *H. vulgaris*. Abb. 173a-c: *C. hamulata*, Unterwasserblatt

Abkürzungen der Tafeln 35-43:

Aerenchym (Ae); Epidermis (Ed); Epidermiszelle (Ez); Lakune (L); Leitbündel (Lb); Mesophyll (Me); Obere Epidermis (O Ed); Plaisadenparenchym (Pal); Phloem (Ph); Schwammparenchym (Sw); Untere Epidermis (U Ed); Xylem (X):

Tafel 35

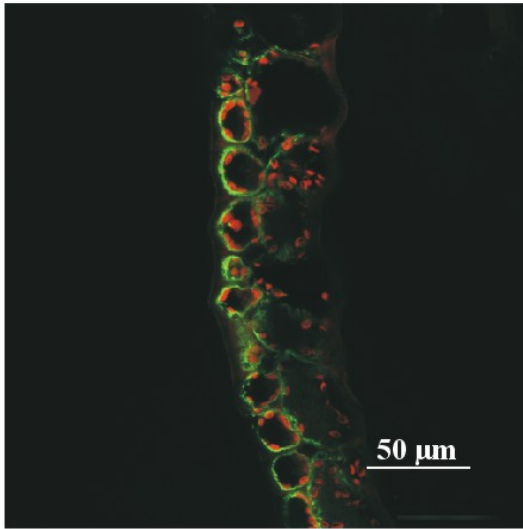


Abb. 154a

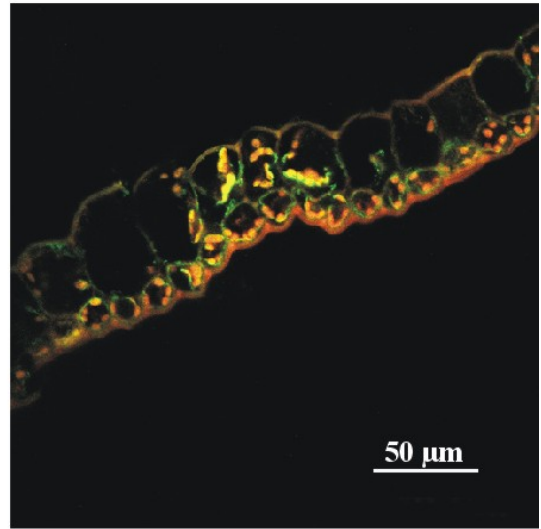


Abb. 155a

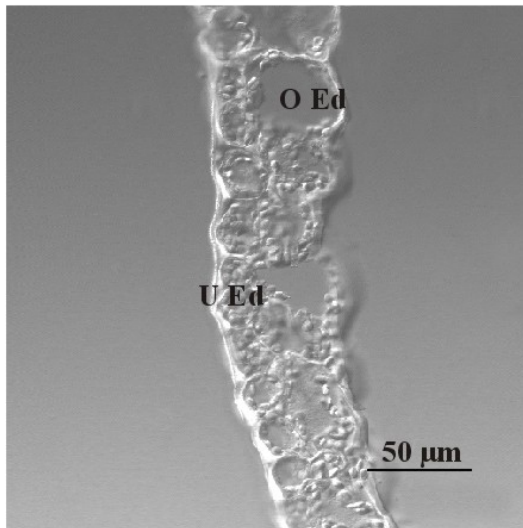


Abb. 154b

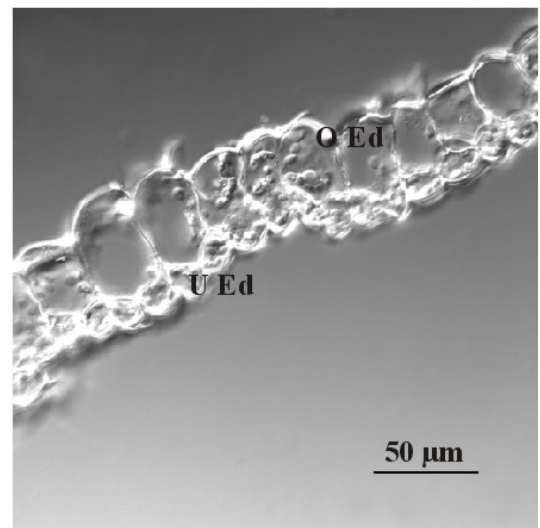


Abb. 155b

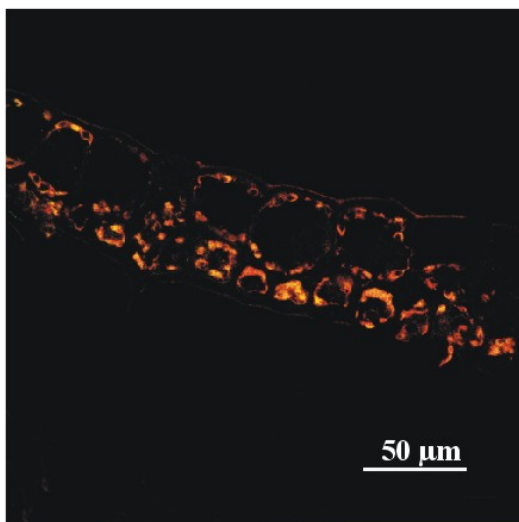


Abb. 154c

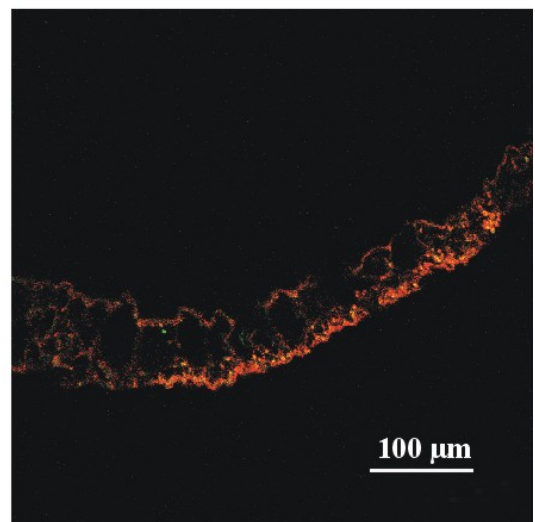


Abb. 155c

Tafel 36

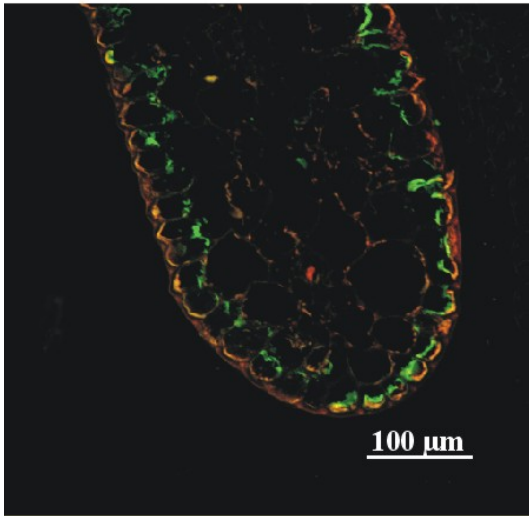


Abb. 156a

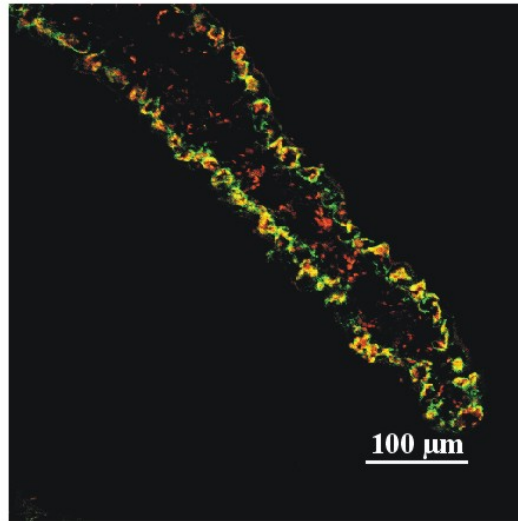


Abb. 157a

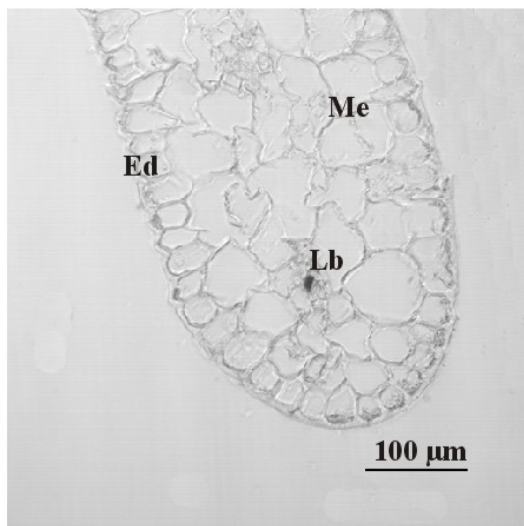


Abb. 156b

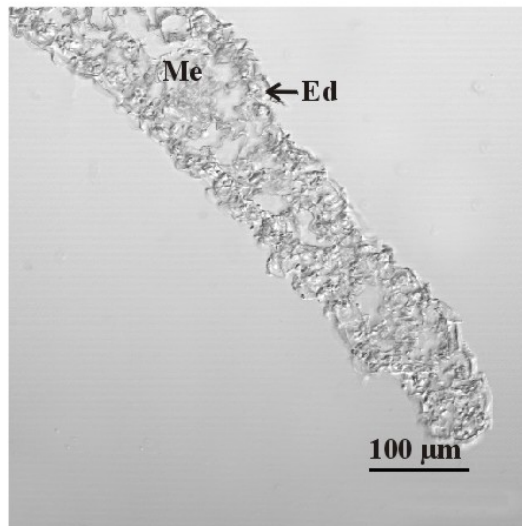


Abb. 157b

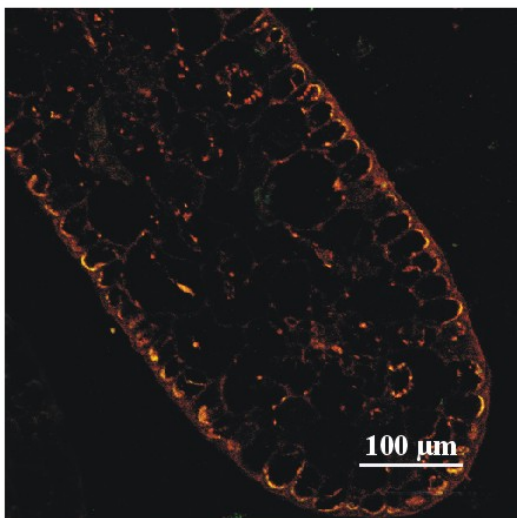


Abb. 156c

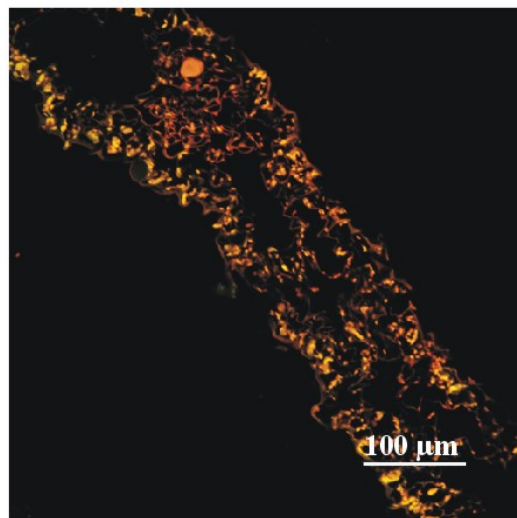


Abb. 157c

Tafel 37

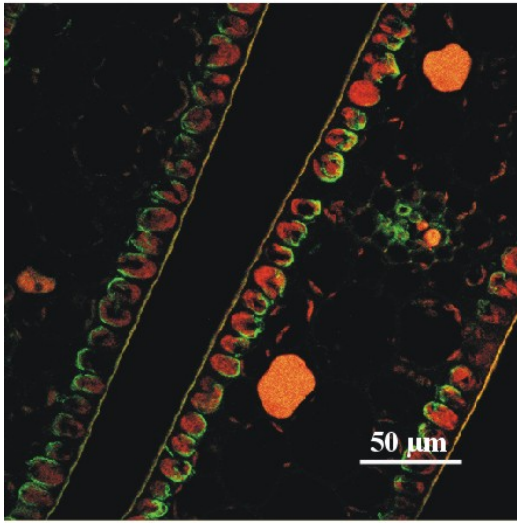


Abb. 158a

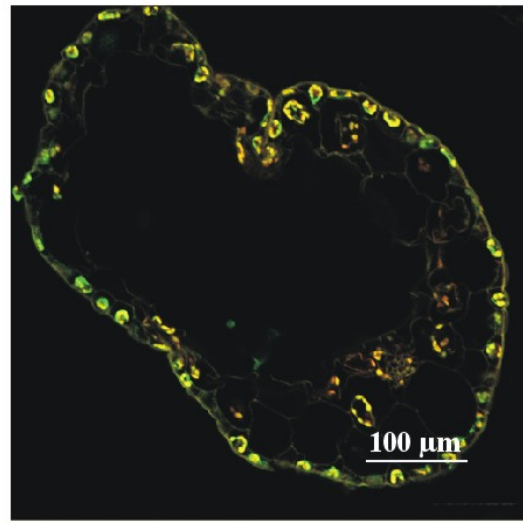


Abb. 159a

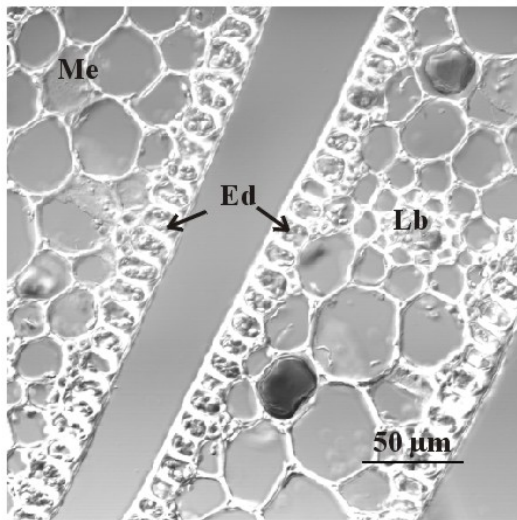


Abb. 158b

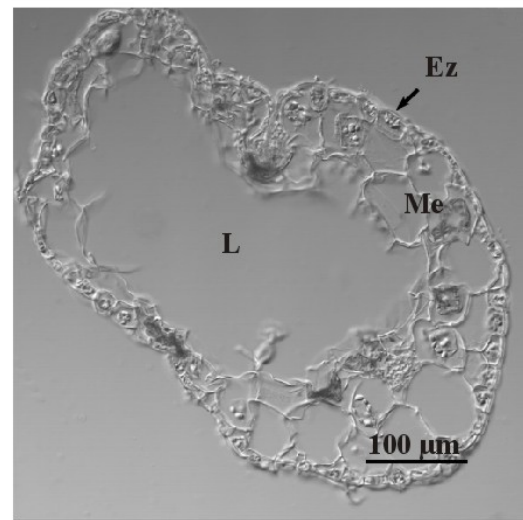


Abb. 159b

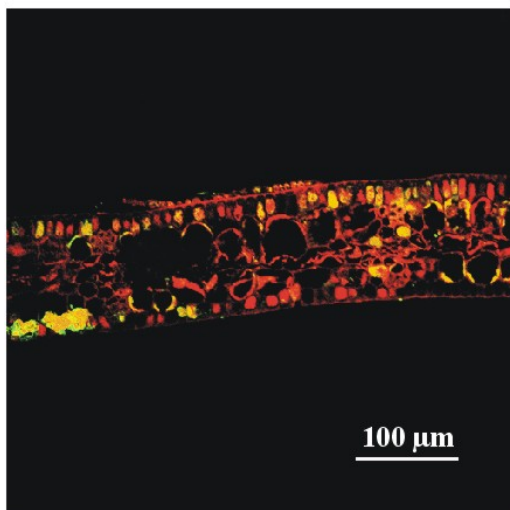


Abb. 158c

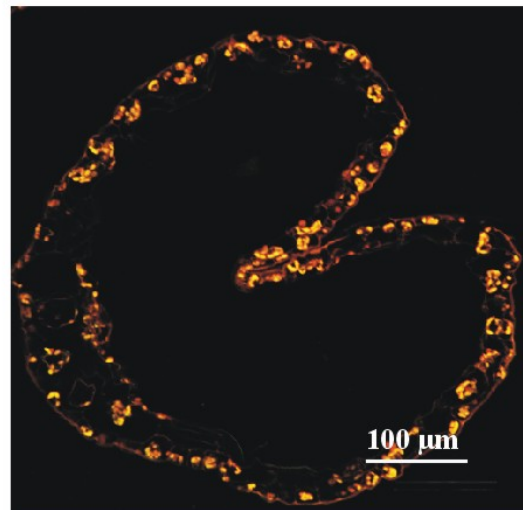


Abb. 159c

Tafel 38

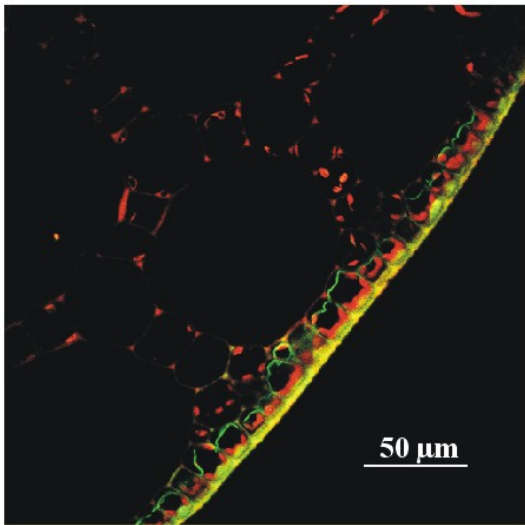


Abb. 160a

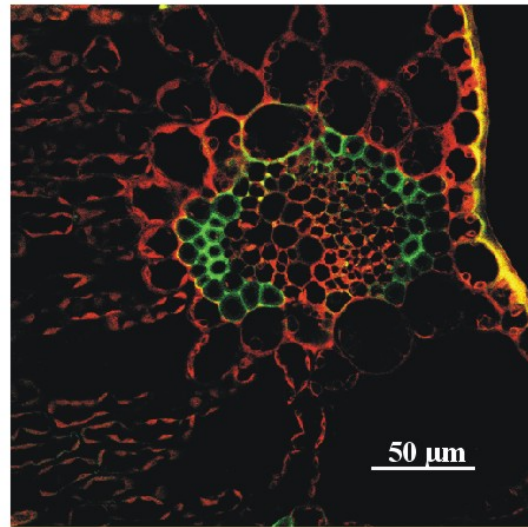


Abb. 161a

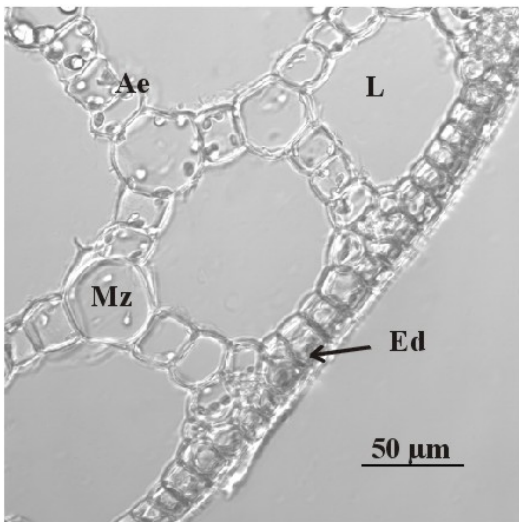


Abb. 160b

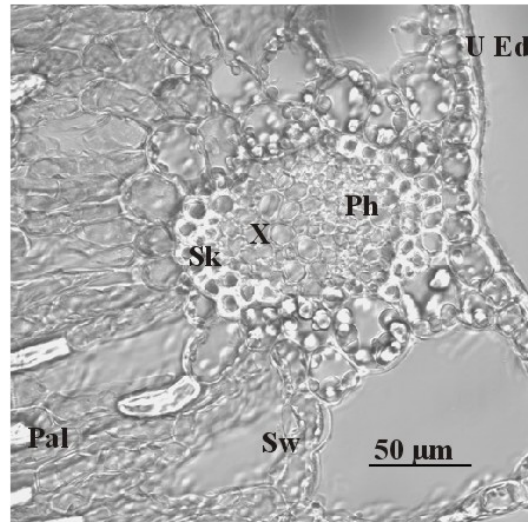


Abb. 161b

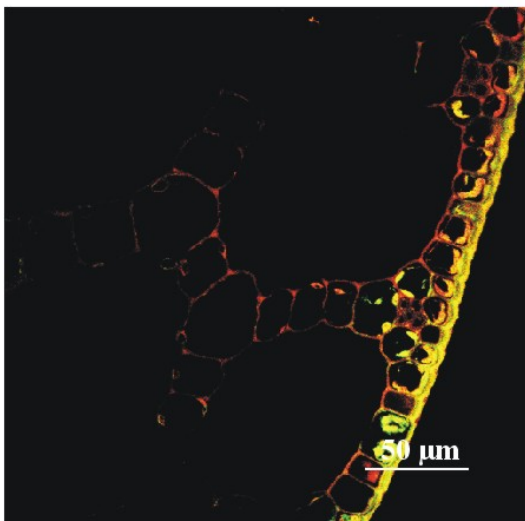


Abb. 160c

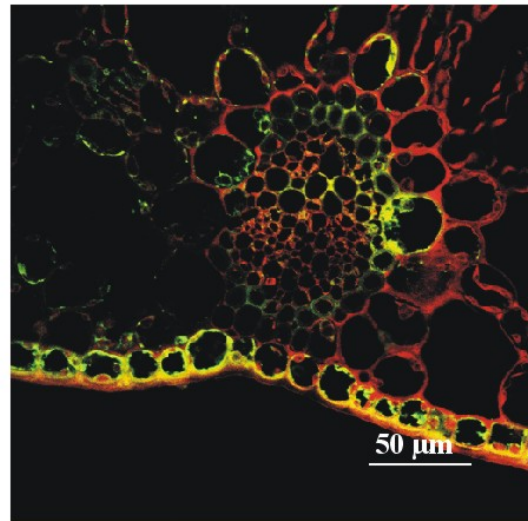


Abb. 161c

Tafel 39

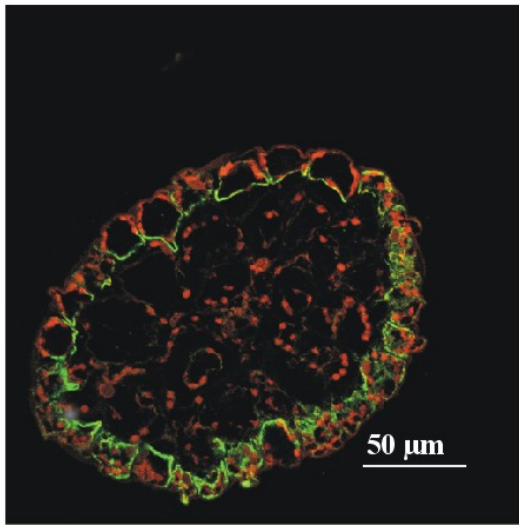


Abb. 162a

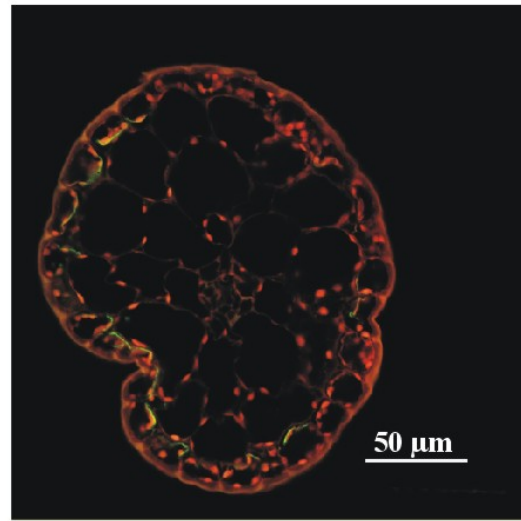


Abb. 163a

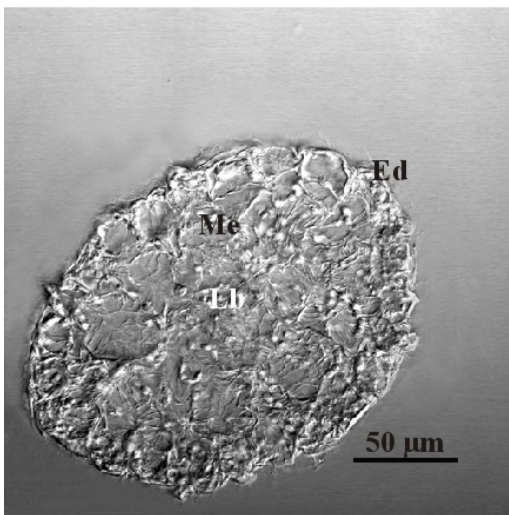


Abb. 162b

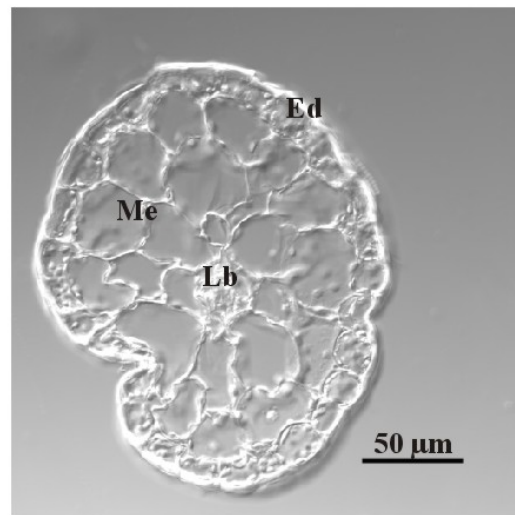


Abb. 163b

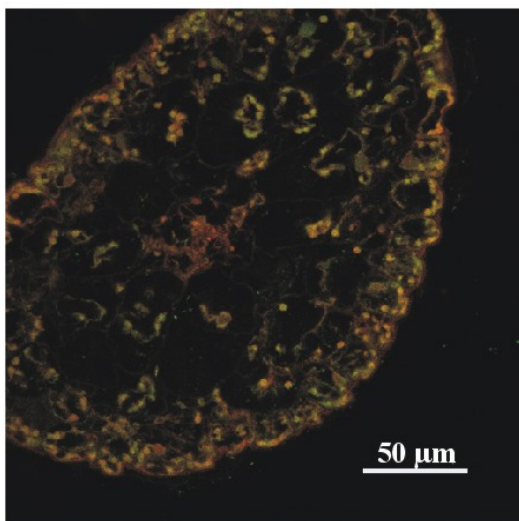


Abb. 162c

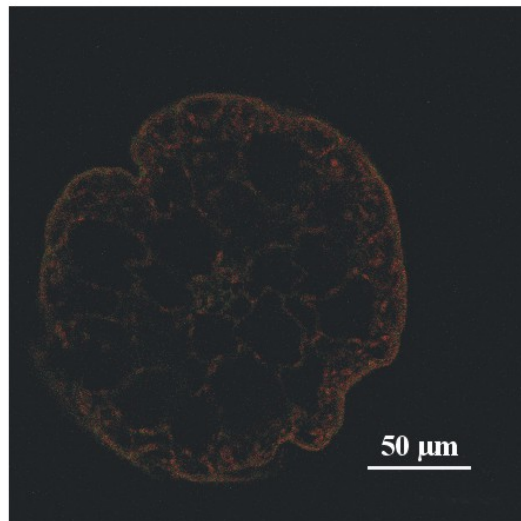


Abb. 163c

Tafel 40

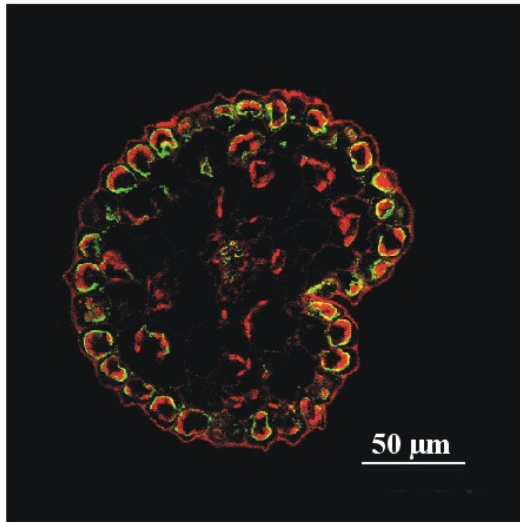


Abb. 164a

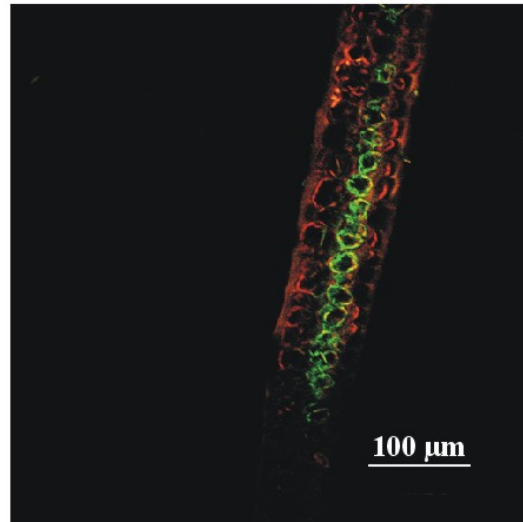


Abb. 165a

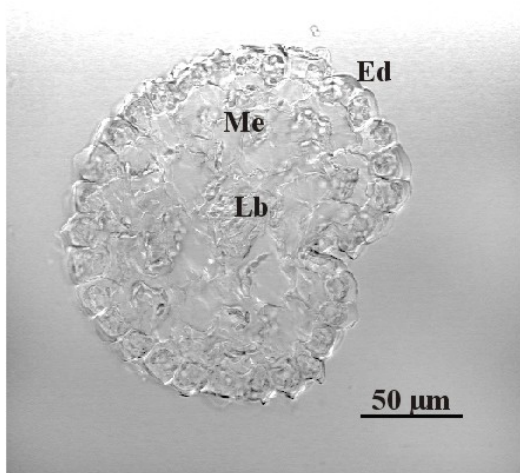


Abb. 164b

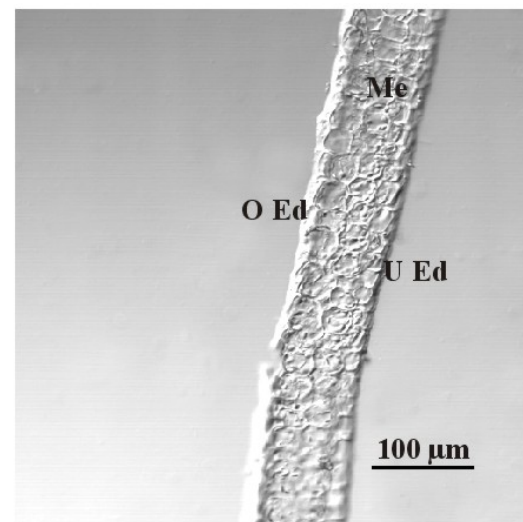


Abb. 165b

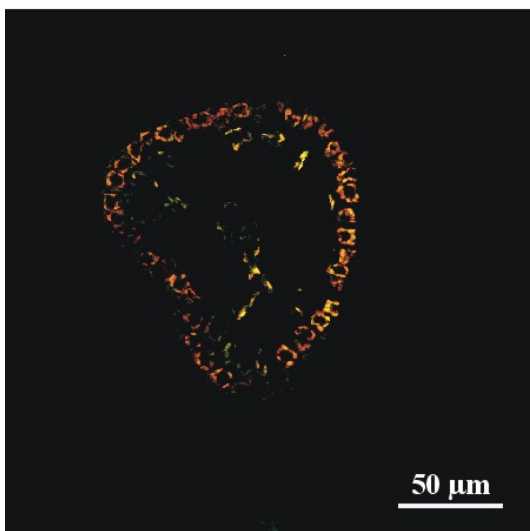


Abb. 164c

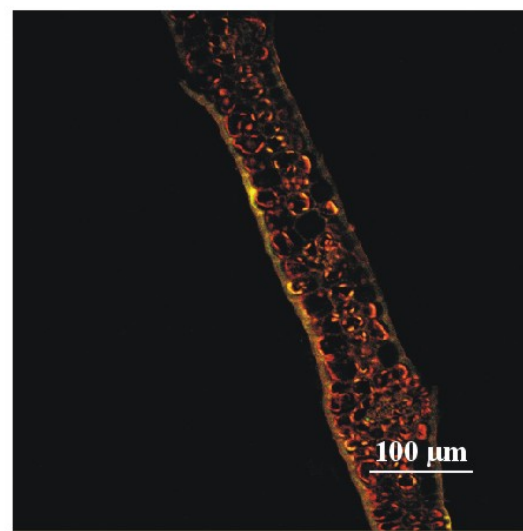


Abb. 165c

Tafel 41

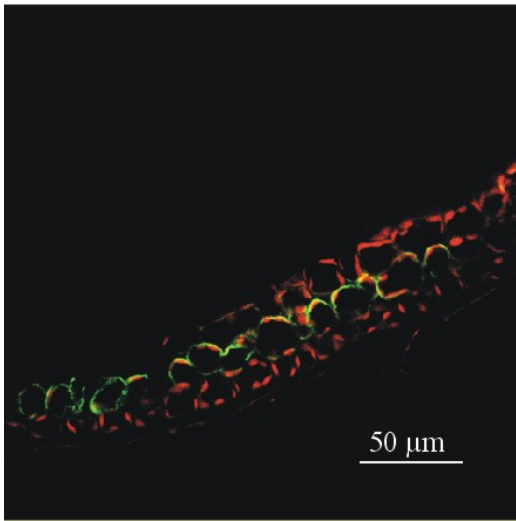


Abb. 166a

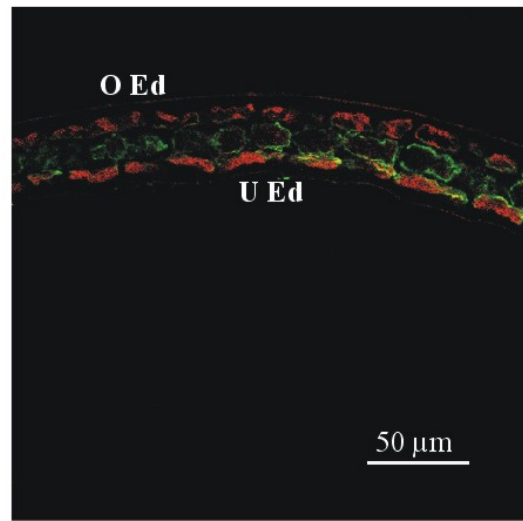


Abb. 167

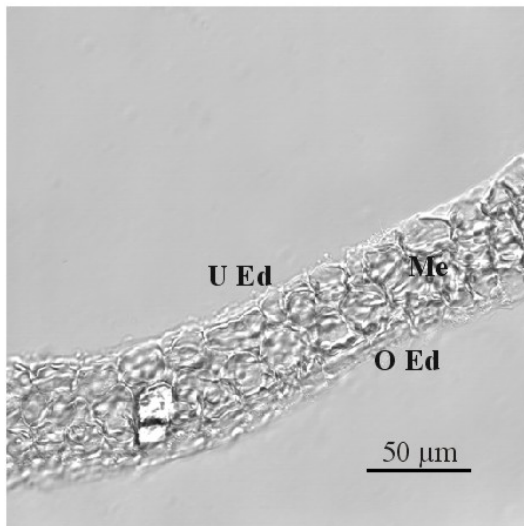


Abb. 166b

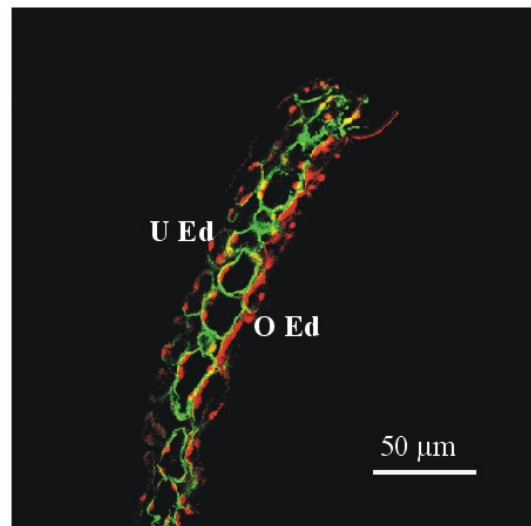


Abb. 168

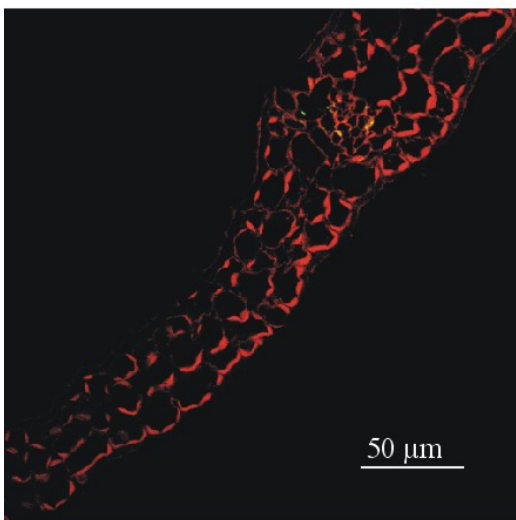


Abb. 166c

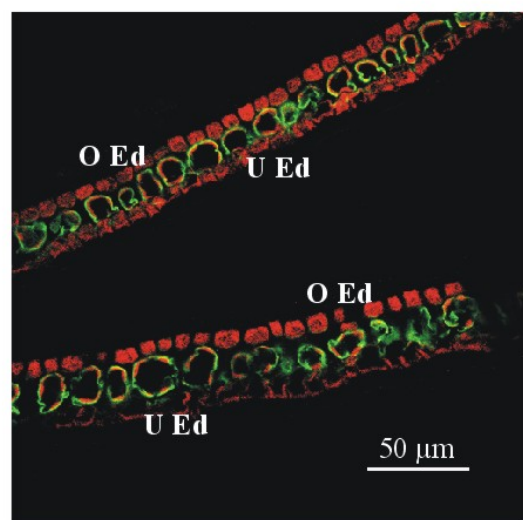


Abb. 169

Tafel 42

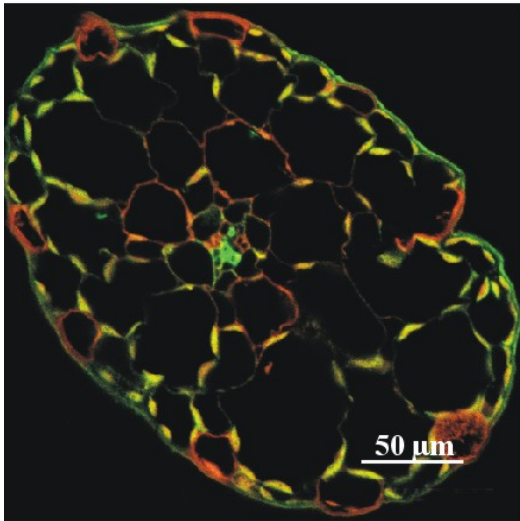


Abb. 170a

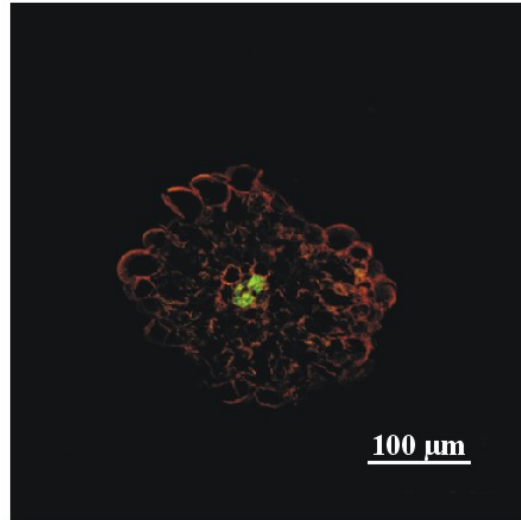


Abb. 171a

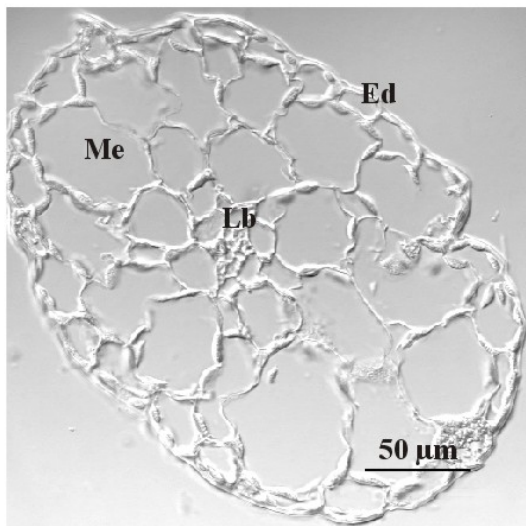


Abb. 170b

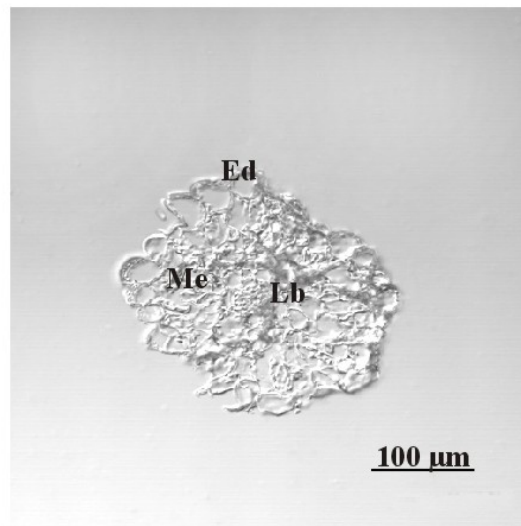


Abb. 171b

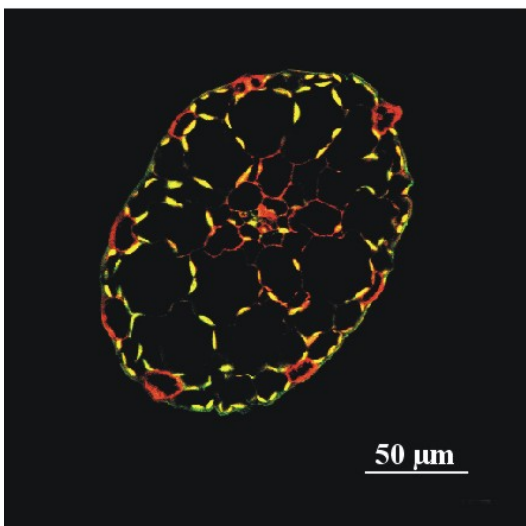


Abb. 170c

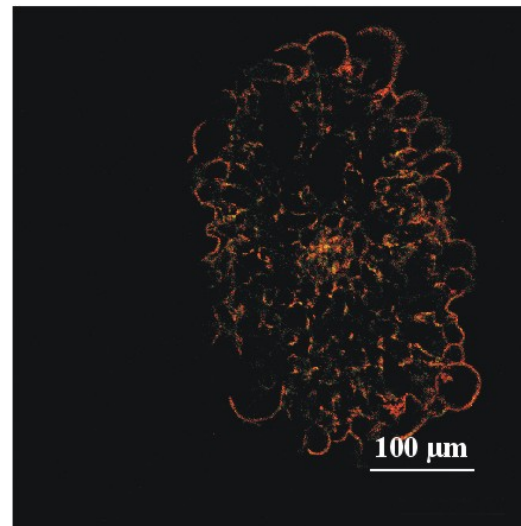


Abb. 171c

Tafel 43

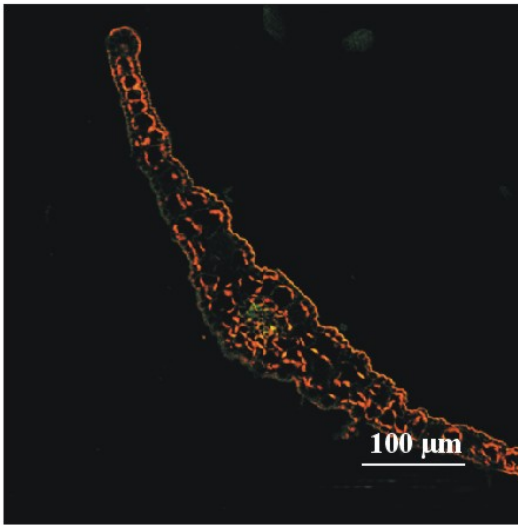


Abb. 172a

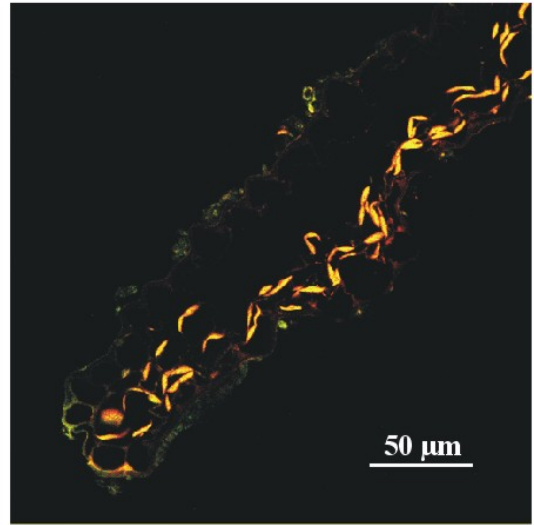


Abb. 173a

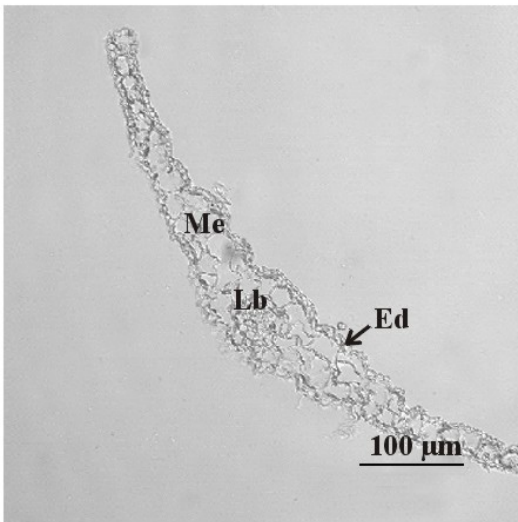


Abb. 172b

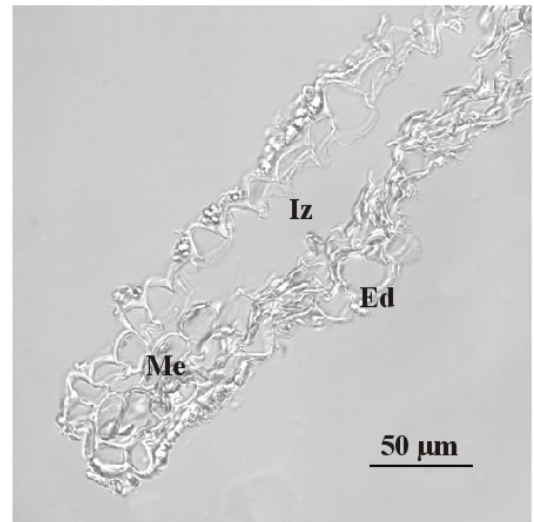


Abb. 173b

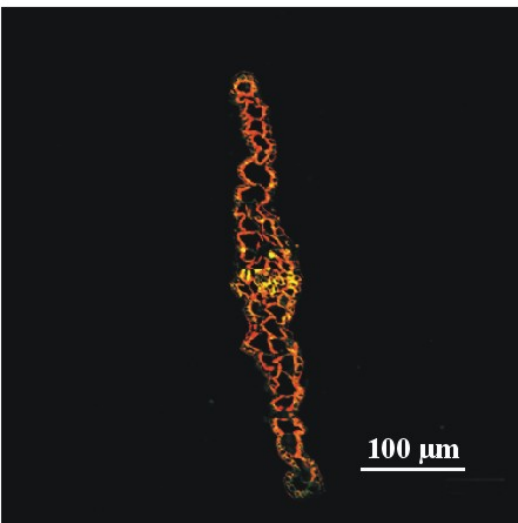


Abb. 172c

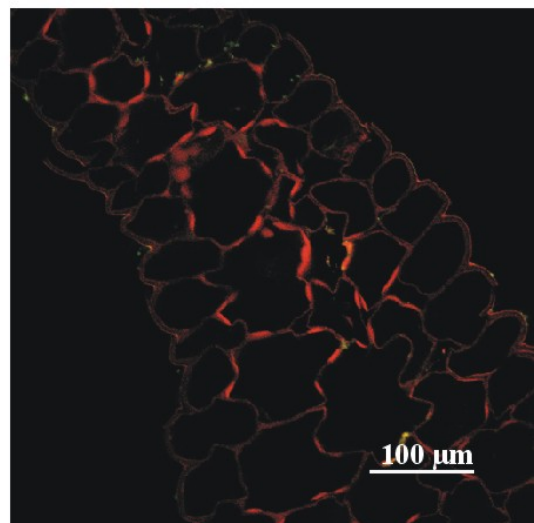


Abb. 173c

Gelegentlich blieb diese Markierung der unteren Epidermiszellen auch aus. Eine Abhängigkeit dieser PM-H⁺-ATPase Lokalisation von der Jahreszeit konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 166a, 167-169). In den costalen Bereichen der Blätter beider Arten zeigte das dort mehrschichtige Mesophyll in allen Zellen eine FITC-Markierung auf. Sowohl in den Haupt- als auch in den Neben-Leitbündeln war jedoch keine Fluoreszenz zu finden.

3.3.1.1.4 Lokalisation der FITC-Fluoreszenz in den Leitbündeln von Blättern

Im Gegensatz zu *M. spicatum* konnten in den anderen beiden Tausendblattarten *M. verticillatum* und *M. aquaticum* keine Markierungen in der Epidermis oder im Mesophyll beobachtet werden. Eine eindeutige FITC-Fluoreszenz war lediglich in den Zellen der kleinen zentralen Leitbündel zu finden (Abb. 170a-c, 171a-c). Welche Zellen genau markiert wurden, konnte mit dieser Methode nicht festgestellt werden (vgl. 3.3.2.2). Auch in den Unterwasserblättern von *H. vulgaris* fand sich keine Fluoreszenz in den Epidermis- und Mesophyllzellen, die auf einer FITC-Markierung beruhten (Abb. 172a-c). Hier wurde eine geringe Markierung in dem kleinen zentralen Leitbündel festgestellt. Die randständigen Leitgewebe zeigten jedoch keine Fluoreszenz.

3.3.1.1.5 Blätter ohne FITC-Fluoreszenz

In vielen Blättern der untersuchten Pflanzen waren keine Markierungen mit dem verwendeten Antikörper gegen die PM-H⁺-ATPase festzustellen. Dazu zählten z.B. die Blätter von *C. hamulata*. Sowohl in den Unterwasserblättern (Abb. 173a-c) als auch in ihren Schwimmblättern konnte keine FITC-Fluoreszenz registriert werden. Auch in den Zellen der zahlreichen Drüsen auf den Schwimmblättern war keine Markierung zu entdecken.

Die feinen Blätter des Wasserschlauchs *Utricularia spec.*, sowie die derberen Blätter von *Najas mariana* und *Isoetes setacea* zeigten ebenfalls keine FITC-Fluoreszenz in den Blattquerschnitten. Das Gleiche galt für die Helophyten *Ludwigia perennis* und *Lobelia dortmanna*. Eine Gesamtübersicht ist unter 3.3.1.1.1 in Tabelle 8 zu finden.

3.3.1.2 Lokalisation der FITC-Fluoreszenz in Stängeln von Hydrophyten

Neben Blättern wurden auch Querschnitte von Stängeln der Wasserpflanzen mit dem Antikörper gegen die PM-H⁺-ATPase inkubiert und auf FITC-Fluoreszenz hin untersucht (siehe 2.4). In vielen Stängeln, wie *E. canadensis*, *E. nuttallii*, *H. vulgaris* und *M. verticillatum* (Abb. 174a,b – 177a,b) fanden sich keine Markierungen, weder in den Epidermis-, noch in den Rindenparenchymzellen sowie in den Zellen der zentralen Leitbündel. Auch bei *M. aquaticum*, *C. caroliniana*, *P. perfoliatus*, *C. demersum* und *C. hamulata* war keine FITC-Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 178a–182a). In anderen Pflanzenstängeln dagegen, wie z.B. bei *R. penicillatus*, *P. natans*, *P. lucens* und *M. spicatum* zeigten sich dagegen in den Leitbündeln der Stängel eindeutige FITC-Markierungen (Abb. 183a–186a). Welche Zellen dort jedoch markiert wurden, konnte nicht erkannt werden. In den Epidermis- und Rindenparenchymzellen waren jedoch auch hier keine Markierungen zu beobachten.

3.3.1.3 Lokalisation der FITC-Fluoreszenz in den Wurzeln von Hydrophyten

Auch in den meisten Wurzeln von Wasserpflanzen waren keine Markierungen einer PM-H⁺-ATPase mit dem verwendeten Antikörper zu finden. In den Wurzeln von *C. caroliniana*, *P. oceanica*, *V. spiralis*, *E. nuttallii*, *P. natans* und *S. aloides* konnte keine FITC-Fluoreszenz (Abb. 187a–192a) entdeckt werden, weder in den Zellen der Rhizodermis, der Exodermis, der Hypodermis noch in den Rindenparenchymzellen. Auch im Zentralzylinder waren keine Markierung zu beobachten. Die deutlich erkennbaren Fluoreszenzen im Randbereich des Wurzelquerschnittes und in den Leitbündeln von *P. oceanica* konnten auch in der Kontrolle entdeckt werden, so dass es sich hier um Primärfluoreszenzen handelte und nicht um eine FITC-Fluoreszenz (188b).

Bei einigen Pflanzen konnten in den Zentralzylindern der Wurzeln FITC-Markierungen gefunden werden. Dies war z.B. bei *M. spicatum* und *E. canadensis* der Fall (Abb. 193a, 194a), ebenso wie bei *P. lucens*, *P. perfoliatus* und *R. penicillatus* (Abb. 193a–197a). Auch bei diesen Pflanzen fanden sich jedoch keine FITC-Markierungen in den Rhizodermis-, Exodermis-, Hypodermis und Rindenparenchymzellen.

Bei Untersuchungen der Wurzelspitzen von *R. penicillatus* zeigten sich FITC-Markierungen in den meristematischen Zellen (Abb. 198, 199).

Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der PM-H⁺-ATPase in Stängeln und Wurzeln (a: Versuch. b: Kontrolle)

Tafel 44: Abb. 174a-b: Stängel v. *E. canadensis*. Abb. 175a-b: Stängel v. *E. nuttallii*. Abb. 176a-b: Stängel v. *H. vulgaris*.

Tafel 45: Abb. 177a-b: Stängel v. *M. verticillatum*. Abb. 178a-b: Stängel v. *M. aquaticum*. Abb. 179a-b: Stängel v. *C. caroliniana*.

Tafel 46: Abb. 180a-b: Stängel v. *P. perfoliatus*. Abb. 181a-b: Stängel v. *C. demersum*. Abb. 182a-b: Stängel v. *. hamulata*.

Tafel 47: Abb. 183a-b: Stängel v. *R. penicillatus*. Abb. 184a-b: Zentralzylinder im Stängel v. *P. natans*. Abb. 185a-b: Zentralzylinder im Stängel v. *P. lucens*.

Tafel 48: Abb. 186a-b: Zentralzylinder im Stängel v. *M. spicatum*. Abb. 187a-b: Wurzel v. *C. caroliniana*. Abb. 188a-b: Äußerer Cortex der Wurzel v. *P. oceanica*.

Tafel 49: Abb. 189a-b: Wurzel v. *V. spiralis*. Abb. 190a-b: Wurzel v. *E. nuttallii*. Abb. 191a-b: Wurzel v. *P. natans*.

Tafel 50: Abb. 192a-b: Wurzel v. *S. aloides*. Abb. 193a-b: Wurzel v. *M. spicatum*. Abb. 194a-b: Wurzel v. *E. canadensis*

Tafel 51: Abb. 195a-b: Wurzel v. *P. lucens*. Abb. 196a-b: Wurzel v. *P. perfoliatus*. Abb. 197a-b: Wurzel v. *R. penicillatus*

Tafel 52: Abb. 198: Randbereich der Wurzelspitze v. *R. penicillatus*. Abb. 199: Innerer Bereich der Wurzelspitze v. *R. penicillatus*

Akkürzungen der Tafeln 44-52:

Aerenchym (Ae); Cuticula (Cu); Epidermis (Ed); Endodermis (En); Exodermis (Ex); Interzellulare (Ic); Idioblast (Id); Kambium (K); Lakune (L); Markhöhle (Mh); Phloem (Ph); Rindenparenchym (Rp); Rhizodermis (Rz/Rh) Sklerenchym (Sk); Xylem (X); Zentralzylinder (Zz)

Tafel 44

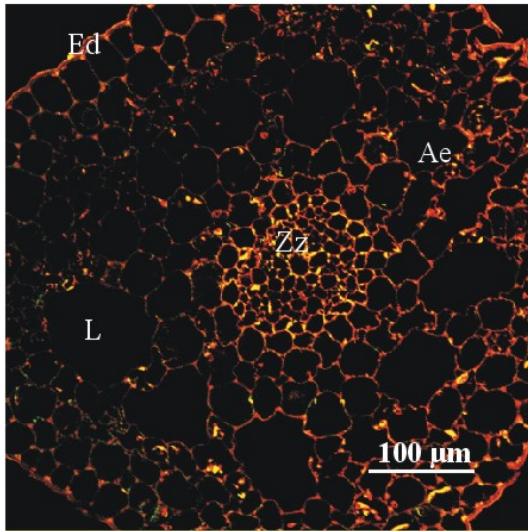


Abb. 174a

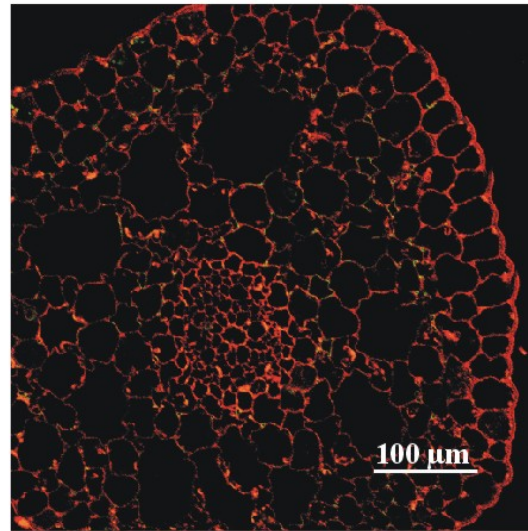


Abb. 174b

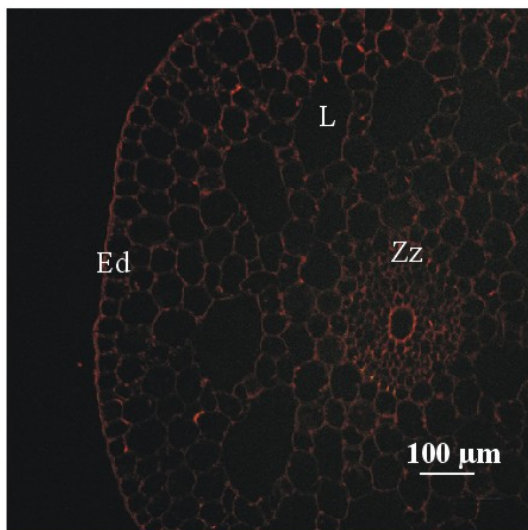


Abb. 175a

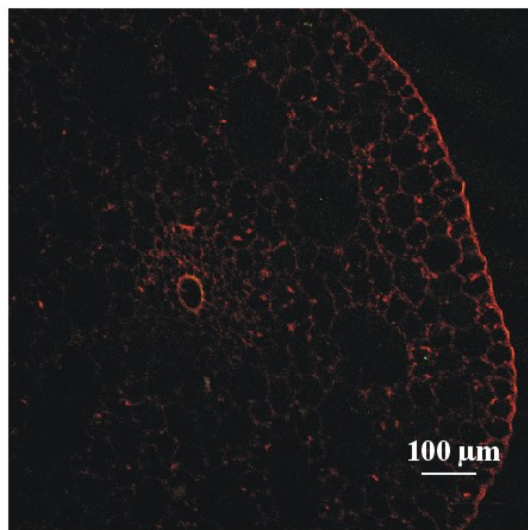


Abb. 175b

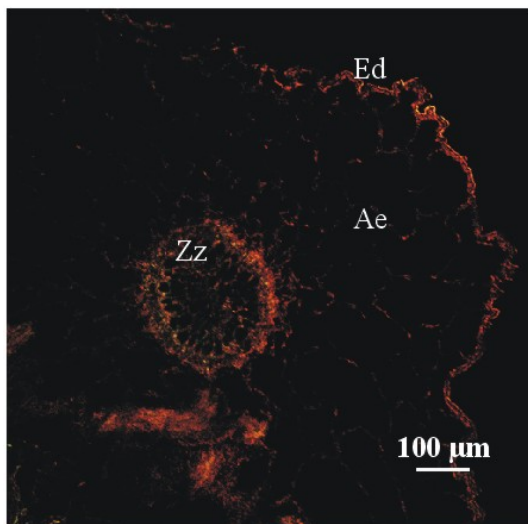


Abb. 176a

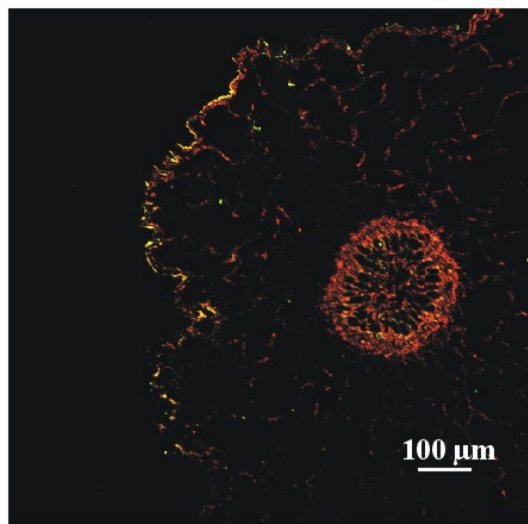


Abb. 176b

Tafel 45

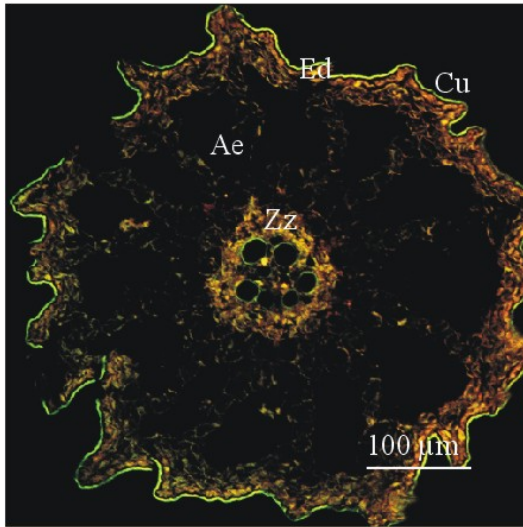


Abb. 177a

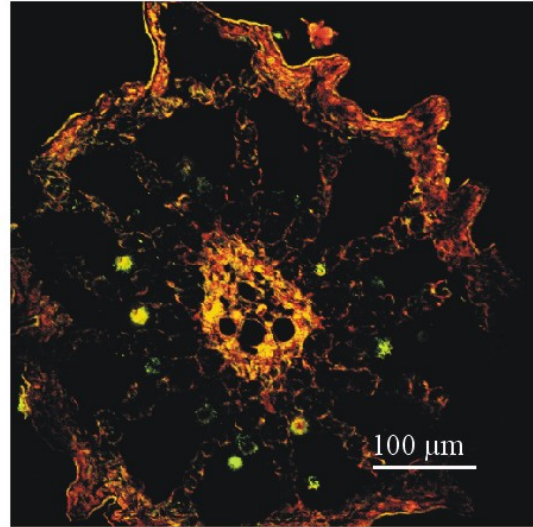


Abb. 177b

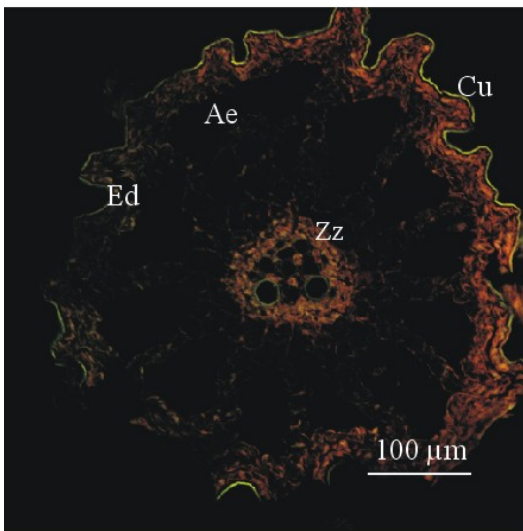


Abb. 178a

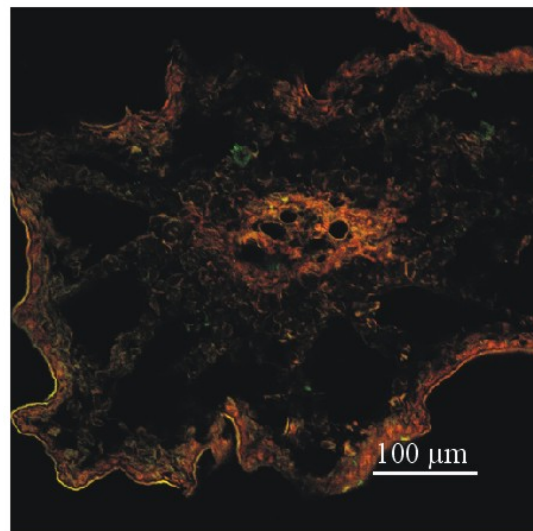


Abb. 178b

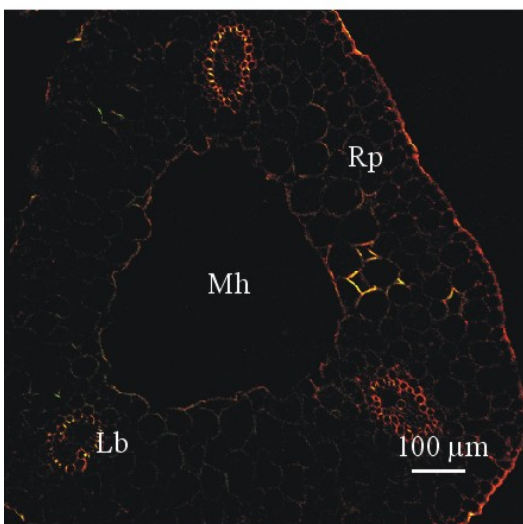


Abb. 179a

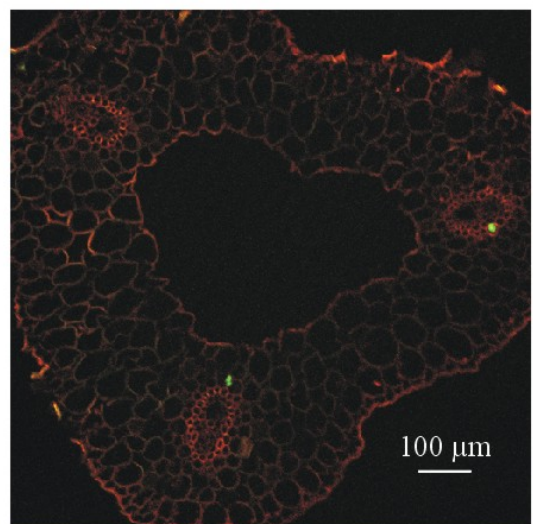


Abb. 179b

Tafel 46

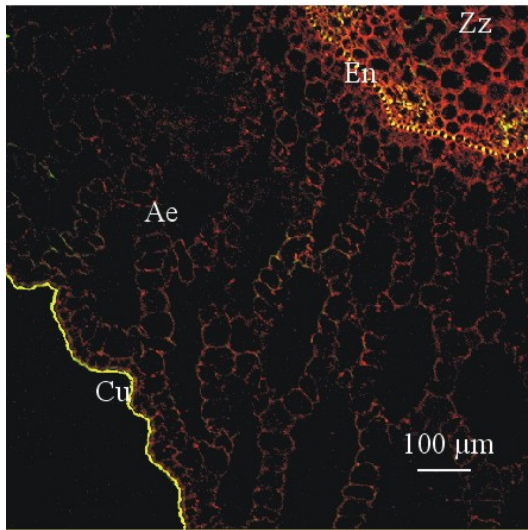


Abb. 180a

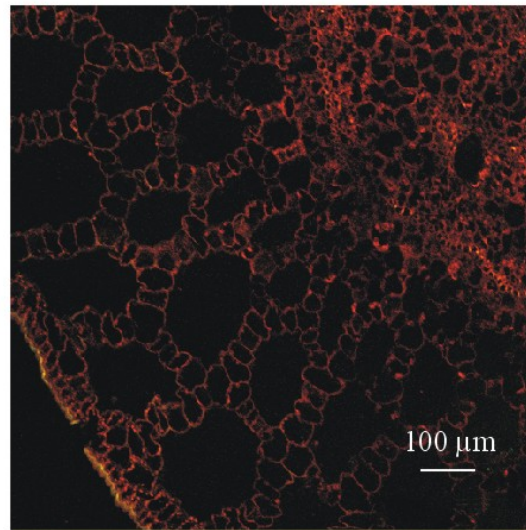


Abb. 180b

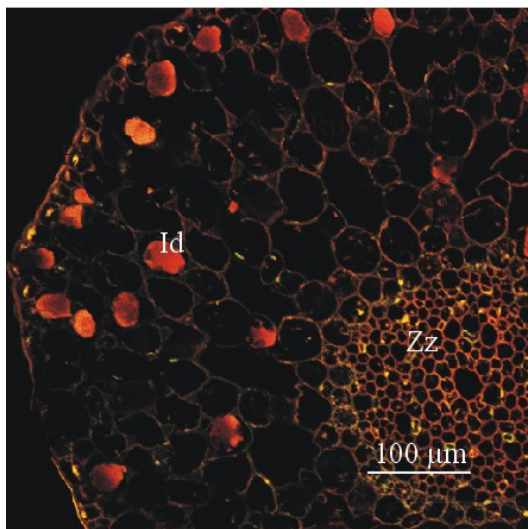


Abb. 181a

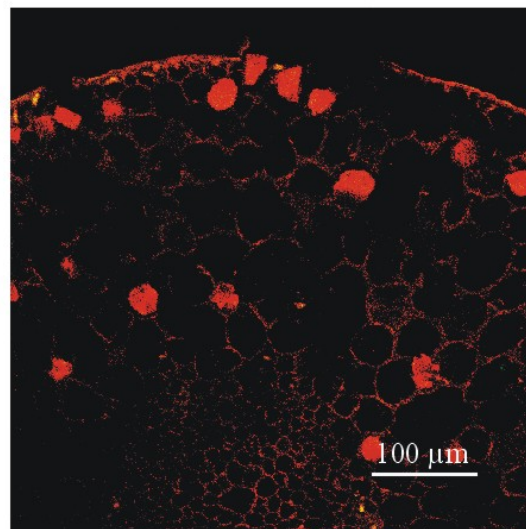


Abb. 181b

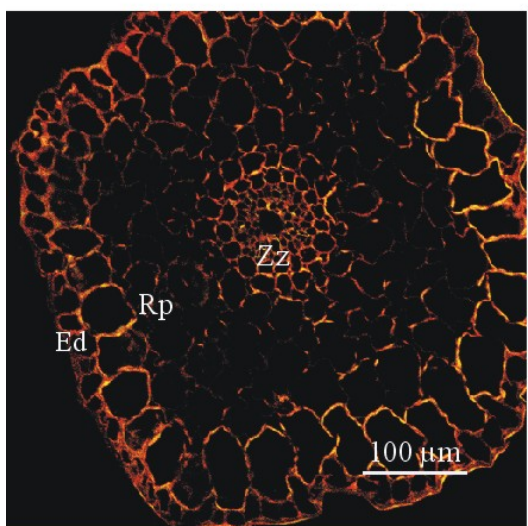


Abb. 182a

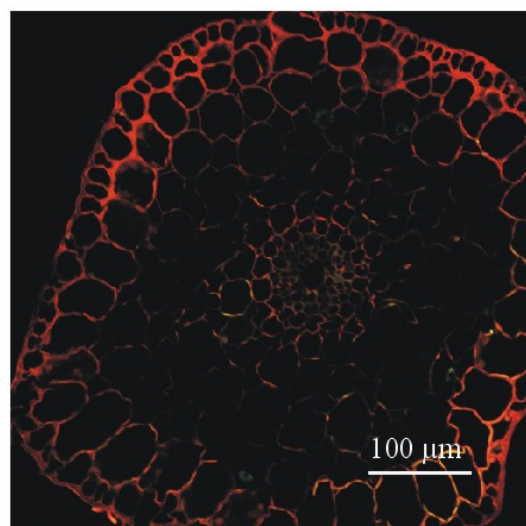


Abb. 182b

Tafel 47

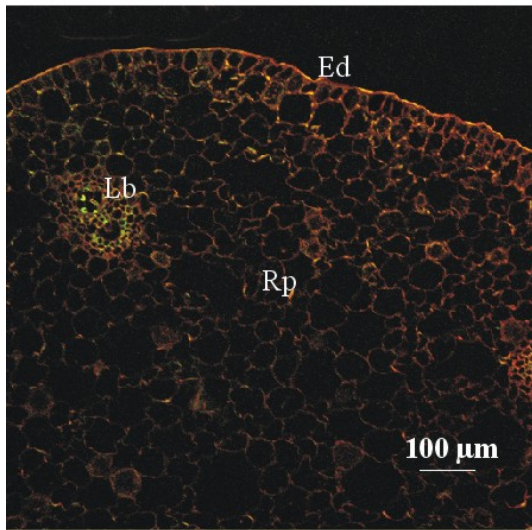


Abb. 183a

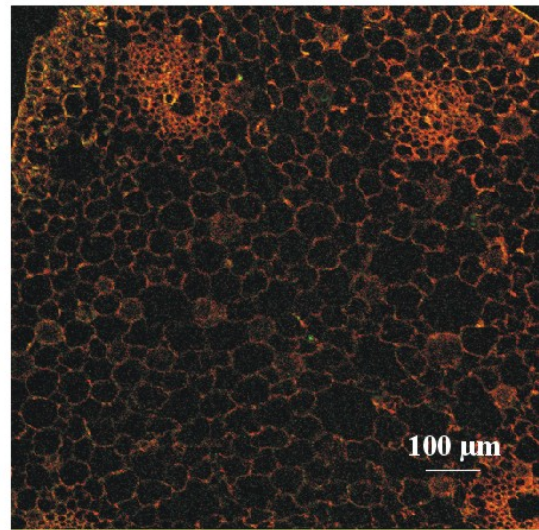


Abb. 183b

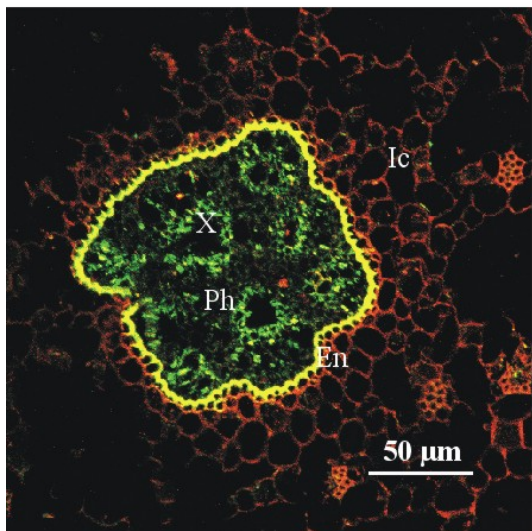


Abb. 184a

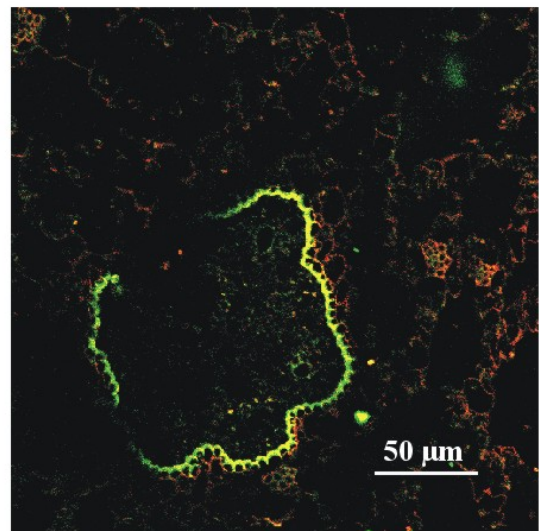


Abb. 184b

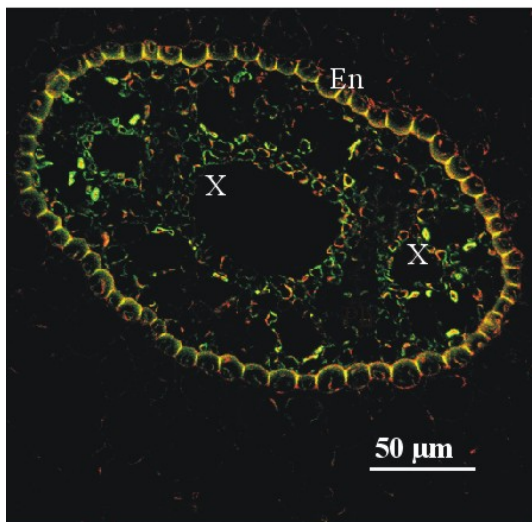


Abb. 185a

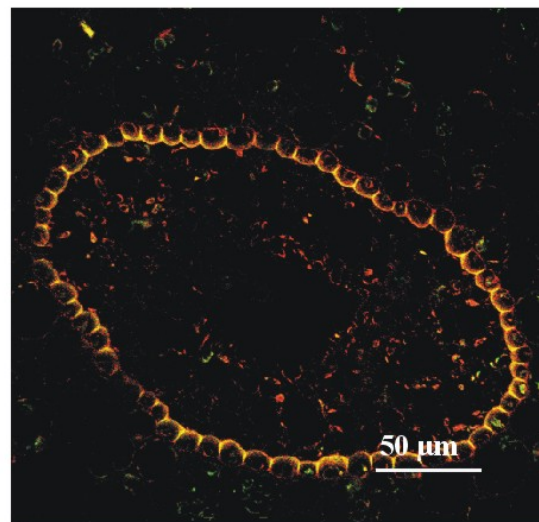


Abb. 185b

Tafel 48

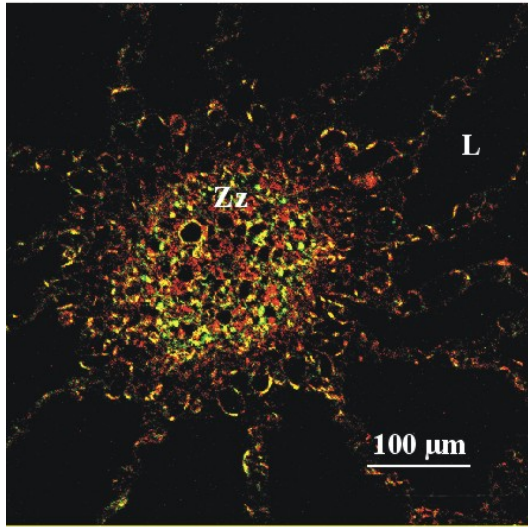


Abb. 186a

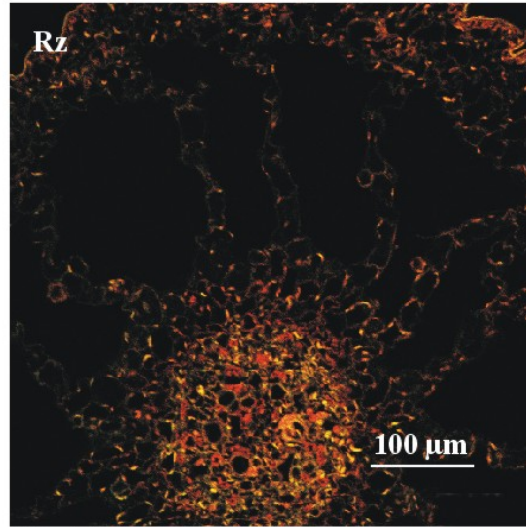


Abb. 186b

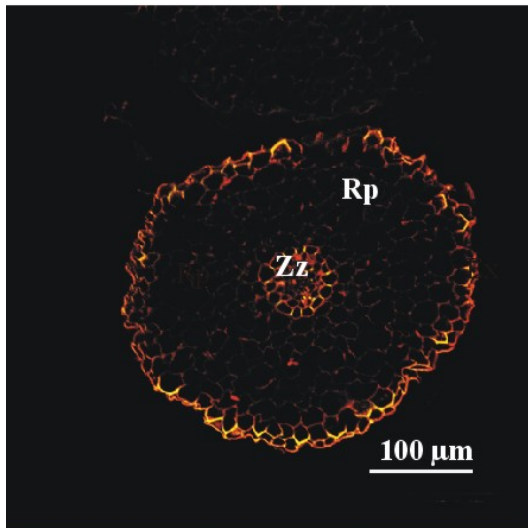


Abb. 187a

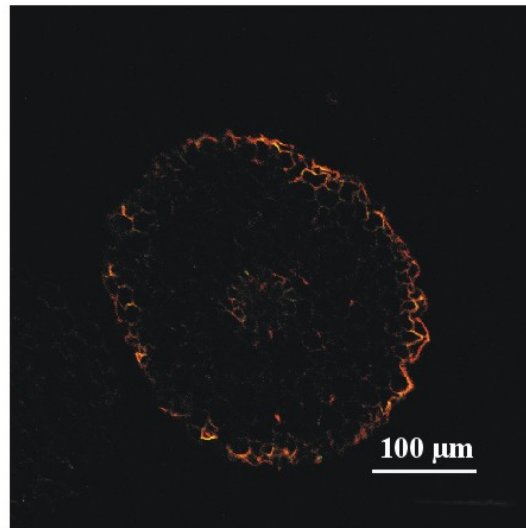


Abb. 187b

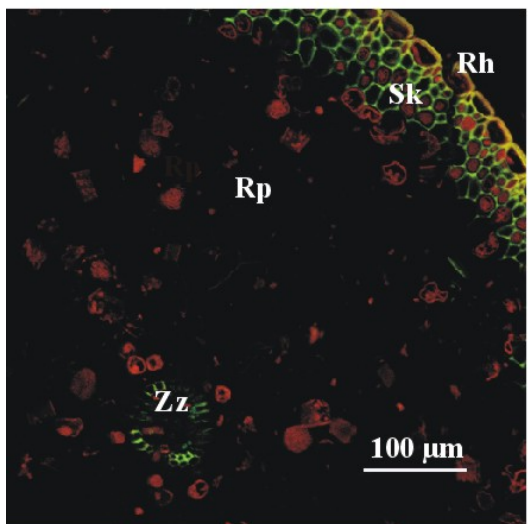


Abb. 188a

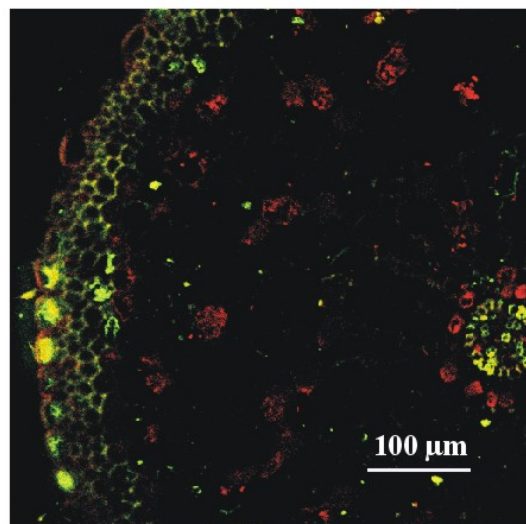


Abb. 188b

Tafel 49

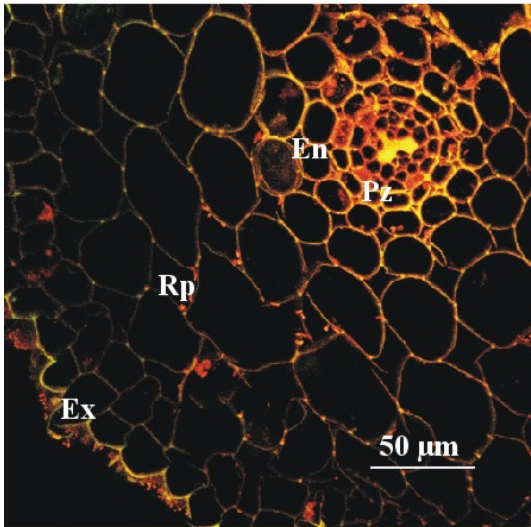


Abb. 189a

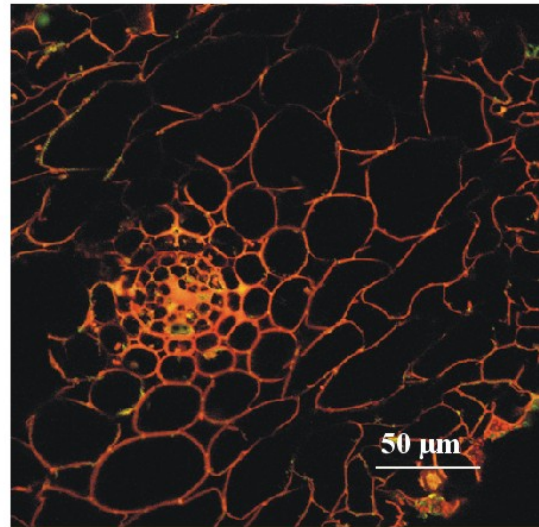


Abb. 189b

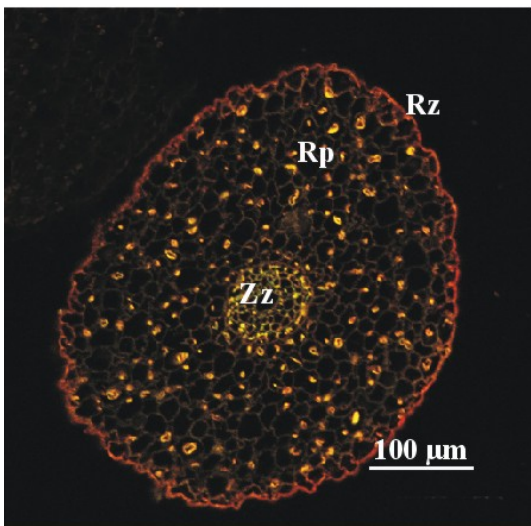


Abb. 190a

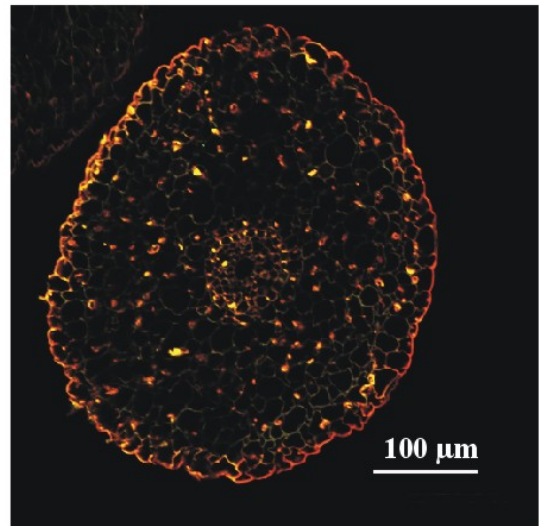


Abb. 190b

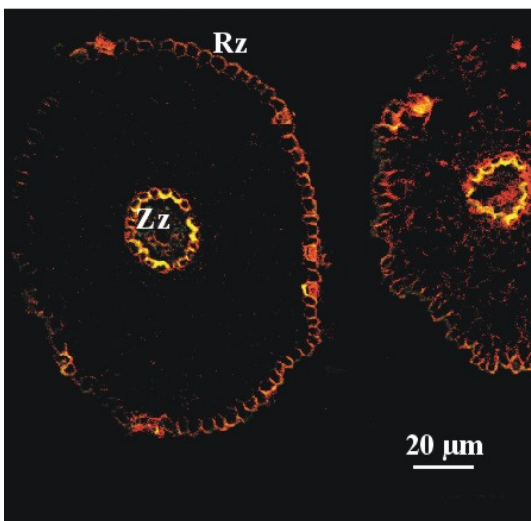


Abb. 191a

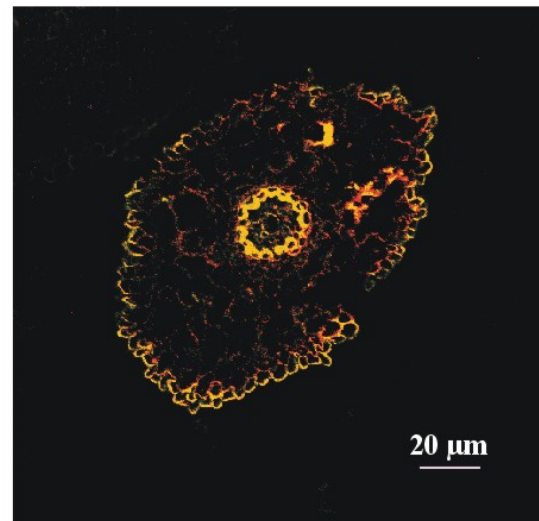


Abb. 191b

Tafel 50

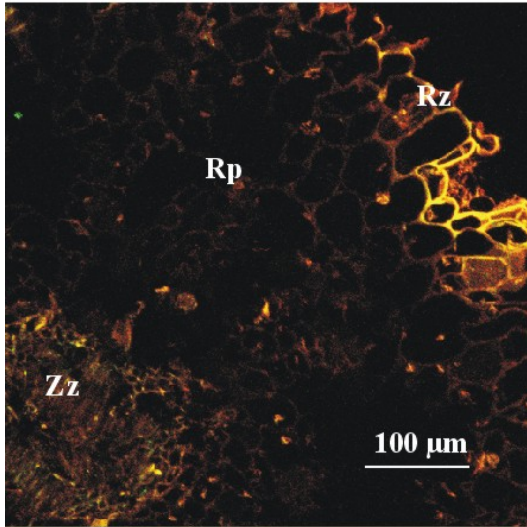


Abb. 192a

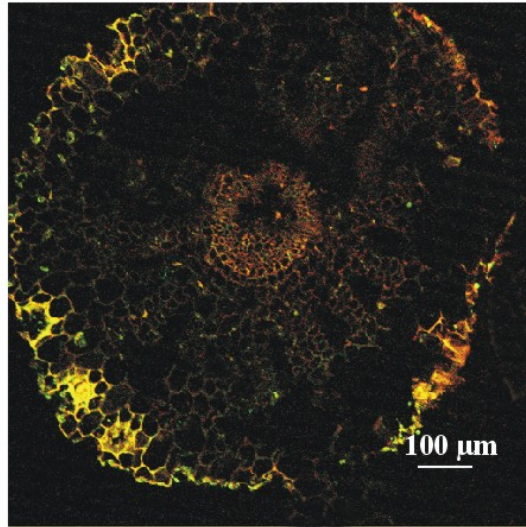


Abb. 192b

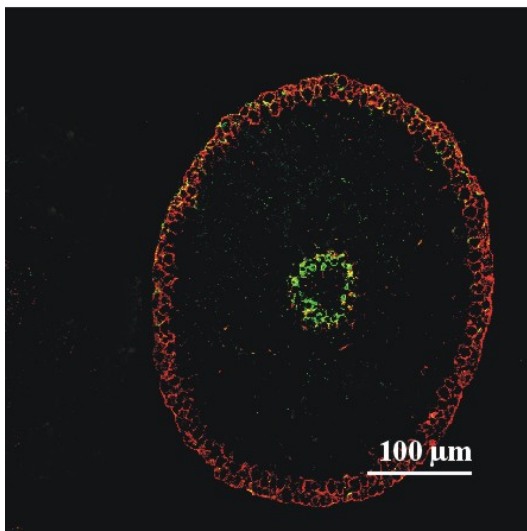


Abb. 193a

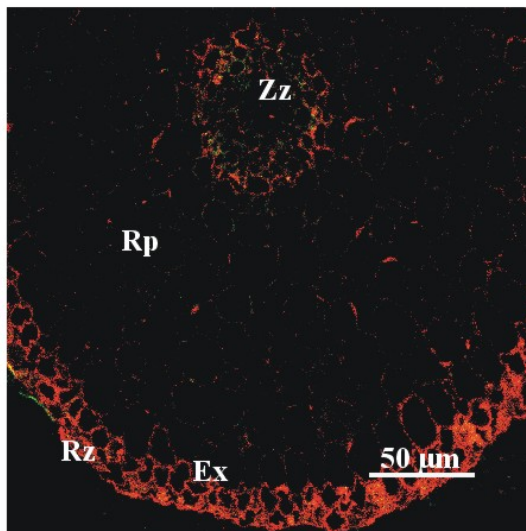


Abb. 193b

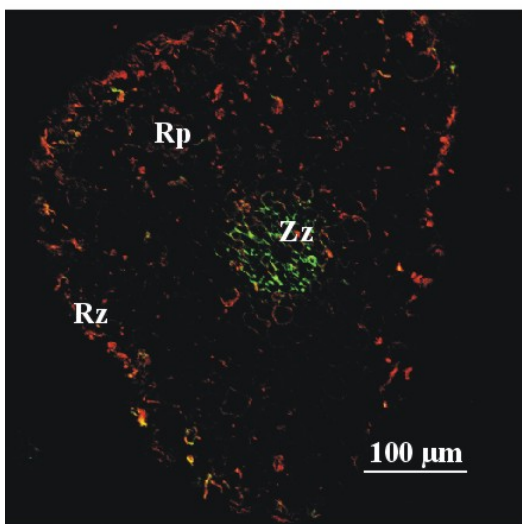


Abb. 194a

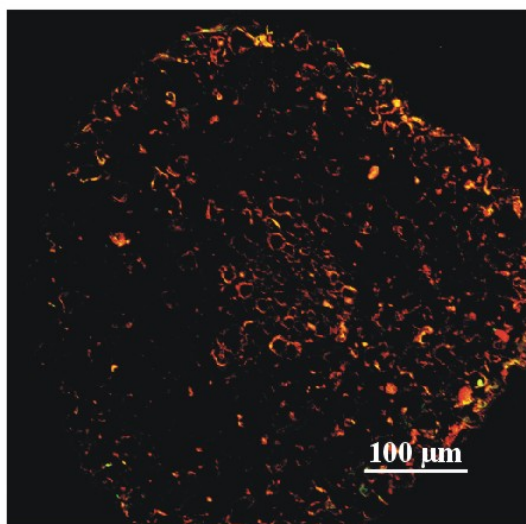


Abb. 194b

Tafel 51

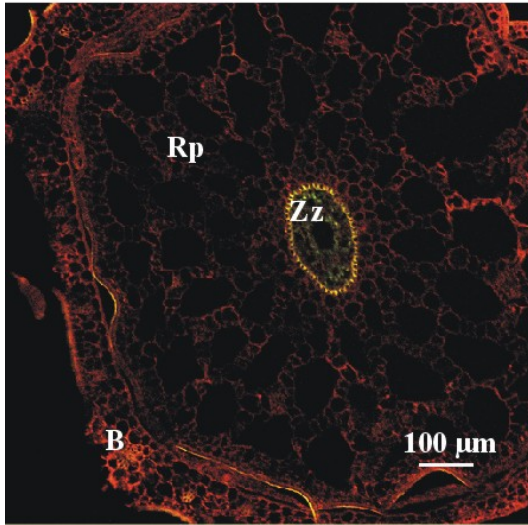


Abb. 195a

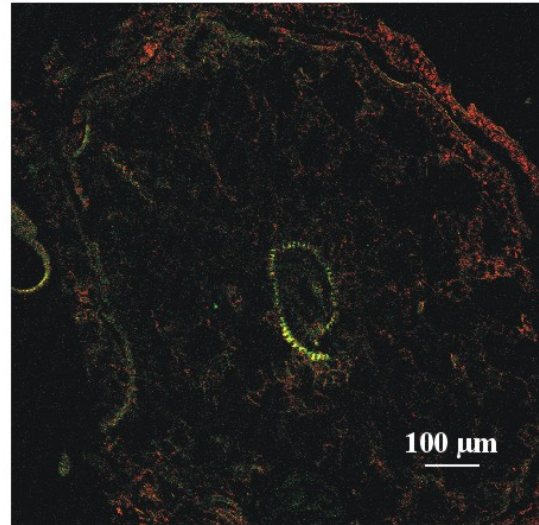


Abb. 195b

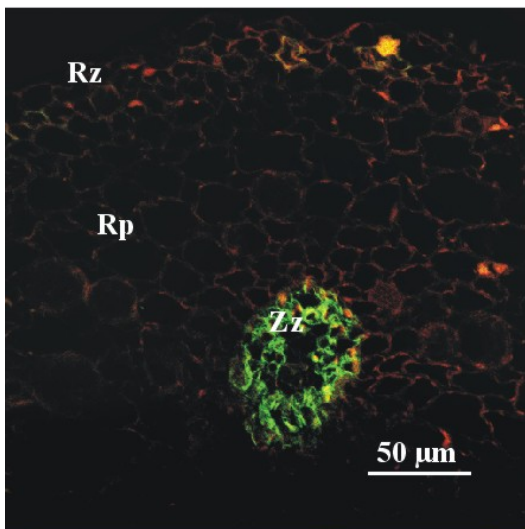


Abb. 196a

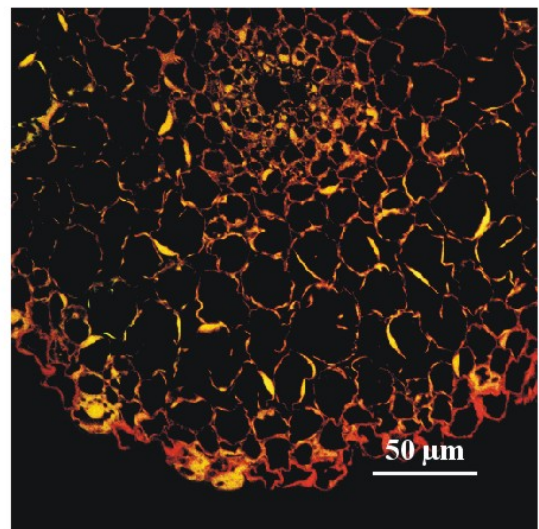


Abb. 196b

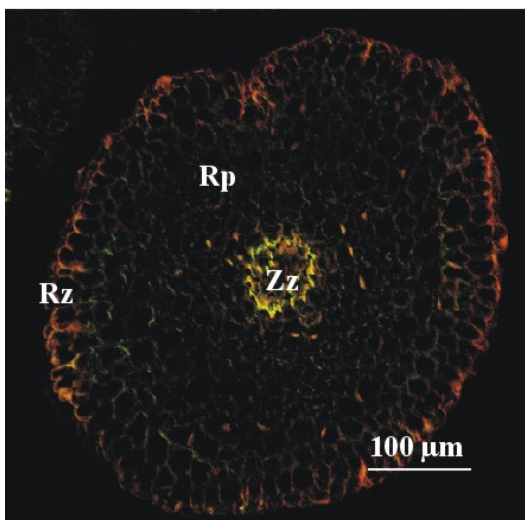


Abb. 197a

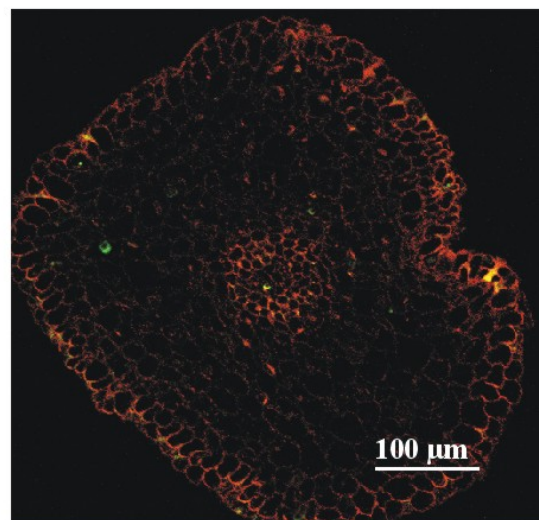


Abb. 197b

Tafel 52

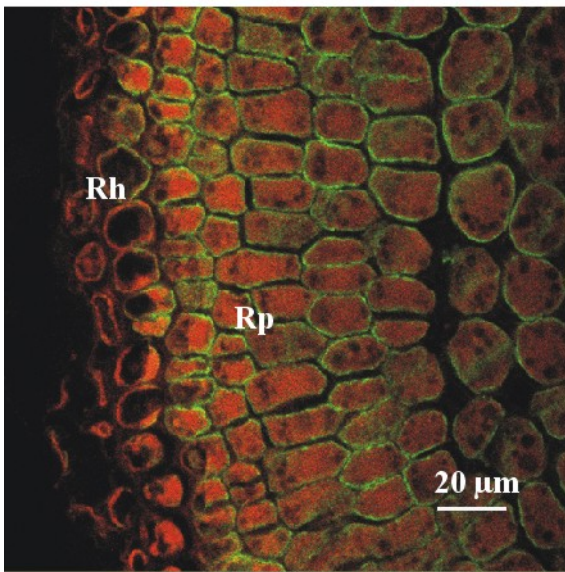


Abb. 198

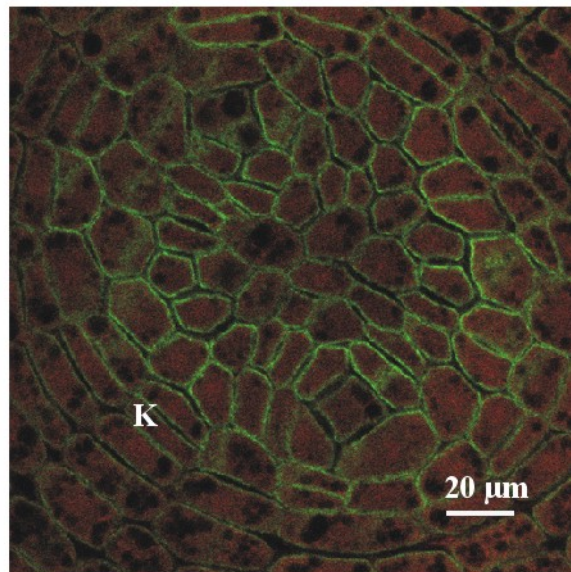


Abb. 199

3.3.2 Elektronenmikroskopie

Die genaue Lokalisation der PM-H⁺-ATPase in den einzelnen Zellen der unterschiedlichen Gewebe in Blatt, Stängel und Wurzel konnte mit Hilfe der Antigen-Antikörper-Reaktion ermittelt werden. Schon bei den Untersuchungen mit dem CLSM wurde deutlich, dass die Verteilung der ATPase in den einzelnen Zellen nicht homogen war.

Für die elektronenmikroskopische Lokalisation wurden anstelle des Fluorochroms 10nm große Goldpartikel, die an den sekundären Antikörper gebunden waren, verwendet. Diese waren als elektronendichte Partikel deutlich auf dem Leuchtschirm des Mikroskops zu erkennen, so dass ihre subzelluläre Verteilung bei 12000-20000facher Vergrößerungen erkannt werden konnte.

3.3.2.1 Ermittlung der optimalen Fixierung für die immuncytochemische Lokalisation

Mit Hilfe des Computer-Programms AnalySIS[®] (Version 3.0) wurden innerhalb einer Fläche von 23µm² bei *P. lucens* die Anzahl und Verteilung der Goldkörner ermittelt. Die spezifische Verteilung errechnete sich aus der Menge der Goldkörner, die an der Plasmamembran binden, dividiert durch die Gesamtmenge der Goldkörner in 23µm².

Tabelle 9: Spezifische Lokalisation des primären Antikörper bei unterschiedlichen Fixierungsmethoden

	Fixierung	Einbettungs- mittel	Goldkörner in 23µm ² (MW)	Goldkörner a. d. Membran (MW)	Membr.Gold/ Ges.Goldan- zahl
1	2,5% Glutaraldehyd 1% OsO ₄	Epon LR-White	0 0	0 0	0 0
2	2,5% Glutaraldehyd	Epon LR-White	0 0	0 0	0 0
3	2,5% Glutaraldehyd 1% OsO ₄ Mikrowellen-Fixierung	LR-White	0	0	0
4	2,5% Glutaraldehyd Mikrowellen-Fixierung	LR-White	0	0	0
5	0,1% Glutaraldehyd 2,5% Formaldehyd	LR-White	36,36	15,67	0,42
6	0,05% Glutaraldehyd 3% Formaldehyd	LR-White	46,5	21	0,48
7	8% Formaldehyd	LR-White ohne Erhitzen	14	13	0,89
8	8% Formaldehyd.	LR-White mit Erhitzen	39,33	36,33	0,90

3. Ergebnisse

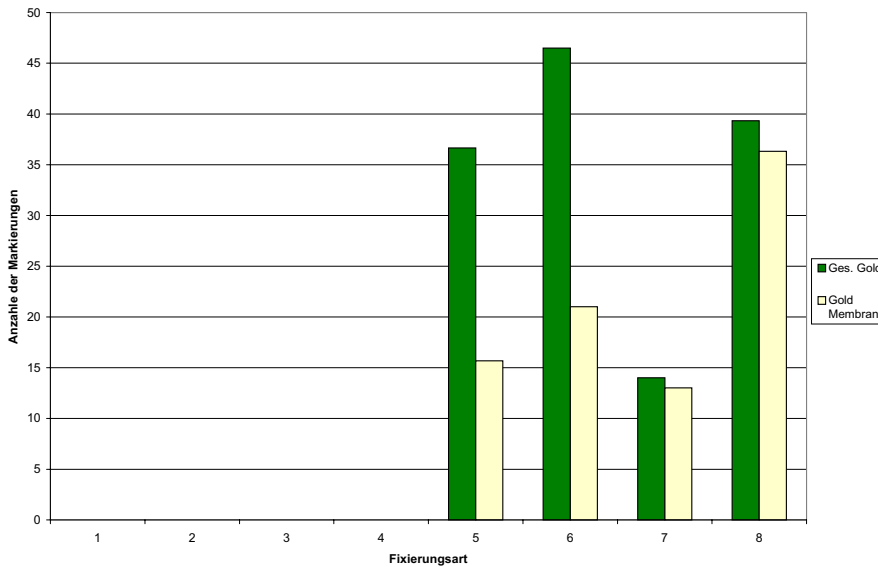


Abb. 200: Anzahl der Markierungen bei verschiedenen Fixierungen

Abb. 200 zeigt die Gesamt-Goldkörnerzahl auf den Schnitten (grün) und die spezifische Markierung direkt an der Plasmamembran (gelb). Wie daraus ersichtlich ist, war mit der Standardfixierung für elektronenmikroskopische Präparate, die 2,5% Glutaraldehyd und 1% Osmiumtetroxid enthielt, keine Markierung auf den Schnitten erzielt worden (Fixierungsart 1). Dies galt sowohl für die in Epon eingebetteten Proben als auch für die in LR-White eingebetteten. Die Grafik zeigt, dass mit allen Fixierungsmitteln, die 2,5% Glutaraldehyd enthielten, keine Markierungen zu erzielen waren (Fixierungsart 1-4). Wurde die Konzentration des Aldehyds drastisch auf 0,1% und dann weiter auf 0,05% reduziert (Fixierungsart 5 und 6), so konnten Goldpartikel auf den Schnitten registriert werden. Bei einer Fixierung mit 8% Formaldehyd sank die Gesamtanzahl der Markierungen deutlich ab (Fixierungsart 7), die Spezifität blieb aber erhalten. Durch das Erhitzen der Schnitte unmittelbar vor der Markierung konnte die Anzahl der Markierungen wieder erhöht werden (Fixierungsart 8), ohne dass sich die Spezifität zu verminderte. Im gleichen Maße, wie sich die Antigenität jedoch verbesserte, verschlechterte sich der Strukturverlust der Schnitte.

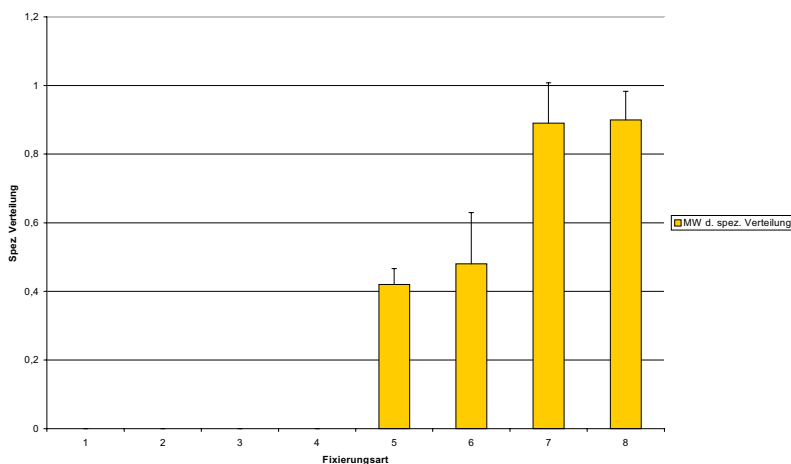


Abb. 201: Spezifische Verteilung der PM-H⁺-ATPase Markierung

Die Abbildungen 202 und 203 auf Tafel 53 zeigen den Strukturerhalt in den Mesophyllzellen von *Potamogeton lucens* mit und ohne Erhitzen. Dort sind ohne Erhitzen deutlich weniger Markierungen zu erkennen, als mit Erhitzung der Schnitte. Dafür ist der Strukturerhalt besser.

Abb. 201 zeigt einen Vergleich der spezifischen Verteilung der Goldkörner auf den Schnitten bei einem Einsatz von unterschiedlichen Fixierungsmitteln. Sie machte deutlich, dass mit der Abnahme der Glutaraldehydkonzentration die Spezifität deutlich ansteigt (Balken 5 und 6). Sie war jedoch mit 42% bzw. 45% immer noch zu gering. Mit dem ausschließlichen Einsatz von Formaldehyd, erhöhte sich die Spezifität deutlich auf 93% (7 und 8). Das Erhitzen der Schnitte vor der Markierung hatte dagegen kaum einen Einfluß auf die Spezifität (8).

3.3.2.2 Die Verteilung der PM-H⁺-ATPase in den Blättern von Wasserpflanzen

In den Epidermis- und Mesophyllzellen der Blätter von *H. vulgaris*, *M. aquaticum* und *M. verticillatum*, sowie *C. hamulata* konnte auch bei höheren Vergrößerungen, wie sie mit dem Elektronenmikroskop möglich sind, keine Markierung von H⁺-ATPasen festgestellt werden (z.B. bei *M. aquaticum*, Abb. 204). Nur in den Geleitzellen der kleinen zentralen Leitbündel von *M. aquaticum* und *M. verticillatum* fanden sich einige Markierungen, die auf der zur Siebröhre abgewandten Seite am häufigsten vorkamen (Abb. 205, 206).

Die Blätter von *S. aloides*, *P. oceanica*, *V. spiralis*, *R. penicillatus*, *C. caroliniana* und das Unterwasserblatt von *P. natans* zeigten ein für sie typisches Verteilungsmuster bei den Markierungen. Sie waren nur am Plasmalemma der Epidermiszellen zu finden und ihre lineare Dichte war an den verschiedenen Seiten der Epidermiszellen unterschiedlich ausgeprägt. Am Beispiel von *S. aloides* sieht man, dass sie an den periklinen Außenseiten geringer waren (Abb. 207) als an den antiklinen Seiten (Abb. 208). Die Zunahme der Markierungsdichte erfolgte, je weiter man sich den periklinen Innenseiten näherte (Abb. 209). Am Plasmalemma der Innenseiten fanden sich, unregelmäßig verteilt, die meisten Markierungen wieder (Abb. 210). Das Mitführen einer Kontrolle zeigt, dass es sich um spezifische Markierungen handelte (Abb. 211). In den angrenzenden Mesophyllzellen waren dagegen keine Goldkörner an den Membranen zu finden (Abb. 212). Dieses Markierungsmuster war auch bei *Posidonia oceanica* deutlich zu erkennen. An den periklinen Außenseiten waren deutlich weniger Goldkörner zu finden, als an den Seiten und der Innenseite (Abb. 213). Im Gegensatz zu *S. aloides*, bei denen keine Markierungen im Leitbündel auftraten, fanden sich in den Geleitzellen bei *P. oceanica* einige Goldkörner (Abb. 214).

In den Fiederblättchen von *M. spicatum* fanden sich Markierungen mit Goldkörnern sowohl in den Epidermis- als auch in den darunter liegenden Mesophyllzellen wieder. An den periklinen Außenseiten der Epidermiszellen war sie relativ gering, ebenso an den antiklinen Seiten der Zellen (Abb. 215, 216). Erst zu den periklinen Innenseiten der Zellen hin, nahm die Körnerdichte zu. In den darunter liegenden Mesophyllzellen waren die Markierungen relativ gleichmäßig am Plasmalemma der gesamten Zelle verteilt (Abb. 217). Auch bei *C. demersum* war diese Verteilung zu finden. An den periklinen Innenseiten, zum Mesophyll hin, wurden deutlich mehr Goldkörner lokalisiert, als an den Außenseiten (Abb. 218). Ihre Anzahl nahm an den antiklinen Seitenwänden nach außen hin kontinuierlich ab (Abb. 219).

An den antiklinen Wandprotuberanzen der Epidermiszellen von *R. penicillatus* war die Verteilung der Goldkörner dichter als an den periklinen Außenseiten der Zellen (Abb. 220) An den periklinen Innenseiten zum Mesophyll hin, bzw. bei zur oberen Epidermis hin, fand sich eine ebenso dichte Markierung, wie an den Seiten (Abb. 222). In den Mesophyllzellen dagegen waren keine Markierungen zu finden. Lediglich die Geleitzellen im Leitbündel zeigten einige Goldkörner, an den zu den Siebröhren gelegenen Seiten (Abb. 223). Bei *E. canadensis* und *E. nuttallii* waren die Markierungen am gesamten Plasmalemma der unteren Epidermiszellen gleichmäßig verteilt (Abb. 221, 224, 225) und setzten sich an den periklinen Innenseiten der oberen Epidermiszellen fort (Abb. 226, 227, 228).

Elektronenmikroskopischer Nachweis der PM-H⁺-ATPase in Blättern

Tafel 53: Abb. 202: Plasmalemma einer Mesophyllzelle von *P. lucens* zur abaxialen Epidermiszelle hingerrichtet. Mit Erhitzen. Abb. 203: Plasmalemma einer Mesophyllzelle von *P. lucens* zur abaxialen Epidermiszelle hingerrichtet. Ohne Erhitzen.

Tafel 54: Abb. 204: Perikline Innenseite einer Epidermiszelle von *M. aquaticum*. Abb. 205: Leitbündel von *M. aquaticum*. Abb. 206: Geleitzelle mit Siebröhre im Leitbündel von *M. aquaticum* (Ausschnitt von Abb. 205).

Tafel 55: Abb. 207: Perikline Außenseite einer Epidermiszelle von *S. aloides*. Abb. 208: Antikliner Seitenbereich einer Epidermiszelle von *S. aloides*. Abb. 209: Perikline Innenseite einer Epidermiszelle von *S. aloides*. Abb. 210: Perikline Innenseite einer Epidermiszelle von *S. aloides*.

Tafel 56: Abb. 211: Kontrolle; antikline Seite einer Epidermiszelle von *S. aloides*. Abb. 212: Plasmamembran einer Mesophyllzelle von *S. aloides*. Abb. 213: Perikline Innenseite einer Epidermiszelle von *P. oceanica*. Abb. 214: Geleitzelle im Leitbündel von *P. oceanica*.

Tafel 57: Abb. 215: Perikline Außenseite einer Epidermiszelle von *M. spicatum*. Abb. 216: Perikline Innenseite einer Epidermiszelle von *M. spicatum*. Abb. 217: Perikline Seite einer Mesophyllzelle von *M. spicatum*.

Tafel 58: Abb. 218: Perikline Innenseite einer Epidermiszelle von *C. demersum*. Abb. 219: Antikline Seite einer Epidermiszelle von *C. demersum*. Abb. 220: Antikline Seiten zweier Epidermiszellen mit Wandportuberanzen von *R. penicillatus*. Abb. 221: Antikline Seite einer abaxialen Epidermiszelle von *E. canadensis*.

Tafel 59: Abb. 222: Perikline Innenseite einer Epidermiszelle von *R. penicillatus*. Abb. 223: Geleitzelle mit Siebröhre im Leitbündel von *R. penicillatus*. Abb. 224: Perikline Außenseite einer abaxialen Epidermiszelle von *E. canadensis*. Abb. 225: Perikline Außenseite einer abaxialen Epidermiszelle von *E. nuttallii*.

Tafel 60: Abb. 226: Antikline Seiten zweier Epidermiszellen der abaxialen Seite von *E. canadensis* (Silberfärbung). Abb. 227: Perikline Innenseite einer adaxialen Epidermiszelle von *E. nuttallii*. Abb. 228: Transferstruktur an der antiklinen Seite einer abaxialen Epidermiszelle von *E. canadensis*.

Tafel 61: Abb. 229: Perikline Außenseite einer Epidermiszelle von *V. spiralis*. Abb. 230: Perikline Innenseite einer Epidermiszelle von *V. spiralis*. Abb. 231: Transferstruktur an den antiklinen Seiten einer Epidermiszelle von *C. caroliniana*. Abb. 232: Perikline Außenseite einer Epidermiszelle von *C. caroliniana*.

Tafel 62: Abb. 233: Untere Epidermiszelle d. Schwimmblattes von *P. natans*. Abb. 234: Epidermis- und Mesophyllzelle eines Unterwasserblattes von *P. natans*. Abb. 235: Antikline Seiten von Epidermiszellen eines Unterwasserblattes von *P. natans*. Abb. 236: Mesophyll- und Epidermiszelle von *P. perfoliatus*.

Tafel 63: Abb. 237: Perikline Innenseite einer abaxiale Epidermiszelle von *P. lucens*. Abb. 238: Perikline Seite einer Mesophyllzelle zu einer adaxialen Epidermiszelle hin von *P. lucens*. Abb. 239: Mesophyll- und Epidermiszellen des costalen Bereichs von *P. lucens*.

Abkürzungen der Tafeln 53-63:

Hinweis auf Goldmarkierungen (➔); Apoplast (Ap); Chloroplast (Chl); Cytoplasma (Cy); Endoplasmatisches Retikulum (ER); Epidermiszelle (Ez); Geleitzelle (GZ); Mitochondrium (Mi); Mesophyllzelle (Mz); Obere Epidermiszelle (O Ez); Parenchym (Pa); Plasmamembran (Pm); Phloemparenchym (Pp); Siebröhre (Sr); Transferstruktur (Ts); Untere Epidermiszelle (U Ez); Stärke (St); Vakuole (V); Zellwand (Zw):

Tafel 53

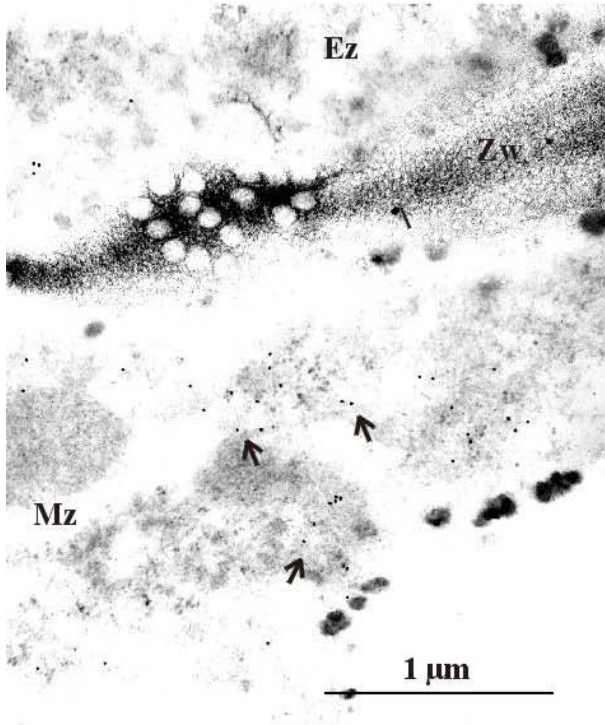


Abb. 202

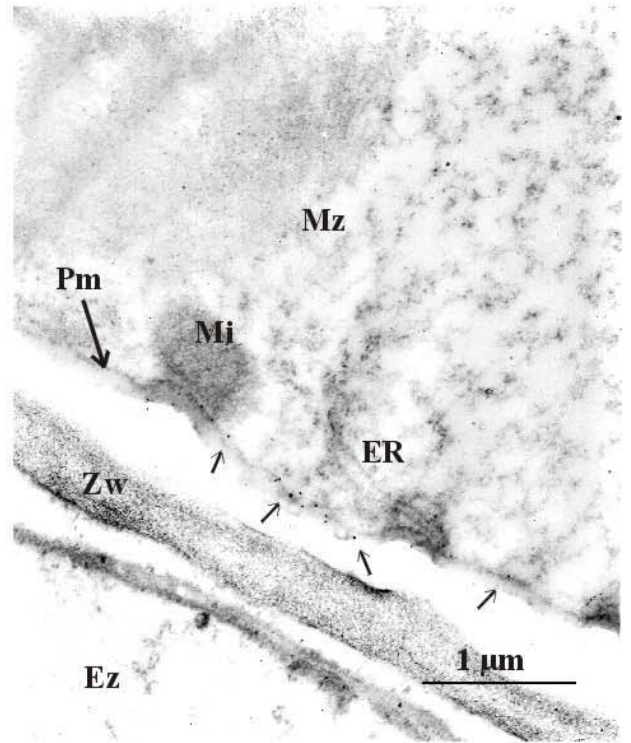


Abb. 203

Tafel 54

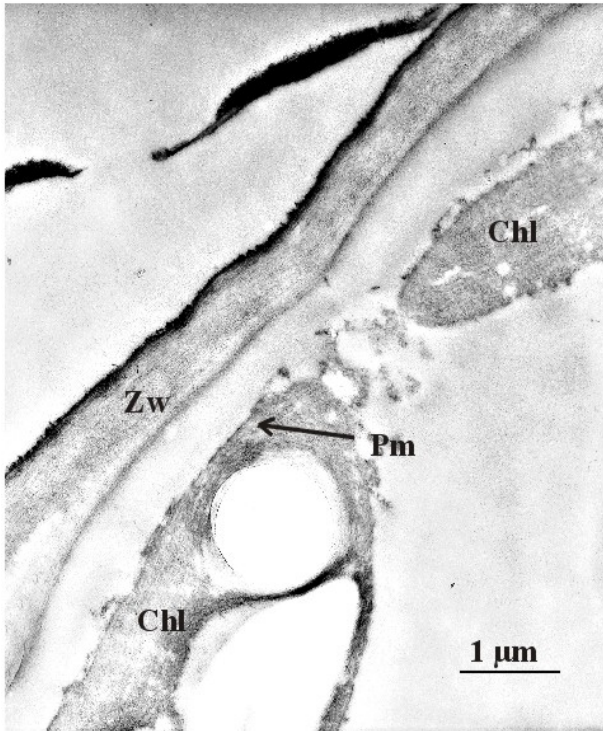


Abb. 204

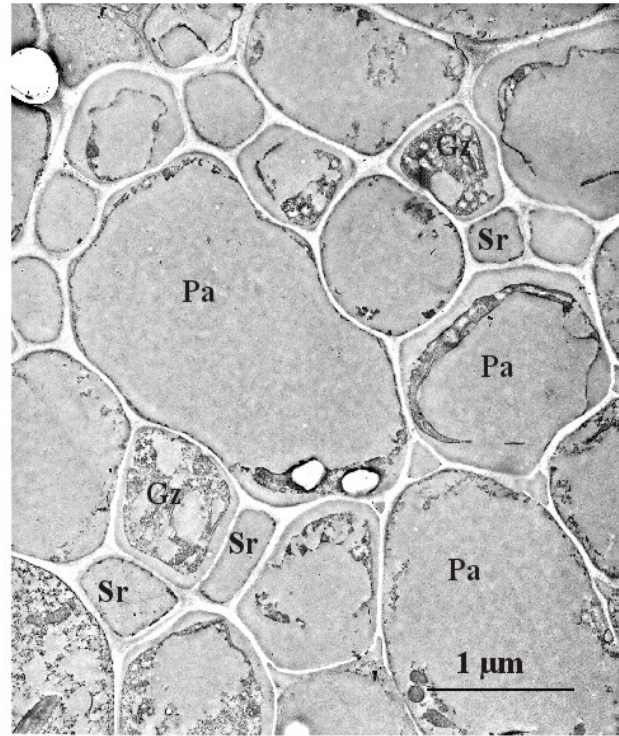


Abb. 205

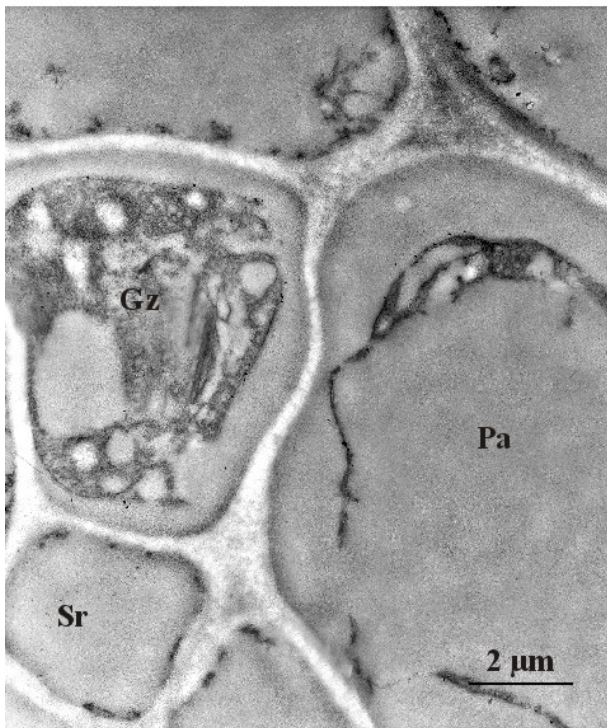


Abb. 206

Tafel 55

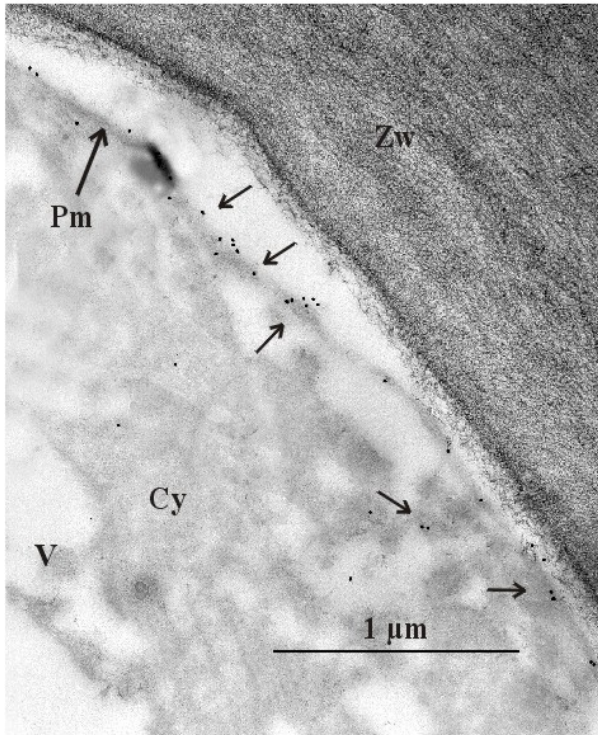


Abb. 207

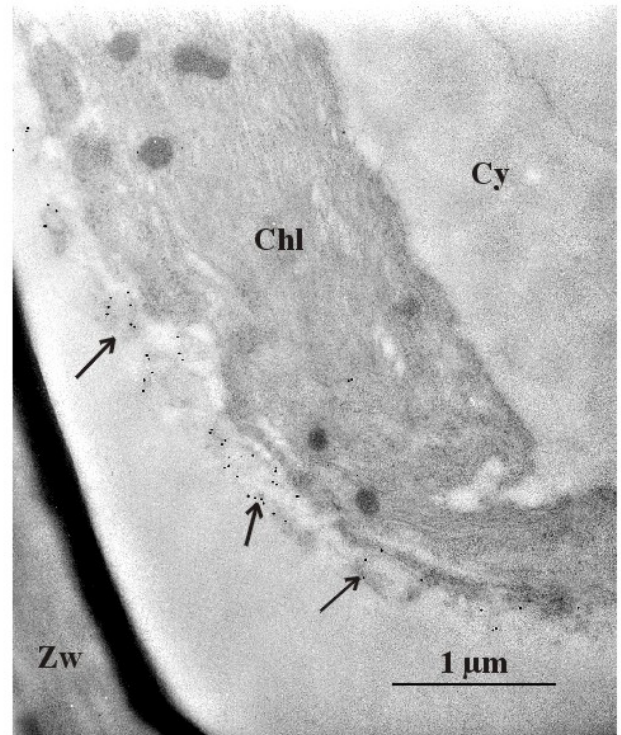


Abb. 208

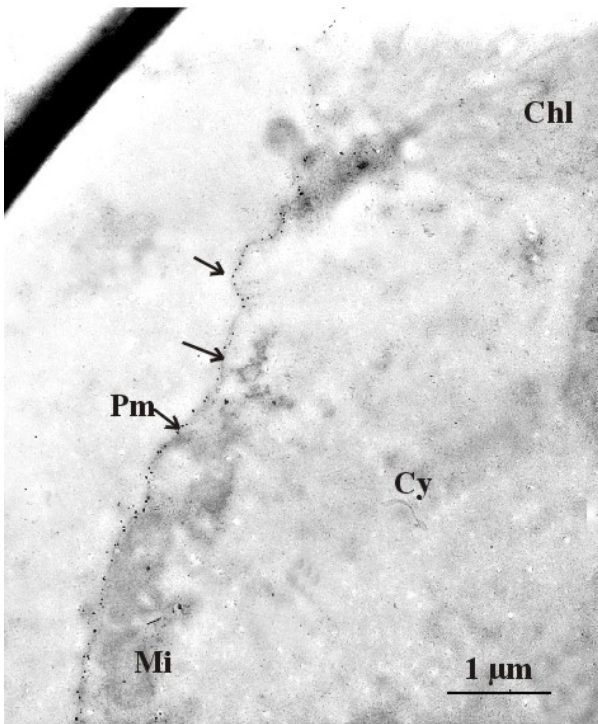


Abb. 209

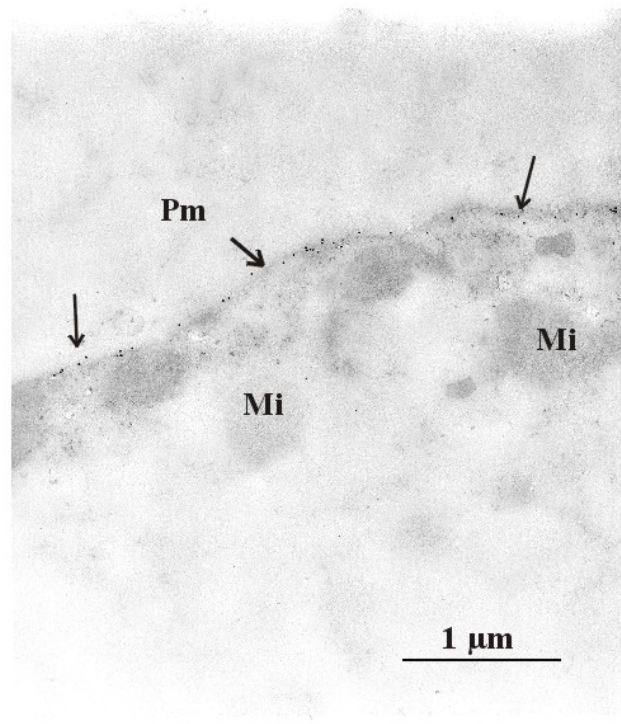


Abb. 210

Tafel 56

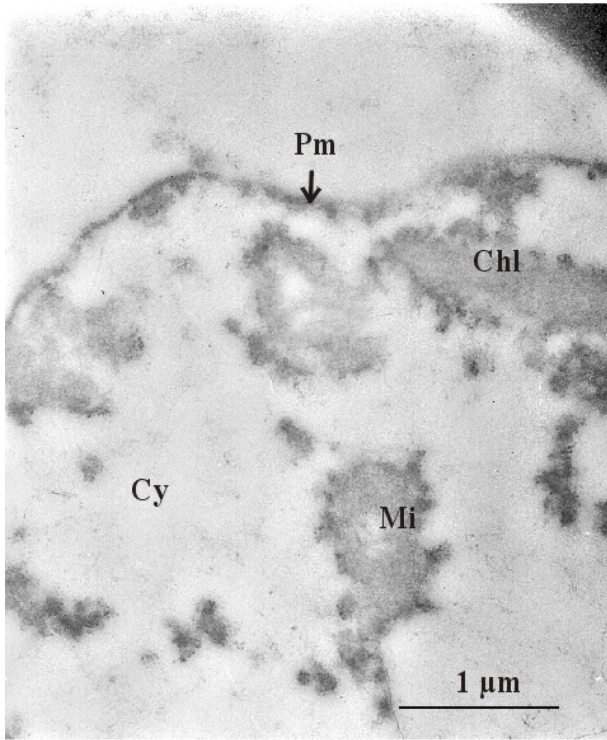


Abb. 211

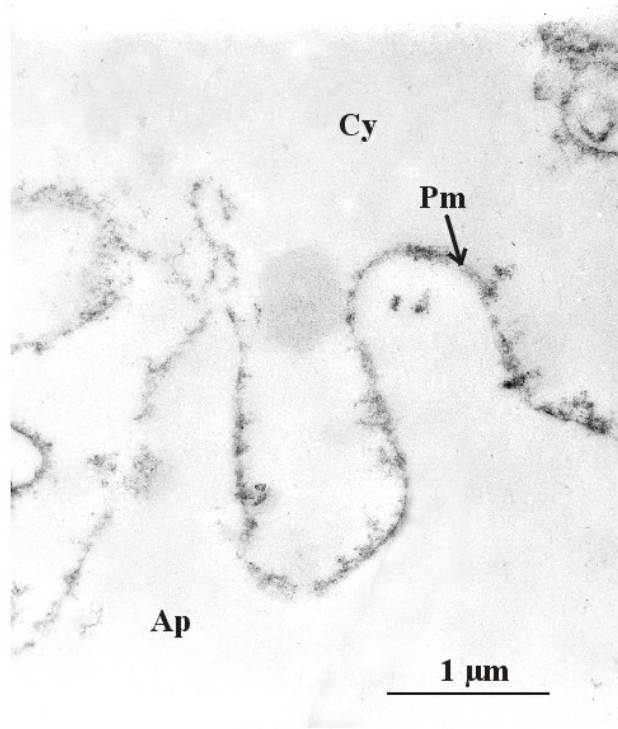


Abb. 212

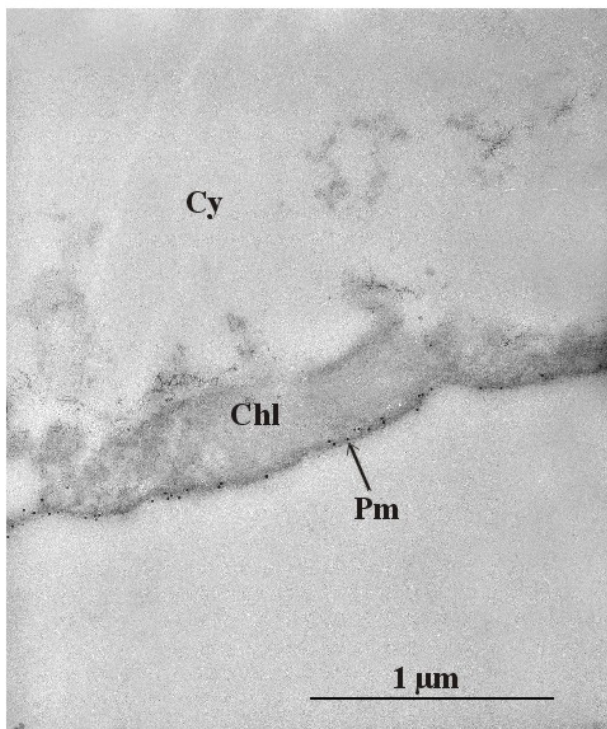


Abb. 213

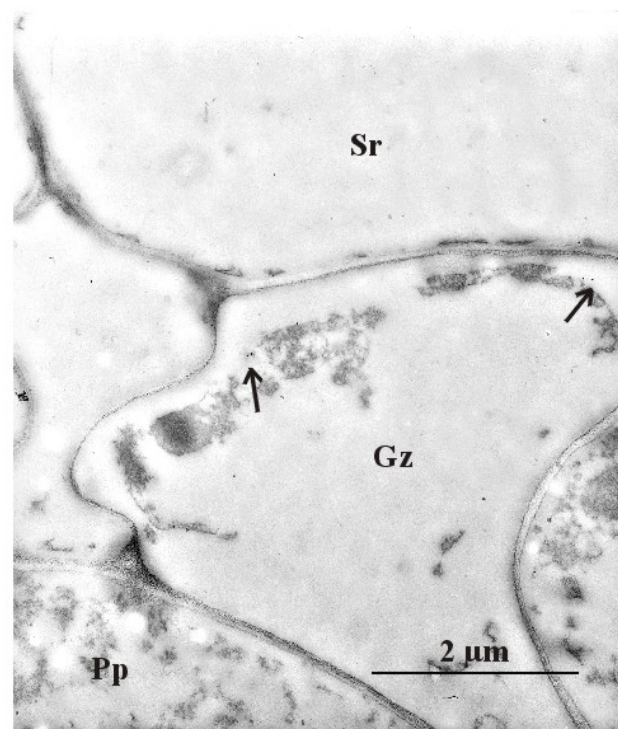


Abb. 214

Tafel 57

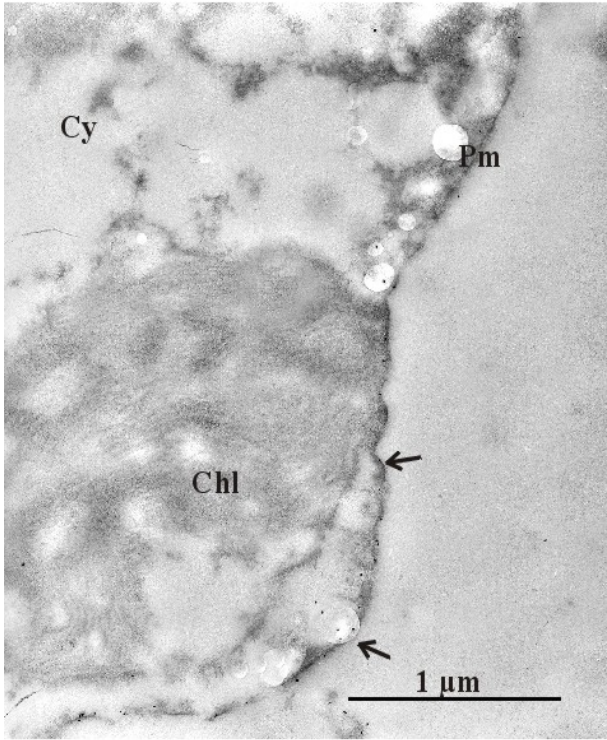


Abb. 215

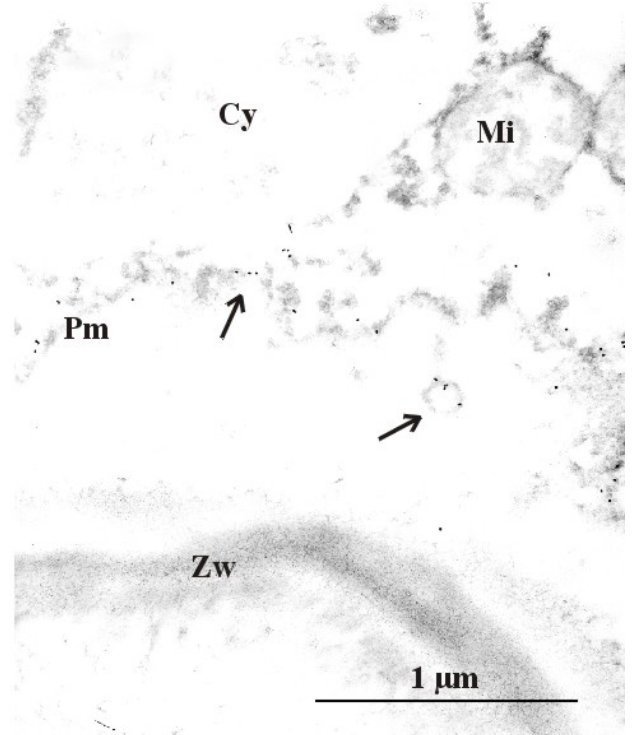


Abb. 216

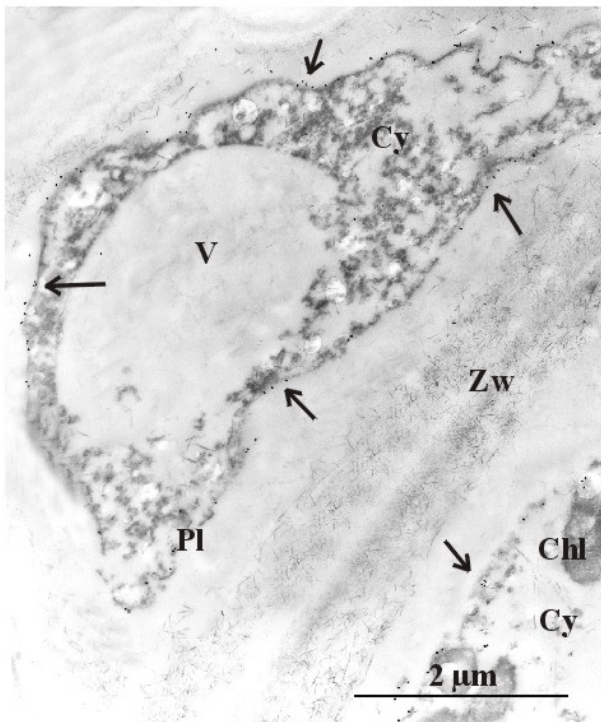


Abb. 217

Tafel 58

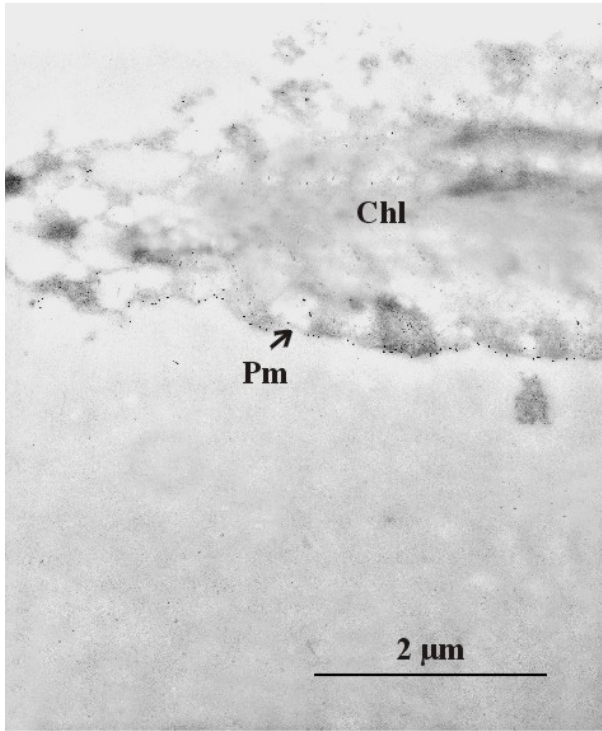


Abb. 218

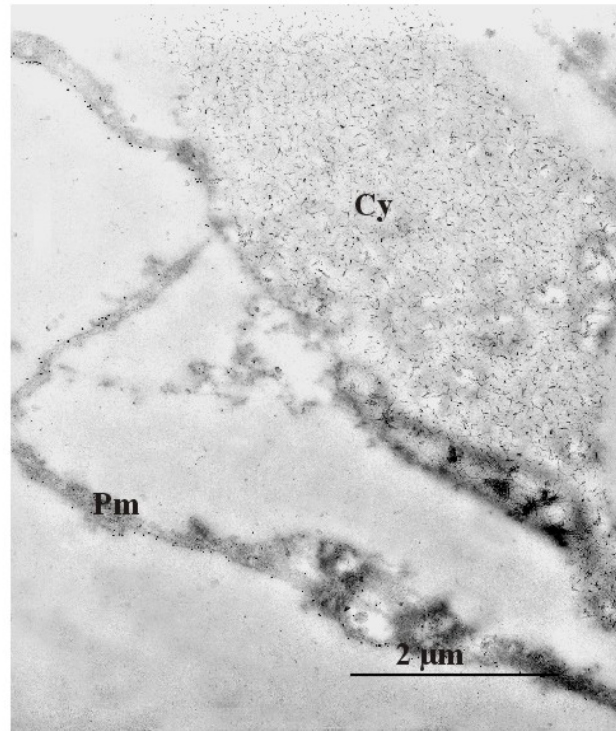


Abb. 219

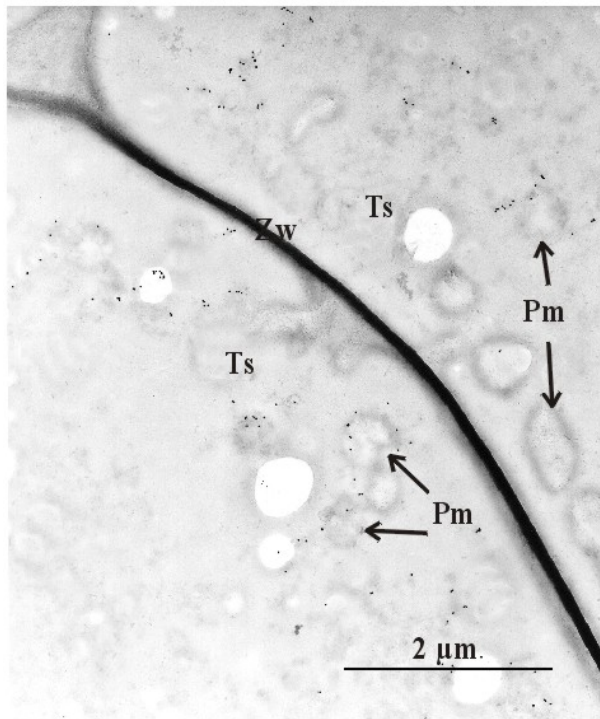


Abb. 220

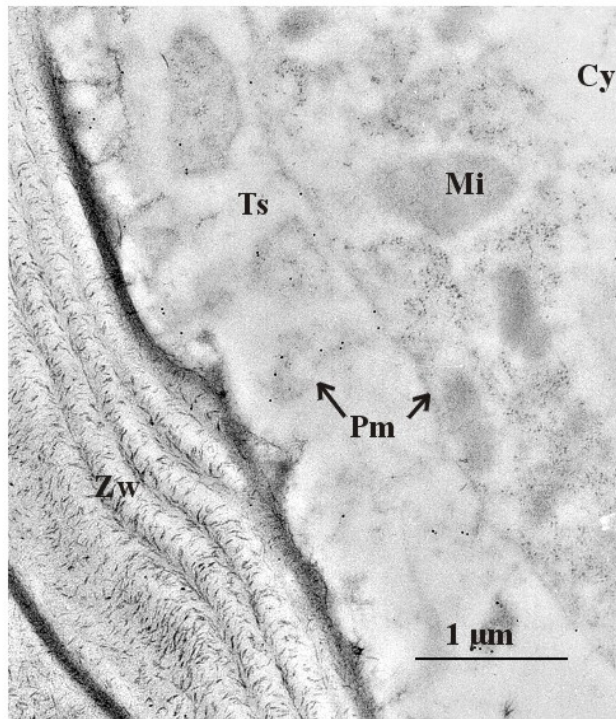


Abb. 221

Tafel 59

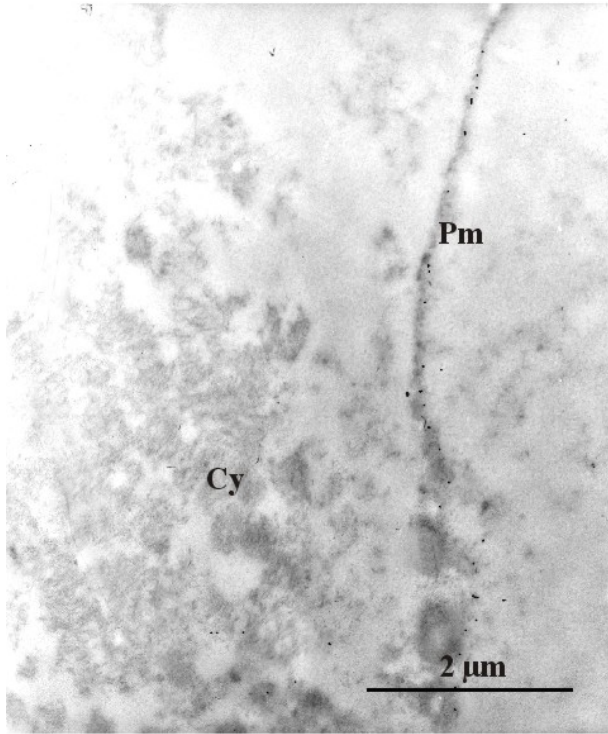


Abb. 222

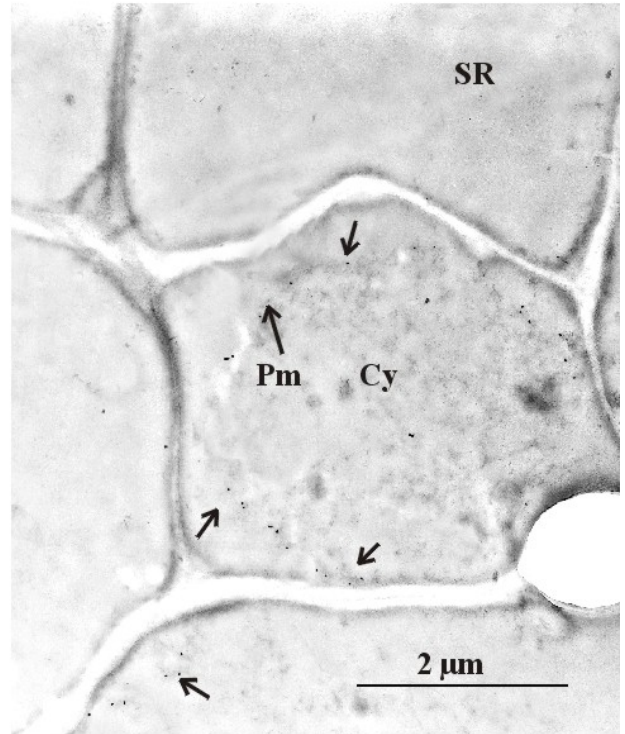


Abb. 223

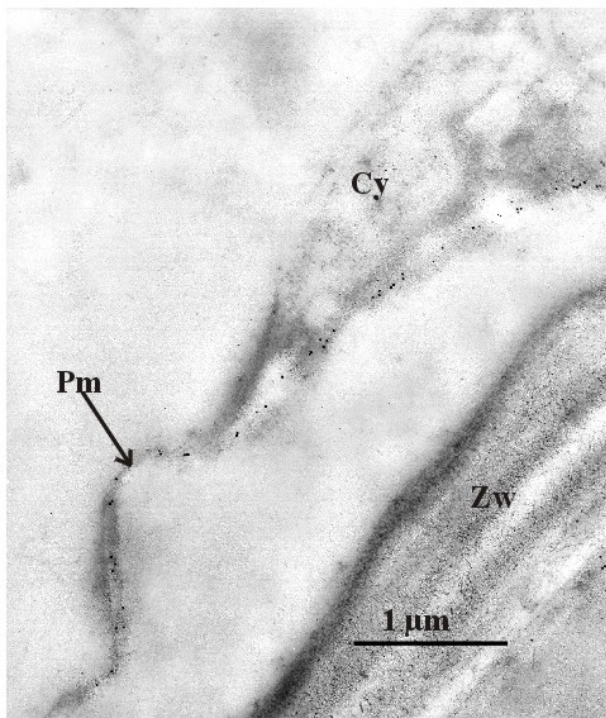


Abb. 224

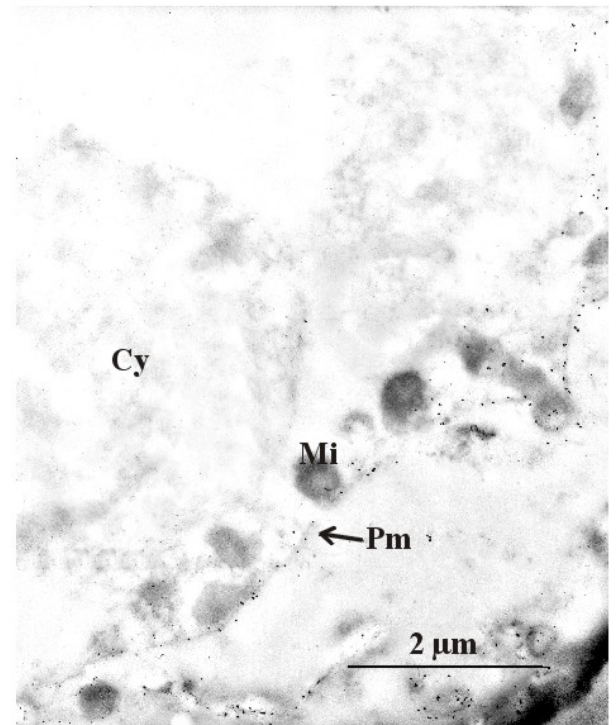


Abb. 225

Tafel 60

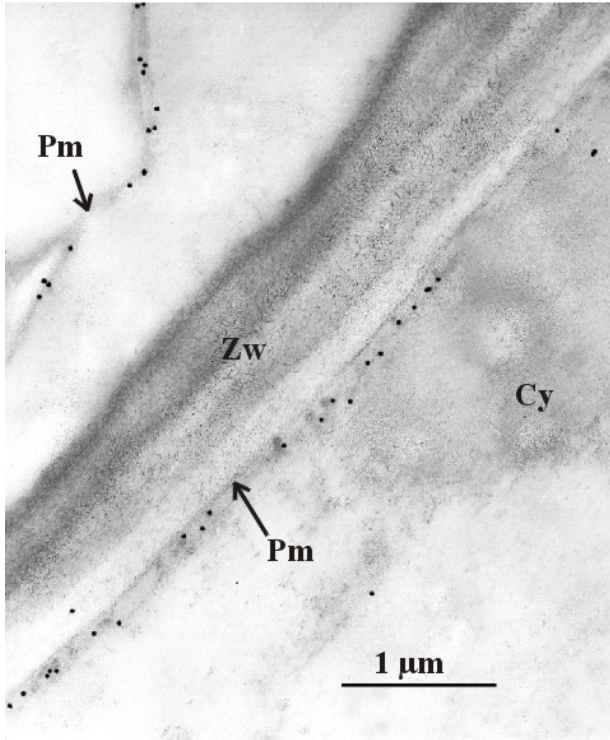


Abb. 226

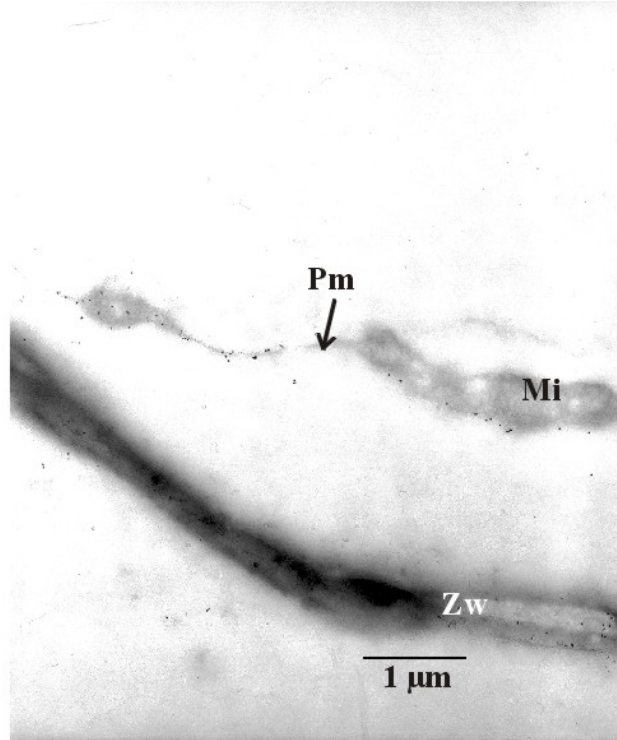


Abb. 227

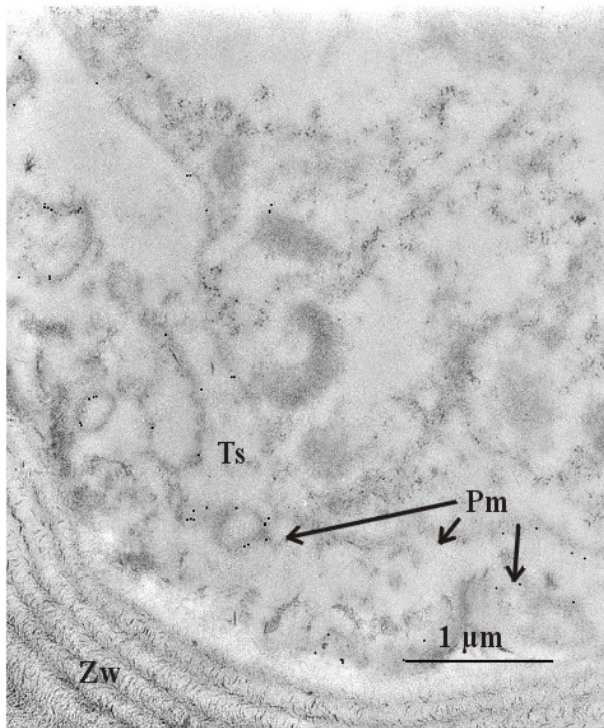


Abb. 228

Tafel 61

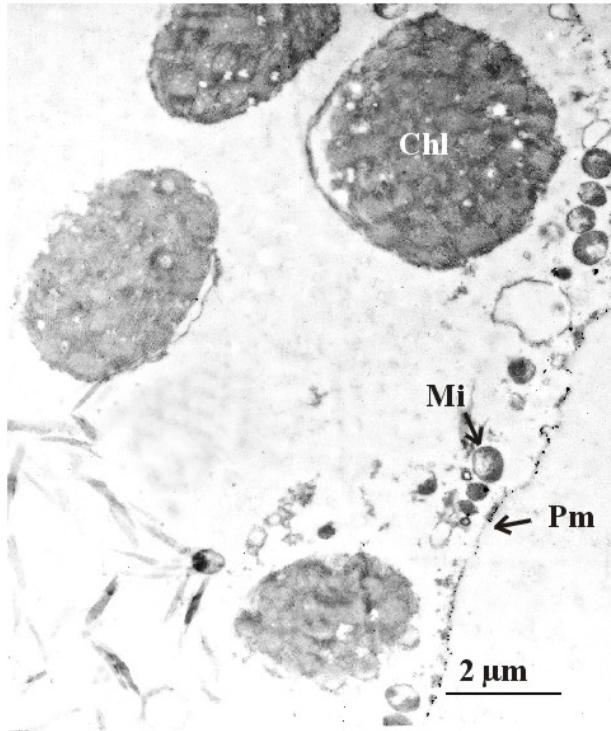


Abb. 229

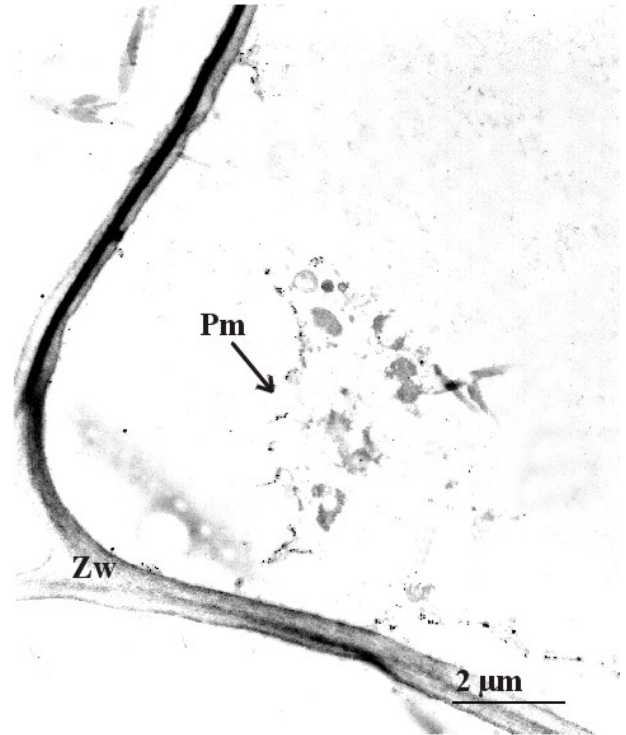


Abb. 230

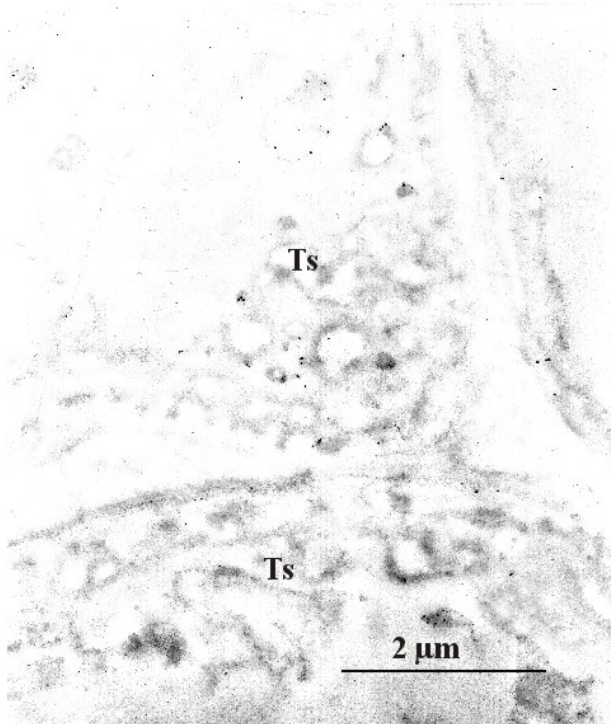


Abb. 231

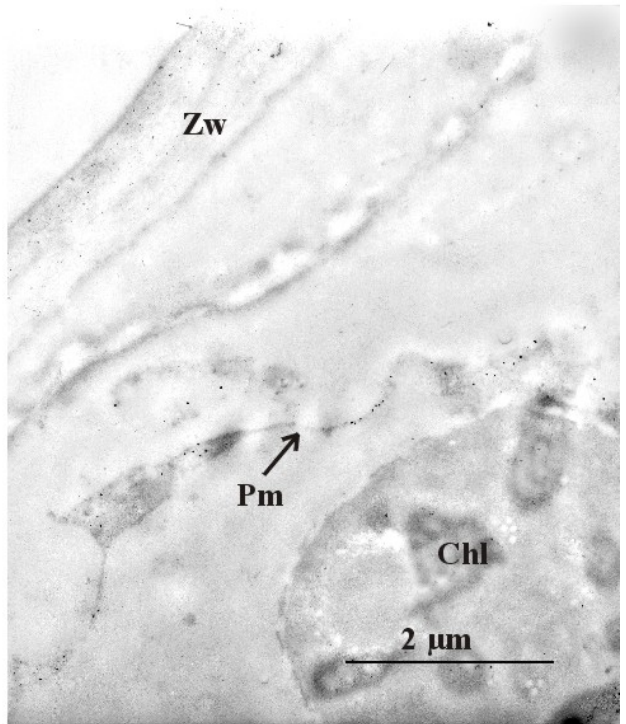


Abb. 232

Tafel 62

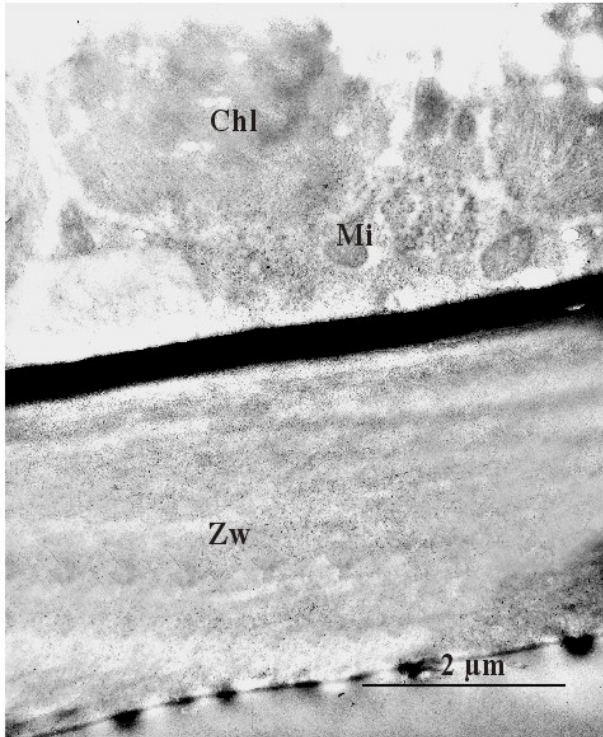


Abb. 233

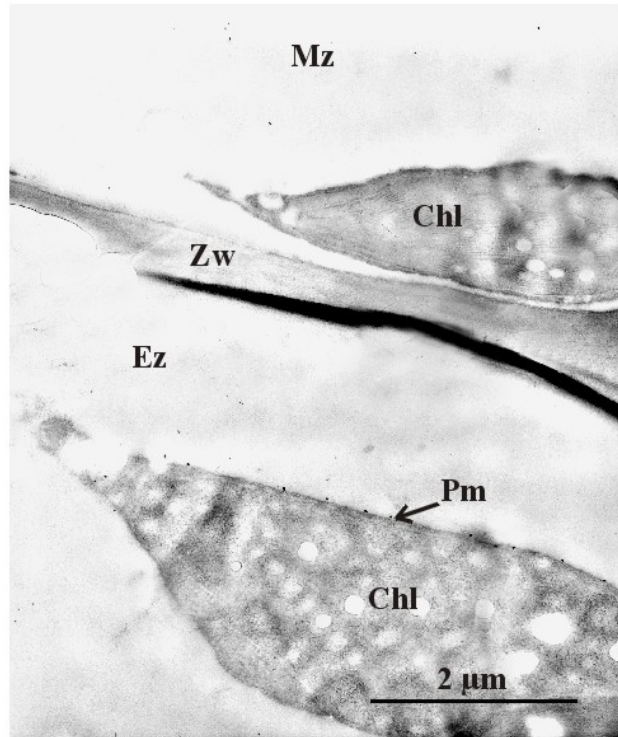


Abb. 234

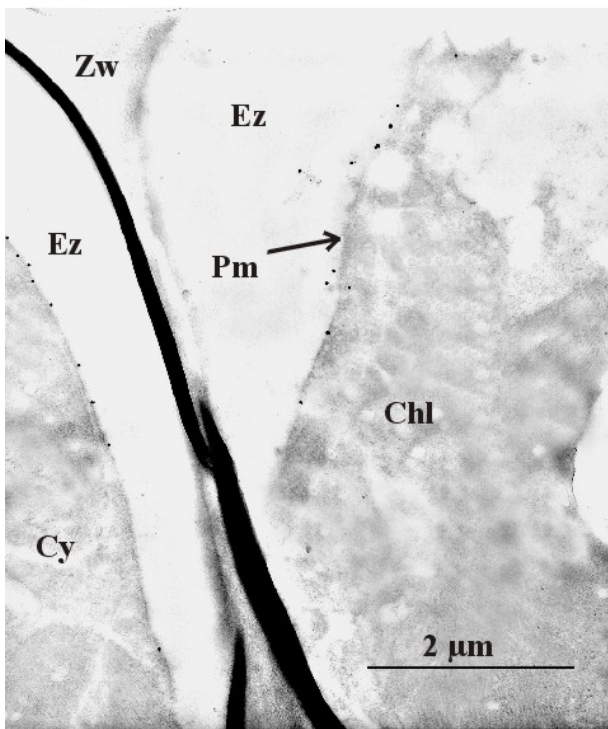


Abb. 235

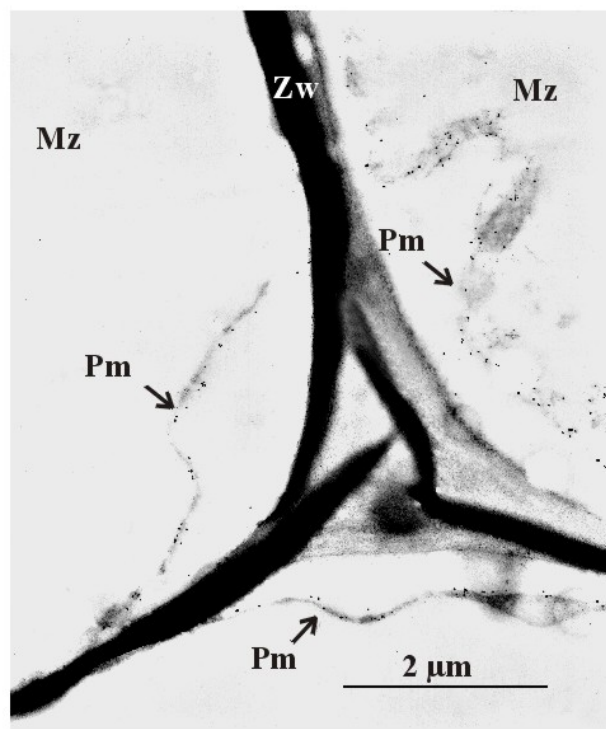


Abb. 236

Tafel 63

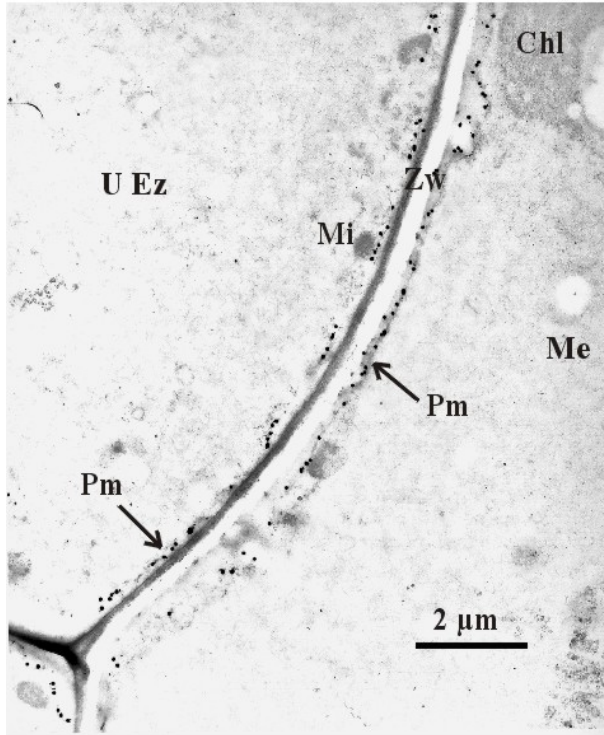


Abb. 237

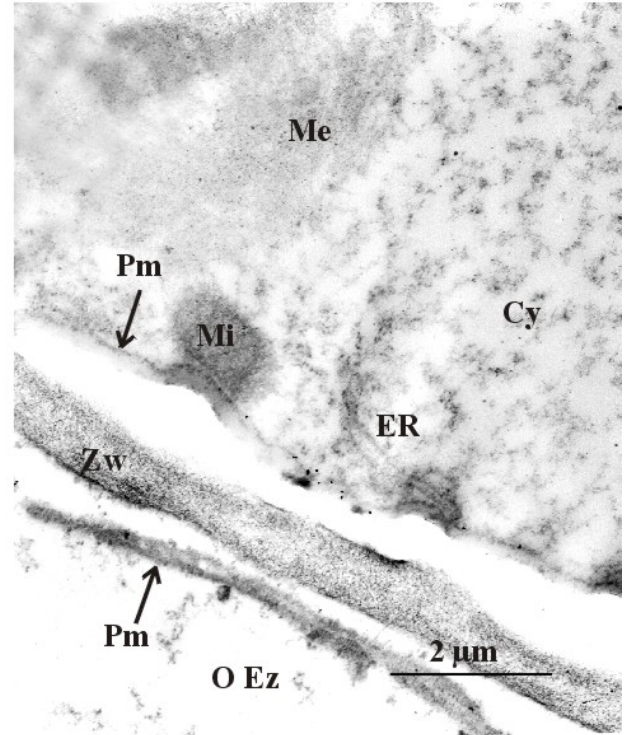


Abb. 238

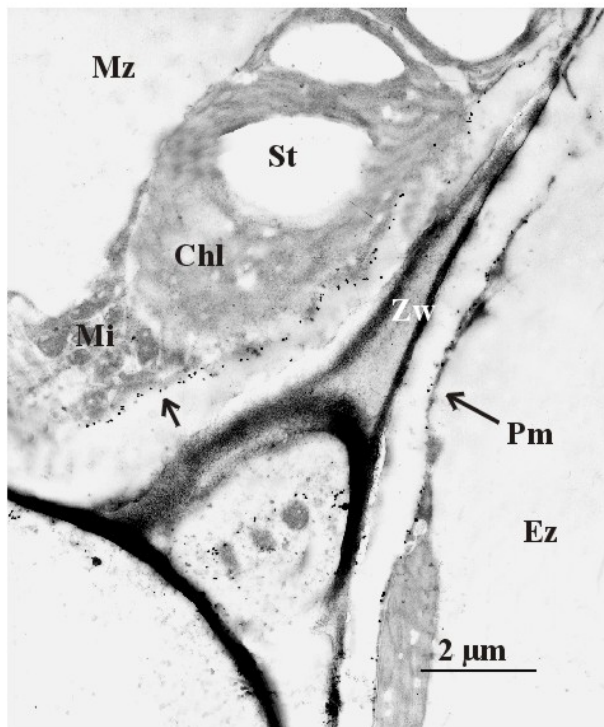


Abb. 239

In den Epidermiszellen von *V. spiralis* zeigte die Markierung der PM-H⁺-ATPase keine besondere Verteilung. Sie war an allen Seiten der Zellen gleichmäßig verteilt (Abb. 229, 230). Dies korreliert nicht mit den Ergebnissen, die bei den Polaritätsversuchen gemacht wurden, deckt sich aber mit den FITC-Fluoreszenz-Ergebnissen.

Bei *C. caroliniana* war die Markierungsdichte an der Plasmamembran erheblich geringer als bei den anderen positiv reagierenden Hydrophyten. An den Wandprotuberanzen der antiklinen Seitenwände fanden sich einige wenige Markierungen (Abb. 231). An den periklinen Außenwänden verringerte sich die Anzahl der Markierungen nochmals im Vergleich zu den Seitenwänden (Abb. 232). In den angrenzenden Mesophyllzellen waren keine Goldkörner zu finden.

In den Blättern der Laichkräuter *P. lucens* und *P. perfoliatus* konnten Markierungen vor allem in den Mesophyllzellen entdeckt werden. Eine Ausnahme bildete *Potamogeton natans*. In den Schwimmblättern waren nur in einigen Zellen der unteren Epidermis Markierungen gefunden worden (Abb. 233). Auch in den Geleitzellen der Leitbündel fanden sich keine Goldkörner. Dagegen konnten in den Epidermiszellen der Unterwasserblätter zahlreiche Markierungen mit einer unterschiedlichen Verteilung beobachtet werden. An den periklinen Innenseiten und antiklinen Seiten der Zellen zeigte sich eine deutliche Verteilung der Goldkörnchen (Abb. 234, 235), während an den periklinen Außenseiten nur wenige Markierungen sichtbar waren (ohne Abb.). Bei *P. lucens* und *P. perfoliatus* fanden sich Markierungen in erster Linie in den Mesophyllzellen. Hier waren die Lokalisationen gleichmäßig am gesamten Plasmalemma verteilt (Abb. 236, 237). Darüber hinaus fanden sich an den periklinen Innenseiten der abaxialen Epidermiszellen ebenfalls deutliche Markierungen. In den adaxialen Zellen konnte so gut wie keine Markierung entdeckt werden (Abb. 238). In den costalen Bereichen der Blätter von *P. lucens* und *P. perfoliatus*, wo das Mesophyll um die Leitbündel mehrschichtig wird, fanden sich Lokalisationen sowohl in allen Mesophyllzellen als auch in den Epidermiszellen beider Seiten (Abb. 239).

3.3.2.3 Quantitative Bestimmung der spezifischen Verteilung von Goldkörnern

Dass die Goldmarkierung an der Plasmamembran signifikant höher ist, als der Background, wurde für die hier angewandte Fixierung schon nachgewiesen (siehe 3.3.2.1). Nun sollte die lineare Verteilung der Goldkörner an der Plasmamembran von Epidermiszellen exemplarisch bei nicht polaren Blättern von *M. spicatum* und bei polaren Blättern von *E. canadensis* ermittelt werden. Dazu wurde die lineare Dichte der Goldpartikel pro μm Plasmamembran bestimmt.

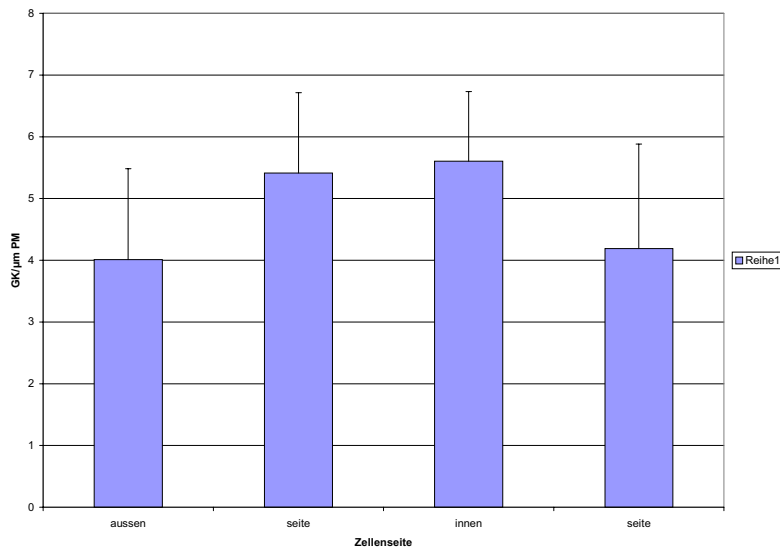


Abb. 240: Lineare Dichte der Goldkörner (GK) an der Plasmamembran von Epidermiszellen bei *M. spicatum*

Die lineare Dichte der Goldkörner an den Plasmamembranen von *M. spicatum* zeigte ein unterschiedliches Markierungsbild. An den periklinen Außenseiten der Epidermiszellen waren im Durchschnitt die wenigsten Markierungen zu finden, an den periklinen Innenseiten am meisten (Abb. 240). Die Anzahl der Goldkörner/ μm Plasmamembran an den antiklinen Seiten war in Durchschnitt höher als an den Außenseiten. Auffällig ist die asymmetrische Verteilung der Goldkörner an den beiden antiklinen Seitenwänden. An der rechten Seite zeigen sich wesentlich mehr Markierungen als an der linken Seite.

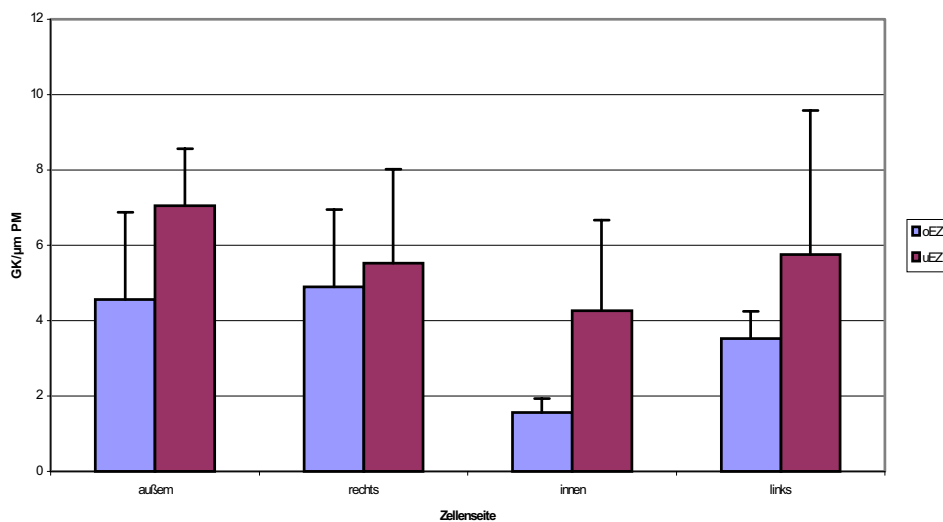


Abb. 241: Lineare Dichte der Goldkörner in den Zellen der oberen (oEz) und unteren Epidermis (uEz) von *Elodea canadensis*

Im Gegensatz zu *M. spicatum* zeigt die Verteilung der Goldkörner bei *E. canadensis* ein anderes Bild (Abb. 241). An den periklinen Außenseiten der unteren Epidermiszellen zeigt sich im Durchschnitt eine wesentlich höhere Verteilung der Goldkörner als an der periklinen Außenseite der oberen Epidermiszellen. Auch an den antiklinen Seiten findet man in den unteren Epidermiszellen deutlich mehr Markierungen als in den Zellen der oberen Epidermis. Das Phänomen der ungleichen Verteilung an den beiden antiklinen Seitenwänden, wie es bei *M. spicatum* zu finden ist, tritt auch hier auf. Die rechten antiklinen Seiten der unteren Epidermiszellen weisen erheblich mehr Markierungen auf, als die linken Seiten. An den periklinen Innenseiten findet man in den unteren Epidermiszellen wesentlich weniger Goldkörner, als an den anderen Seiten. Dafür zeigt sich auf der periklinen Innenseite der oberen Epidermiszellen eine wesentlich dichtere Verteilung.

3.4 SDS-Page und Western Blot

Zur Lokalisierung der 100kDa PM-H⁺-ATPase⁴ wurde der monoklonale Antikörper 46E5B11 eingesetzt. Der Nachweis über die Spezifität dieses Antikörpers lieferte der Western Blot.

Die Proteingehalte in den Mikrosomenfraktionen variierten von Pflanze zu Pflanze, sowie innerhalb der verschiedenen Pflanzenorgane. In den Blättern von *C. caroliniana* und *M. aquaticum* war deutlich weniger Protein pro g Frischgewicht enthalten als in *S. aloides* oder *P. perfoliatus*. Der Proteingehalt der Stängelfraktionen entsprach etwa dem in den Blättern. Nur in den Fraktionen der Wurzeln fand sich z.T. bis zu 30mal mehr Protein als in den Blättern. Die Ergebnisse sind im Anhang in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Nach Auftrennung der Fraktionen in den SDS-Gelen konnten in den Blättern von *H. vulgaris* und *M. aquaticum* keine Banden bei 97kDa gefunden werden und dementsprechend waren in den dazu gehörigen Western Blots keine Markierungen durch den Antikörper zu finden (Abb. 242 und 243). Bei *R. penicillatus*, *C. caroliniana* und *M. spicatum* waren eindeutige Banden an dieser Position (Abb. 244-246) zu finden, ebenso wie bei *P. perfoliatus*, *S. aloides* und *C. demersum* (247-249).

In den Stängel- und Wurzelfraktionen waren bei den meisten untersuchten Pflanzen keine Banden bei 97kDa zu entdecken. Lediglich in den Stängeln und Wurzeln von *R. penicillatus* (Abb. 244) und *C. caroliniana* (Abb. 245) und in den Wurzeln von *M. aquaticum* (Abb. 243) konnten sie entdeckt werden und auch in den Western Blots zeigte sich eine Markierung.

Damit zeigte sich, dass der benutzte monoklonale Antikörper an Protein einer Mikrosomenfraktion bei 97kDa spezifisch anbindet.

⁴ Das Molekulargewicht des Enzyms liegt tatsächlich bei 97kDa.

3.5 Auswirkungen unterschiedlicher pH-Werte auf *Myriophyllum spec.*

M. spicatum wurde für fünf Wochen in Wasser mit drei unterschiedlichen pH-Werten (6.0, 7.0 und 8.0) gehalten, um die Auswirkungen auf die Nachweisbarkeit der PM-H⁺-ATPase zu untersuchen. Parallel dazu wurden die Veränderungen des pH im Verlauf von fünf Wochen bei *M. spicatum* und *M. aquaticum* und dessen Einfluss auf die Nachweisbarkeit der PM-H⁺-ATPase untersucht. Dieser Ansatz kann auch als Kontrolle für den ersten Teil der Versuchsreihe angesehen werden, da nachdem der pH zu Beginn des Versuchs einmal eingestellt war, keinerlei Regulationen mehr erfolgten.

3.5.1 Allgemeinzustand der Pflanzen

Alle Pflanzen wiesen während der Versuchsdauer einem zufriedenstellenden Allgemeinzustand auf. Die Blätter von *M. spicatum* hatten zu Beginn der Versuche eine dunkelgrüne Farbe und keine Kalkkrustationen. Die vielen feinen Wurzeln wiesen keine fauligen Stellen auf. Einige Überwasserblätter von *M. aquaticum* die vor Versuchsbeginn vorhanden waren, sowie die Unterwasserblätter und Stängel hatten einen hellgrünen Farbton. Die langen braunen Wurzeln wiesen keine verfaulten Stellen auf.

3.5.2 Vitalität der Pflanzen bei konstanten pH-Werten

In den ersten zwei Wochen konnten bei *M. spicatum*, die in Wasser mit drei unterschiedlichen pH-Werten (6.0, 7.0 und 8.0) wuchsen, kaum Veränderungen an ihren äußeren Erscheinungsbildern festgestellt werden. Lediglich bei pH 8.0 traten schon nach der ersten Woche erste Kalkkristalle an den Fiederblättern auf. Die anderen beiden Pflanzen bei pH 6.0 und 7.0 waren zu diesem Zeitpunkt noch frei davon. Der Beginn der Kalkkrustation setzte bei pH 7,0 nach 11 Tagen und bei pH 8,0 nach 28 Tagen ein. Die Kalkanlagerung betraf alle ausgewachsenen Blätter der Pflanzen. Die apikal stehenden jungen Blätter blieben frei davon. Darüber hinaus entwickelte sich ab der zweiten Versuchswoche ein ausgeprägtes Algenwachstum, vor allem bei pH 8.0. Gegen Ende der Versuchszeit, nach fünf Wochen waren die Blätter aller drei Ansätze dick mit Kalk und Algen verkrustet (Abb. 250-252).

Tafel 64: SDS-Pages mit Coomassie-Blue gefärbt und Western Blot. Abb. 242: *H. vulgaris*. Abb. 243: *M. aquaticum*. Abb. 244: *R. penicillatus*. Abb. 245: *C. caroliniana*. Abb. 246: *M. spicatum*. Abb. 247: *P. perfoliatus*. Abb. 248: *S. aloides*. Abb. 249: *C. demersum*.
Blatt (Bl); Proteinmarker (PM); Stängel (St); Wurzel (W);

Tafel 65: Blattfiedern von *M. spicatum* bei konstanten pH-Werten (nach 14 Tagen). Abb.250a: Blatt bei pH 6,0 (4fach). Abb. 250b: Rhachis und Blattfiedern bei pH 6,0 (80fach). Abb.251a: Blatt bei pH 7,0 (4fach). Abb. 251b: Rhachis und Blattfiedern bei pH 7,0 (80fach). Abb. 252a: Blatt bei pH 8,0 (4fach). Abb. 252b: Rhachis und Blattfiedern bei pH 8,0 (80fach).

Tafel 66: Blätter von *M. spicatum* und *M. aquaticum* bei verändernden pH-Werten (nach 14 Tagen). Abb. 253a: Blatt von *M. aquaticum* (4fach). Abb. 253b: Rhachis und Blattfiedern eines Blattes von *M. aquaticum* (80fach). 254a: Blatt von *M. spicatum* (4fach). Abb. 254b: Rhachis und Blattfiedern von *M. spicatum* (80fach).

Tafel 64

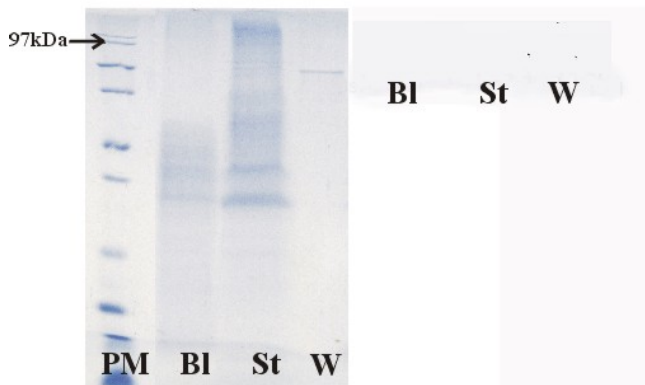


Abb. 242

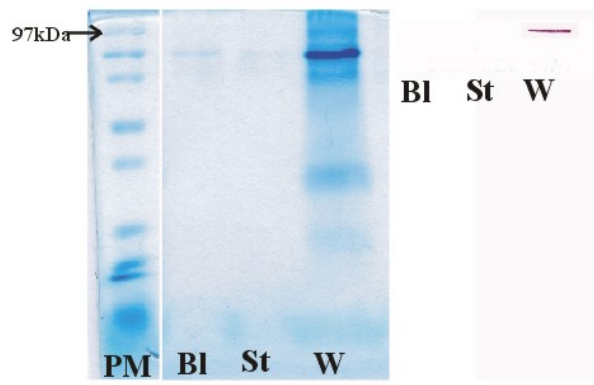


Abb. 243

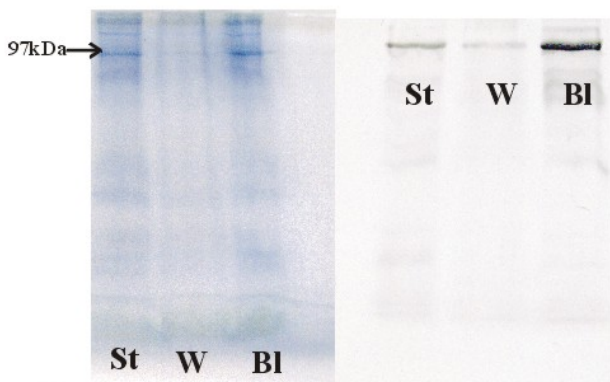


Abb. 244

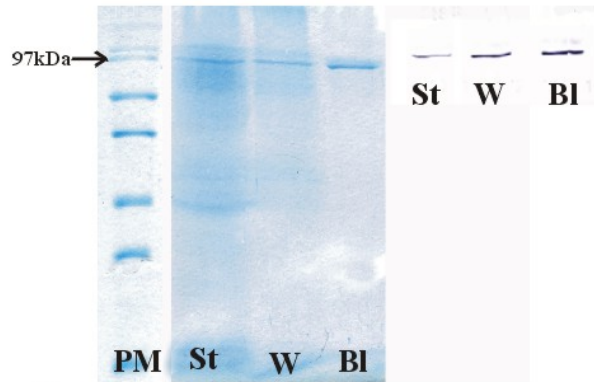


Abb. 245

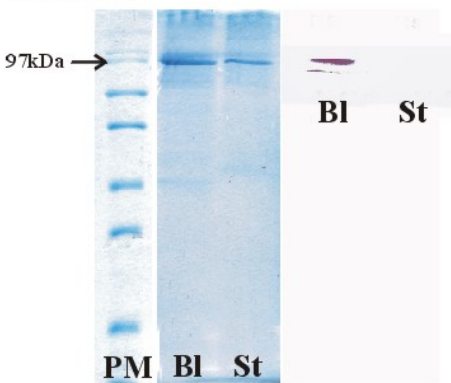


Abb. 246

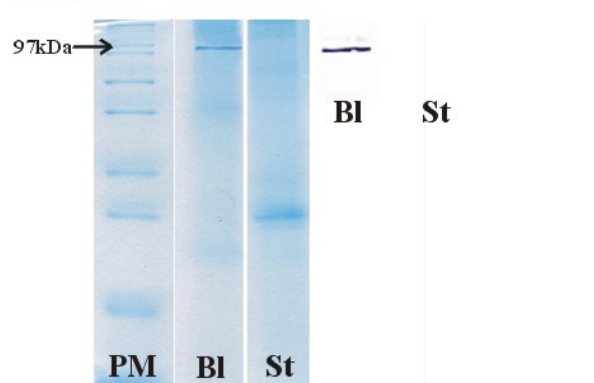


Abb. 247

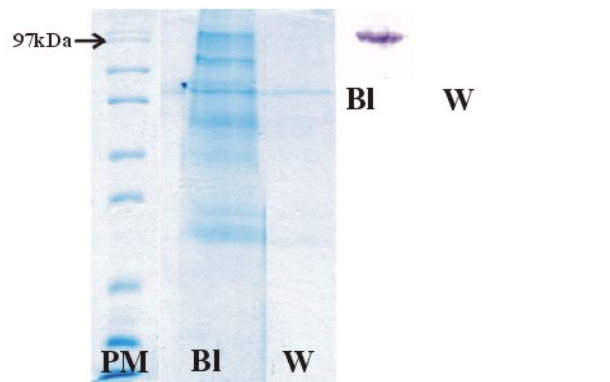


Abb. 248

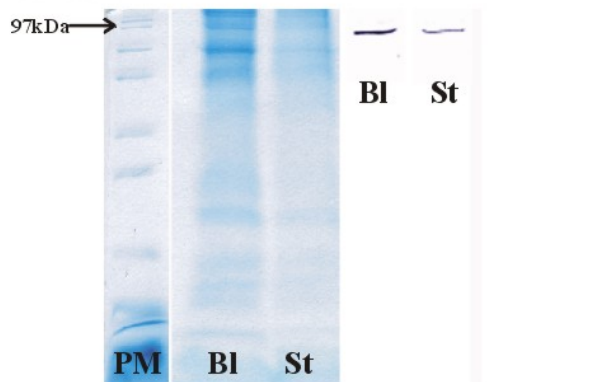


Abb. 249

Tafel 65



Abb. 250a

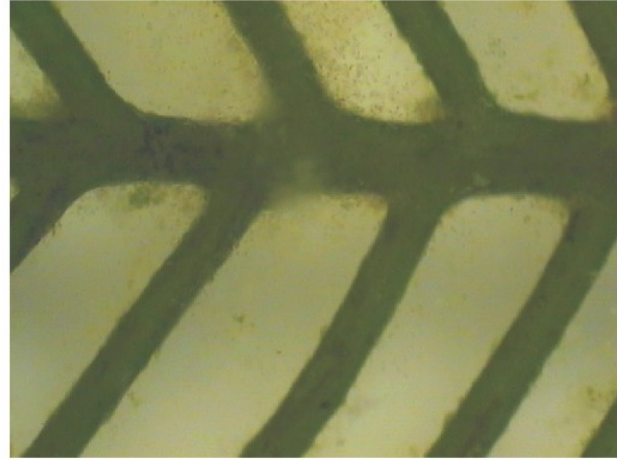


Abb. 250b

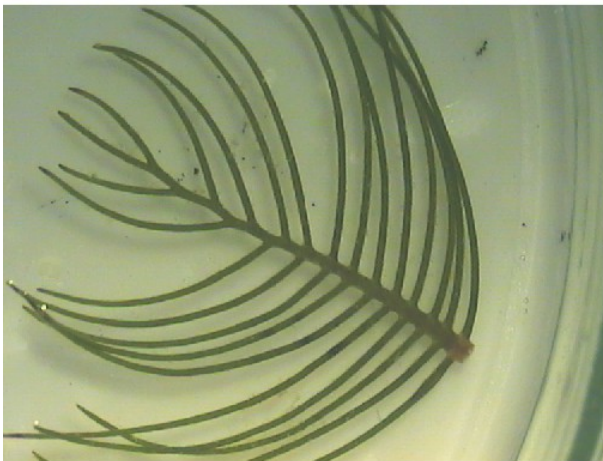


Abb. 251a

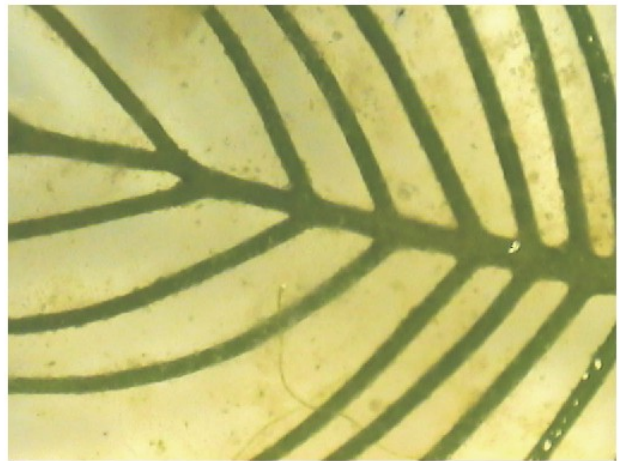


Abb. 251b



Abb. 252a

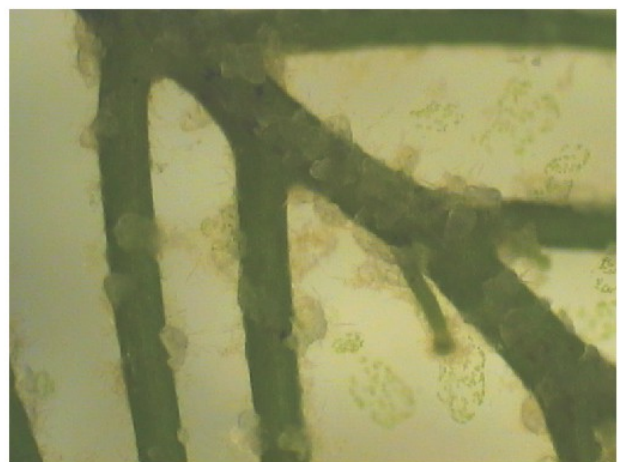


Abb. 252b

Tafel 66

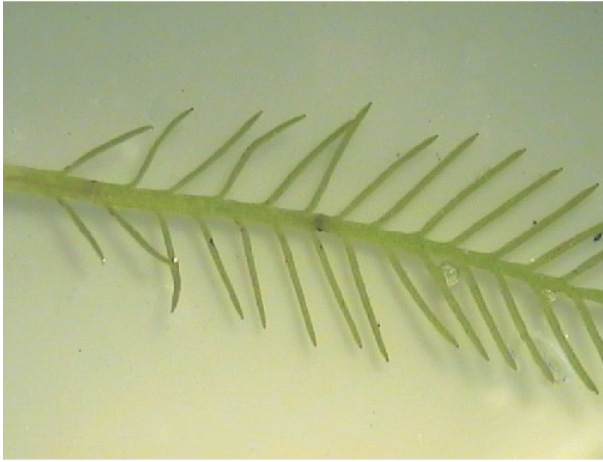


Abb. 253a



Abb. 253b

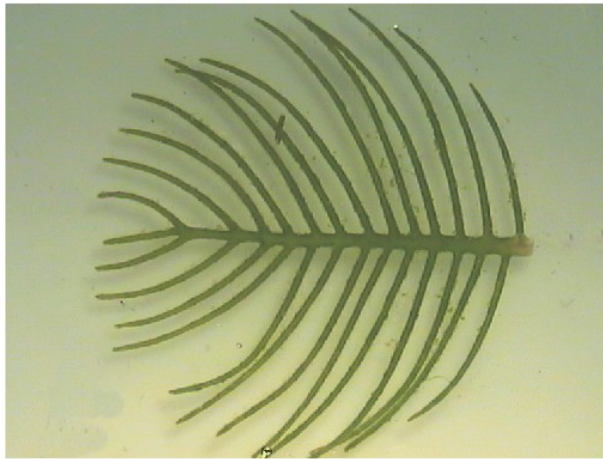


Abb. 254a

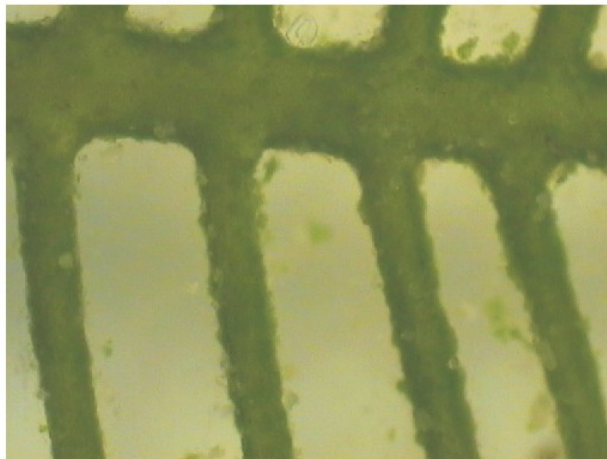


Abb. 254b

3.5.3 Vitalität der Pflanzen bei sich verändernden pH-Werten

Bei *M. spicatum* und *M. aquaticum*, deren pH im Wasserkörper sich im Laufe der fünf Wochen veränderte, konnten zunächst keine Veränderungen in ihren Aussehen festgestellt werden. Bei *M. aquaticum* wurde jedoch ein schnelleres Längenwachstum als bei *M. spicatum* beobachtet. Gleichzeitig bildeten sich am apikalen Ende ständig neue Blätter aus. Bei *M. spicatum* hingegen, zeigte sich ein langsames Wachstum und erst ab der dritten Woche konnten am apikalen Ende der Pflanze einige neue Blätter beobachtet werden.

Gegen Ende der Versuchszeit wurden bei *M. aquaticum* die Blattspitzen an den unteren Blättern gelb, eine vollständige Vergilbung blieb aber aus. Eine solche Degeneration war bei *M. spicatum* nicht zu beobachten. Dafür fanden sich an den Fiederblättchen kleine Kalkkristalle, die bis zum Ende der Laufzeit deutlich zunahm. Außerdem nahm bei *M. spicatum* der Grad der Veralgung deutlich zu (Abb. 254a,b). Bei *M. aquaticum* konnten dagegen weder Kalkablagerungen noch massenhaft Algen registriert werden (Abb. 253a,b).

3.5.4 pH-Schwankungen und CO₂-Konzentrationen bei *M. spicatum*

Die pH- Werte der Hälterungswässer aller drei Ansätze wurden zu Beginn des Versuchs auf pH 6,0, 7,0 und 8,0 eingestellt. Nach drei bis vier Tagen wurde das Wasser vollständig gewechselt und die pH-Werte neu eingestellt, so dass die Pflanzen bei verhältnismäßig konstanten pH-Werten wachsen konnten. Die pH-Schwankungen zwischen den Wasserwechseln wurden jeden Tag (vormittags) mit dem pH-Meter kontrolliert (siehe 2.9.1). Dabei wurde eine Erhöhung um etwa 1,0 pH-Einheiten akzeptiert.

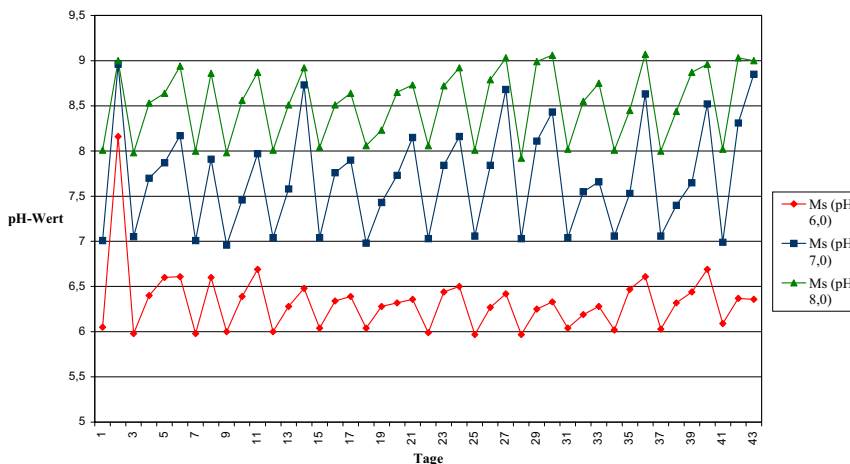


Abb. 255: pH Schwankungen bei *Myriophyllum spicatum* (Ms)

3. Ergebnisse

Zu Beginn des Versuchs stiegen die Werte aller drei Ansätze innerhalb von einem Tag auf pH 8.0 bis 9.0 an (siehe Abb. 255). Darauf hin wurden die Glaszylinder abgedeckt. Danach schwankten die Werte beim Ansatz pH 6.0 (rot) innerhalb des gesetzten Rahmens, zwischen 0.3 und 0.7 Einheiten. Beim Ansatz pH 7.0 (blau) war die Schwankungsbreite deutlich größer. Hier stiegen die Werte von einem auf den anderen Tag um mehr als das Doppelte an. Sie lagen zwischen 0.6 und 1.7 Einheiten. Im Ansatz pH 8.0 (grün) waren die pH-Schwankungen wieder geringer als bei pH 7.0. Sie lagen meistens um den 1.0 Einheiten herum.

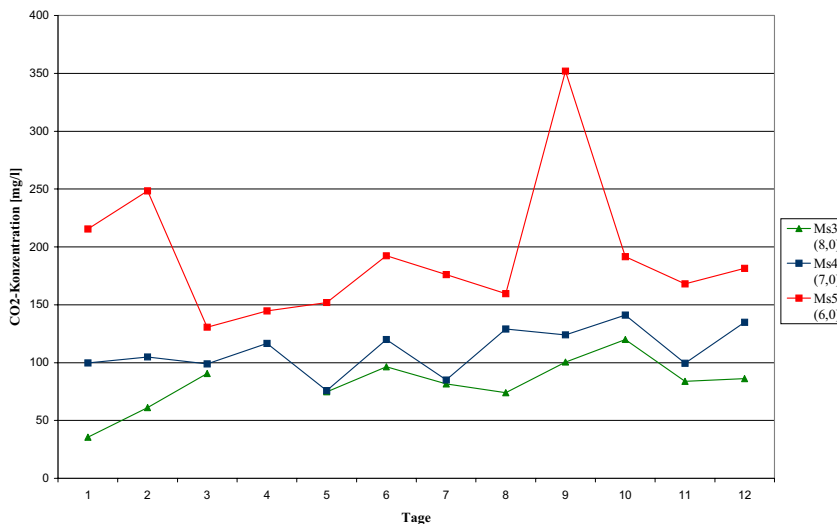


Abb.256: CO₂-Konzentrationen bei *M. spicatum* (Ms)

Neben den pH-Messungen wurde alle drei Tage vor dem Wasserwechsel der CO₂ Gehalt der drei Ansätze bestimmt (siehe 2.9.3). Bei pH 6.0 lag die Konzentrationen des Rest-CO₂, das noch im Medium zu finden war, deutlich höher als bei pH 7.0 und 8.0 (Abb. 256). Dafür zeigte sich eine größere Schwankungsbreite in den Werten. Bei pH 7.0 und 8.0 war der Gehalt an CO₂ deutlich weniger und die Schwankungen geringer. Bei pH 8.0 wies das Wasser die niedrigste CO₂-Konzentration auf (Abb. 256).

3.5.5 Veränderungen im pH bei *M. spicatum* und *M. aquaticum*

Die Hälterungswässer der beiden Wasserpflanzen *M. spicatum* und *M. aquaticum* wurden zu Beginn des Versuches auf pH 6.0 eingestellt. Über Wochen wurde der Verlauf des pH beobachtet.

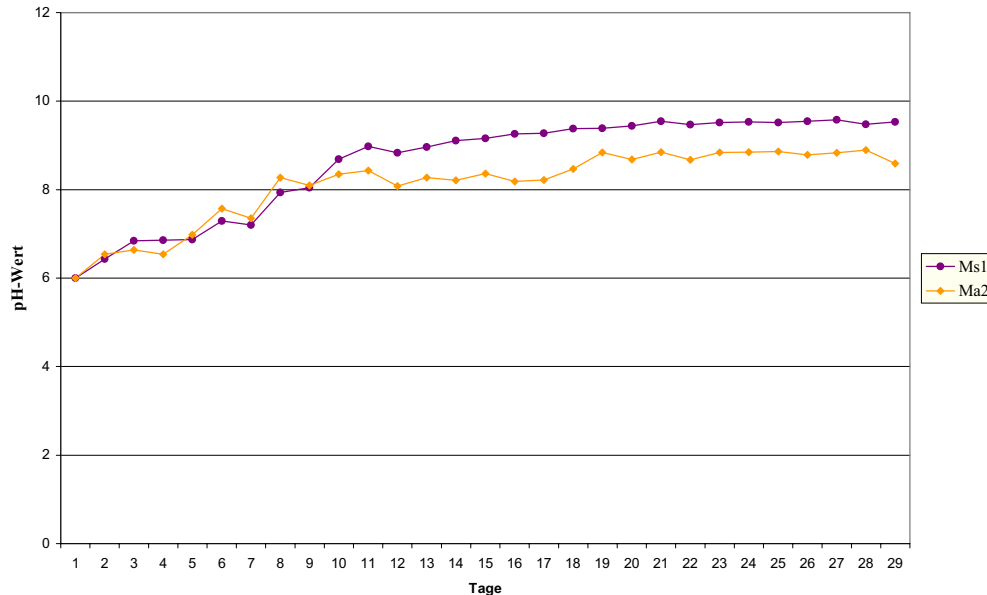


Abb. 257: pH-Verlauf bei *M. spicatum* (Ms) und *M. aquaticum* (Ma)

Die pH-Entwicklung bei beiden Pflanzen verlief zunächst annähernd gleich. Nach einem Ausgangswert von pH 6.0 stiegen die Werte innerhalb von neun Tagen auf etwa pH 8 an. Danach wurde die Verlaufskurve bei *M. aquaticum* (gelb) etwas flacher und der pH pendelte sich im Laufe der restlichen Versuchstage um 8.8 ein. Bei *M. spicatum* stieg die Kurve weiterhin leicht an. Sie erreichte am Ende Werte um 9,5 (Abb. 257).

Die CO₂-Konzentrationen im Wasser lagen zu Beginn des Versuchs bei 220 mg/l. Am Ende betragen sie bei *M. spicatum* 9,4mg/l und bei *M. aquaticum* 19,6mg/l. Weitere Messungen waren nicht möglich, da dafür jedesmal 100ml Wasser entnommen werden mußte (siehe 2.9.3).

3.5.6 Messung der Membranspannungen

Um einen weiteren Anhaltspunkt für die Vitalität der Pflanzen zu erhalten wurde einmal pro Woche die Membranspannung in den Fiederblättchen von *M. spicatum* und *M. aquaticum* in allen Versuchsansätzen gemessen. In Tabelle 10 sind die maximalen Spannungsamplituden zusammengestellt.

Tabelle 10: Max. Spannungsamplituden der Membranspannungen bei *M. spicatum* (Ms) und *M. aquaticum* (Ma)

Woche	Ms (var. pH)	Ma (var. pH)	Ms (pH 8)	Ms (pH7)	Ms (pH 6)
1.	-200mV	-120mV	-150mV	-185mV	-200mV
2.	-255mV	-155mV	-175mV	-150mV	-190mV
3.	-245mV	-157mV	-180mV	-190mV	-195mV
4.	-195mV	-185mV	-170mV	-200mV	-185mV
5.	-170mV	-205mV	-170mV	-165mV	-180mV

(Ms: *Myriophyllum spicatum*; Ma: *M. aquaticum*)

Die maximalen Spannungsamplituden der Membranspannungs-Messungen in den Blättern von *M. spicatum* nahm während der Versuchsdauer leicht ab. In Ansatz 1 mit *M. spicatum*, dessen pH sich mit der Zeit änderte (Tabelle 10, Spalte 2), stiegen die Spannungsamplituden im Laufe der Wochen zunächst leicht an und sanken dann wieder ab. In den Ansätzen 3, 4 und 5, mit *M. spicatum*, deren pH-Werte relativ konstant bei pH 8.0, 7.0 und 6.0, gehalten wurden, zeigten die Werte die gleiche Tendenz. Sie stiegen zunächst leicht an und fielen am Ende der Versuchszeit leicht ab. Die Höhe der Spannung variierte dabei etwas. Bei pH 8.0 lagen die Spannungsmessungen im Durchschnitt tiefer als bei den anderen Ansätzen. In Ansatz 2 mit *M. aquaticum*, dessen pH sich im Laufe des Versuchs veränderte, zeigte sich eine leichte Zunahme in den maximalen Spannungsamplituden.

3.5.7 Lokalisation der FITC-Fluoreszenz in *M. spicatum* und *M. aquaticum*

Von allen fünf Ansätzen wurden nach der ersten, dritten und fünften Versuchswoche Blattproben entnommen und für die konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie präpariert (siehe 2.5.1ff) und markiert. Die visuelle Auswertung ergab folgenden Befund.

In der ersten Woche nach Versuchsbeginn (n.V.) konnte in allen drei Ansätzen mit *M. spicatum* eine FITC-Fluoreszenz in den Epidermis- und Mesophyllzellen beobachtet werden (Abb. 258, 261, 264).

In der dritten Woche n.V. waren in den drei verschiedenen Ansätzen mit *M. spicatum* (pH 6.0, 7.0 und 8.0) leichte Unterschiede in der FITC-Fluoreszenz-Markierung zu erkennen. Bei pH 6.0 und 7.0 war nur noch wenig FITC-Fluoreszenz in den Epidermiszellen der Blätter zu erkennen (Abb. 265, 262). Dafür zeigten sich in den Mesophyllzellen noch deutliche Markierungen. Bei pH 8.0 waren sowohl in den Epidermiszellen, als auch in den Mesophyllzellen FITC-Fluoreszenz-Markierungen zu finden (Abb. 259).

In der fünften Woche n.V. waren in den Epidermiszellen der Blätter bei pH 8.0 und 7.0 von *M. spicatum* keine FITC-Fluoreszenz-Markierungen mehr zu beobachten (Abb. 260, 263). In den Mesophyllzellen zeigten sich bei pH 8.0 gelegentlich noch Markierungen, bei pH 7.0 waren noch erheblich mehr FITC-Fluoreszenz-Markierungen sichtbar (Abb. 263).

Tafel 67: Fluoreszenzmikroskopische Nachweise der PM-H⁺-ATPase in Blättern v. *M. spicatum*. Abb. 258: Fiederblatt nach einer Woche, pH 8.0. Abb. 259: Fiederblatt nach drei Wochen, pH 8.0. Abb. 260: Fiederblatt nach fünf Wochen, pH 8.0. Abb. 261: Fiederblatt nach einer Woche, pH 7.0. Abb. 262: Fiederblatt nach drei Wochen, pH 7.0. Abb. 263: Fiederblatt nach fünf Wochen, pH 7.0.

Tafel 68: Fluoreszenzmikroskopische Nachweise d. PM-H⁺-ATPase in Blättern v. *M. spicatum*. Abb. 264: Fiederblatt nach einer Woche pH 6.0. Abb. 265: Fiederblatt nach drei Wochen pH 6.0. Abb. 266: Fiederblatt nach fünf Wochen pH 6.0.

Tafel 69: Fluoreszenzmikroskopische Nachweise d. PM-H⁺-ATPase in Blättern v. *M. spicatum* und *M. aquaticum* bei unterschiedlichen pH-Werten. Abb. 267: *M. spicatum* nach einer Woche (pH 7,9). Abb. 268: *M. spicatum* nach drei Wochen (pH 9,5). Abb. 269: *M. spicatum* nach fünf Wochen (pH 9,6). Abb. 270: *M. aquaticum* nach einer Woche (pH 8,3). Abb. 271: *M. aquaticum* nach drei Wochen (pH 8,8). Abb. 272: *M. aquaticum* nach fünf Wochen (pH 8,3).

Tafel 67

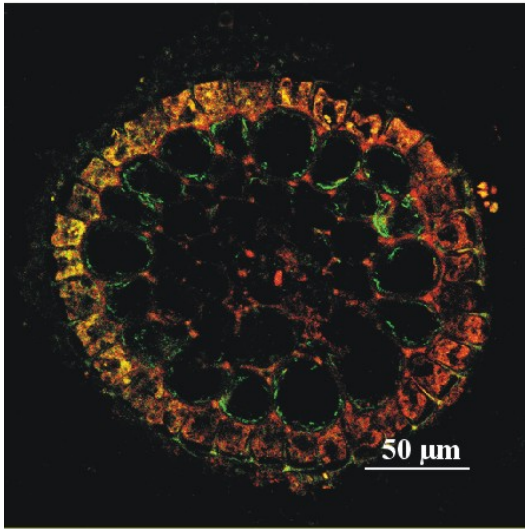


Abb. 258

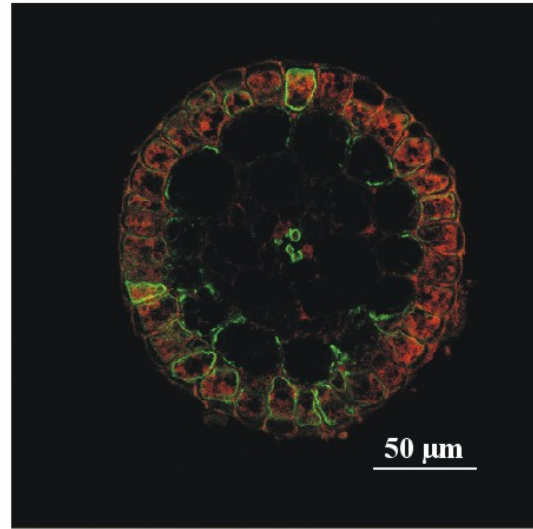


Abb. 261

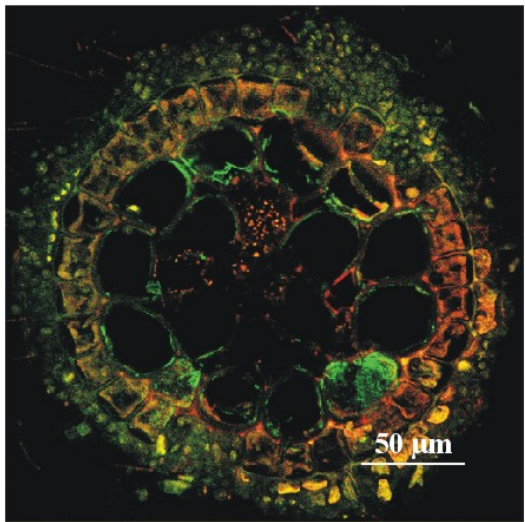


Abb. 259

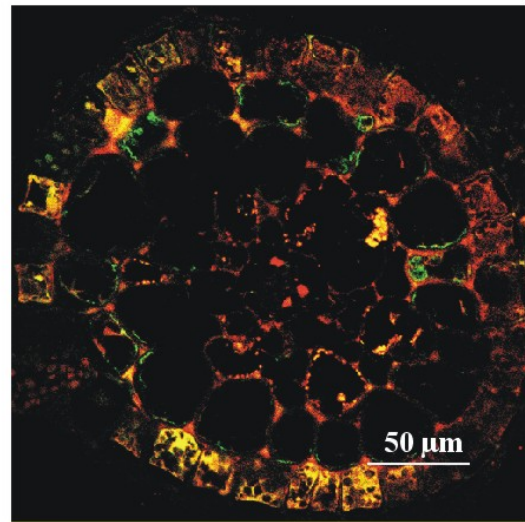


Abb. 262

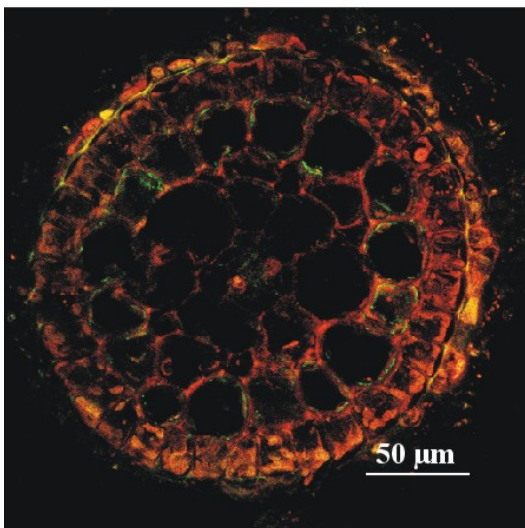


Abb. 260

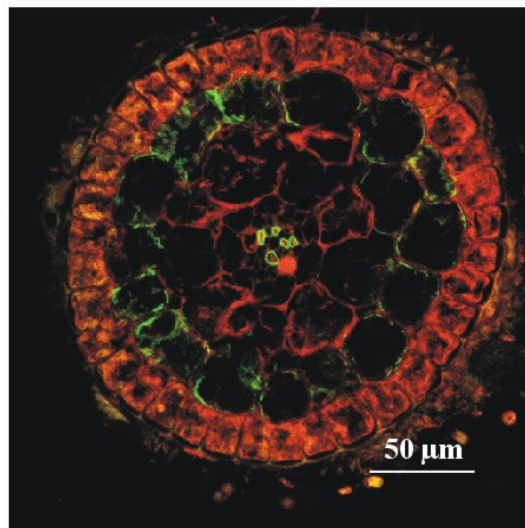


Abb. 263

Tafel 68

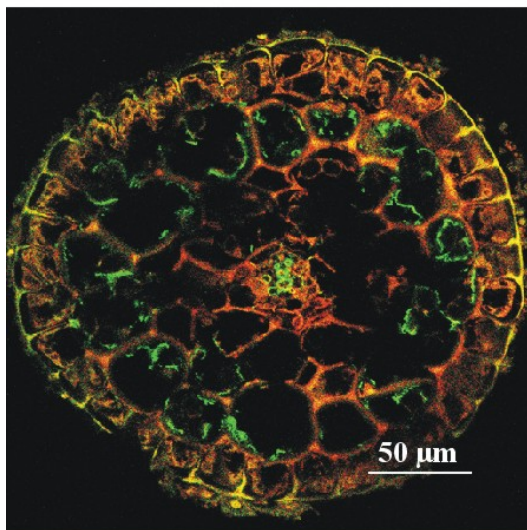


Abb. 264

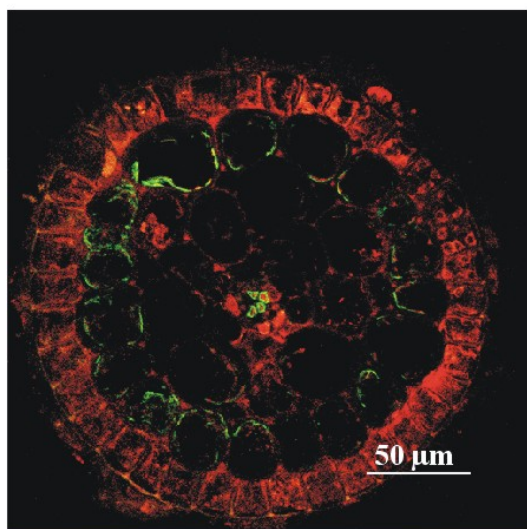


Abb. 265

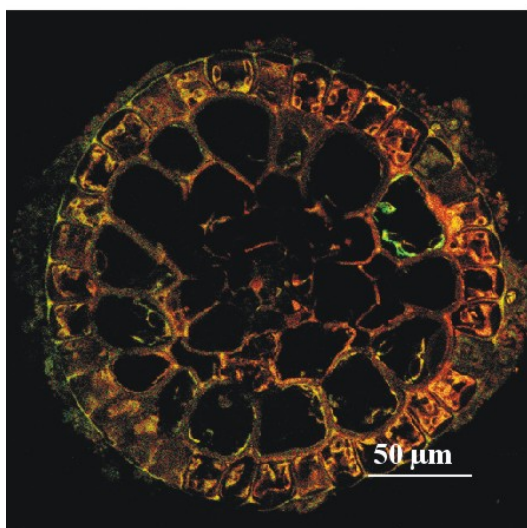


Abb. 266

Tafel 69

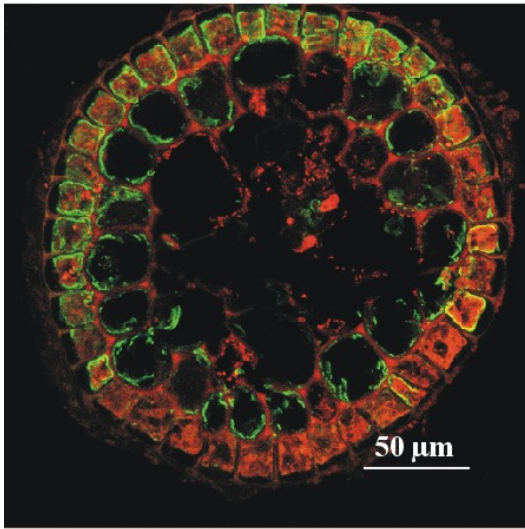


Abb. 267

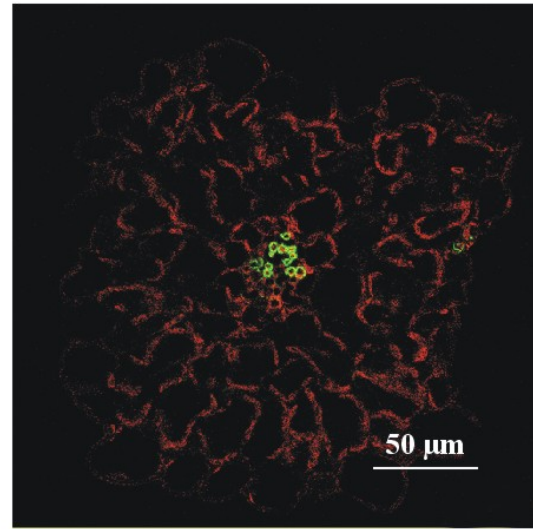


Abb. 270

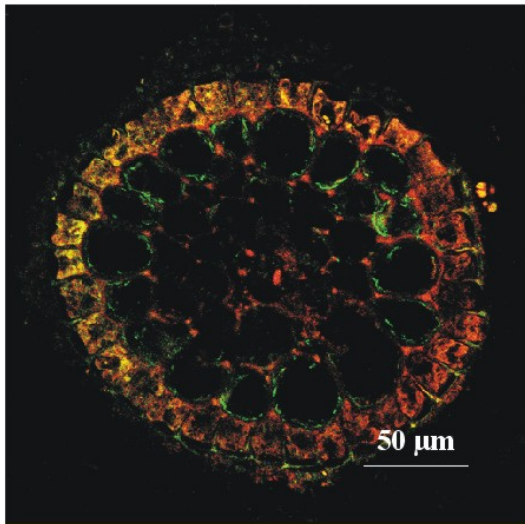


Abb. 268

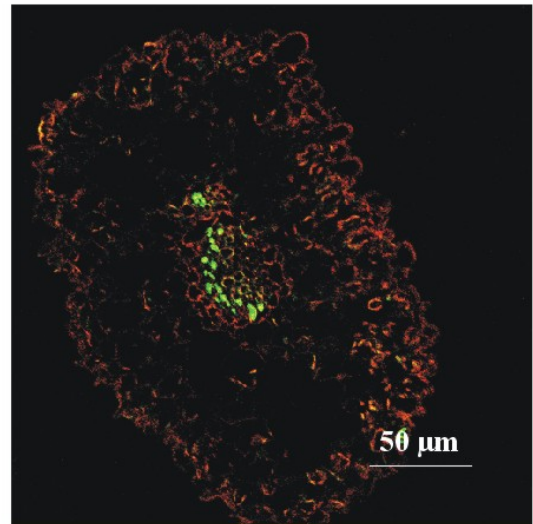


Abb. 271

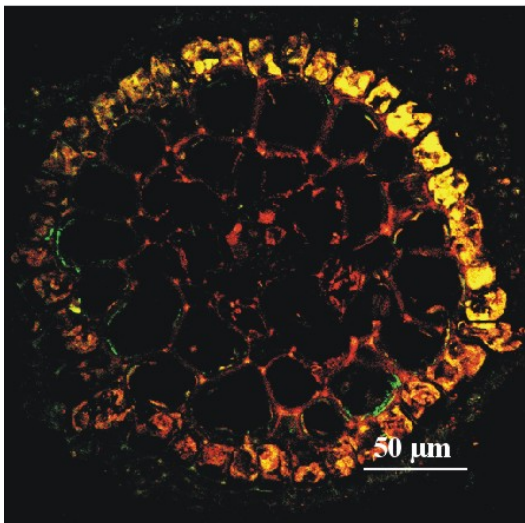


Abb. 269

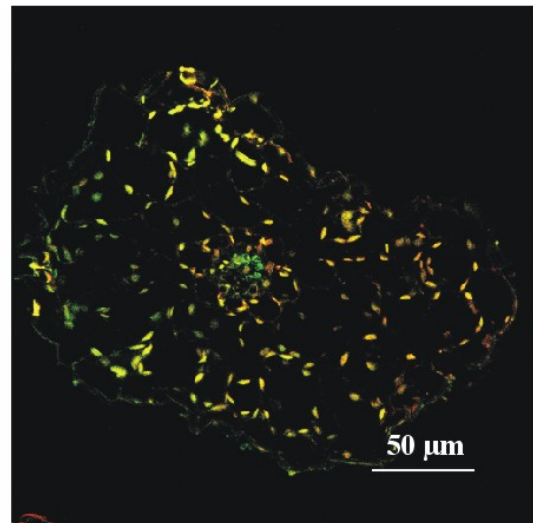


Abb. 272

An den Blättern von *M. spicatum*, dessen Wasser-pH sich kontinuierlich änderte, konnten die gleichen Beobachtungen gemacht werden wie bei den Ansätzen mit konstanten pH-Werten. In der ersten Woche n.V. konnten sowohl in den Epidermiszellen als auch in den Mesophyllzellen deutliche FITC-Fluoreszenz-Markierungen beobachtet werden (Abb. 267). Diese nahm bis zur dritten Woche n.V. deutlich ab. In den Epidermiszellen fanden sich jetzt nur noch sehr wenige Markierungen, in den Mesophyllzellen waren sie noch zahlreicher (Abb. 268). In der fünften Woche n.V. waren diese dann auch fast verschwunden (Abb. 269).

Bei *M. aquaticum*, hatte die kontinuierliche Erhöhung des pH anscheinend keinen Einfluss auf die Markierung der PM-H⁺-ATPase. Während der gesamten Laufzeit des Versuches konnten in dem zentralen Leitbündel FITC-Fluoreszenz-Markierungen lokalisiert werden (Abb. 271-273).

3.5.8 Messung der FITC-Fluoreszenz-Intensität

Mit Hilfe des Computerprogramms TCSNT konnte die Intensität der Fluoreszenz des Fluorochroms FITC in den Epidermiszellen von *M. spicatum* gemessen werden. Auf die Messungen der Intensitäten bei *M. aquaticum* wurde verzichtet, da sich während der gesamten Laufzeit des Versuchs die Intensitäten in den Leitbündeln, nach visuellen Beobachtungen nicht verändert hatten und eine genaue Messung wegen der geringen Größe der Zellen nicht möglich war.

Die Messungen stellen ein Mittel dar, um die visuell gemachten Beobachtungen unter 3.5.7 genauer zu bewerten. Die Profile für die Intensitätsmessungen wurden stets von den periklinen Außenseiten der Epidermiszellen zu den periklinen Innenseiten gezogen, so dass der Beginn der Kurve (links) die Außenseiten der Zellen darstellen und das Ende der Kurve (rechts) die Innenseiten (siehe 2.9.5). Die Diagramme auf den Tafeln 70-73 zeigen als Beispiel eine Messung der FITC-Fluoreszenz-Intensität. Das dazugehörige Profil, seine Lage und seine Länge, wurden in dem Bild daneben gelb markiert.

Im Versuchsansatz mit *M. spicatum*, deren pH im Wasser sich während der Versuchszeit langsam änderte (siehe 3.5.5), nahm die Intensität der FITC-Fluoreszenz in den Epidermis- und Mesophyllzellen ständig ab. Während nach der ersten Woche nach Versuchsbeginn (n.V.) an den periklinen Außenwänden der Epidermiszellen noch Intensitäten gemessen werden konnten (Abb. 273a,b), fanden sich in der 3. Und 5. Woche n.V. kaum noch Intensitäten an den Außenwänden. An den periklinen Innenwänden blieben die FITC-Fluoreszenz-Intensitäten etwas länger erhalten. Man konnte sie in der 3. Woche n.V. noch messen (Abb. 274b). Erst in der 5. Woche n.V. waren sie kaum noch messbar (Abb. 275a,b).

Bei dem Versuchsansatz von *M. spicatum* in Wasser, dessen pH bei 8.0 lag, zeigte sich in den Intensitätsmessungen zunächst ein ähnliches Bild. Nach der 1. Versuchswoche waren an den periklinen Außenseiten und den Innenseiten noch FITC-Fluoreszenz-Intensitäten zu messen, die für die Außenseiten meist niedriger ausfielen, als für die Innenseiten (Abb. 276a,b). In der 3. Woche nach Versuchsbeginn war die FITC-Fluoreszenz an den Außenseiten deutlich geringer geworden. Zur periklinen Innenseite hin und in den Mesophyllzellen zeigten sich jedoch deutliche Markierungen, deren Intensitäten in den Mesophyllzellen am höchsten waren (Abb. 277a,b). In der fünften Woche waren an den periklinen Außenseiten nur noch geringe FITC-Fluoreszenz-Intensitäten zu messen. Die höchsten Intensitäten fanden sich in den Mesophyllzellen die direkt unterhalb der Epidermiszellen lagen (Abb. 278a,b).

Auch in den Ansätzen in denen die Hälterungswässer von *M. spicatum* pH-Werte von 7.0 und 6.0 hatten, konnten in der ersten Woche n.V. an den periklinen Außenseiten und den periklinen Innenseiten der Epidermiszellen sowie in den Mesophyllzellen deutliche FITC-Fluoreszenz-Intensitäten gemessen werden. Sie waren jedoch an den periklinen Außenseiten der Epidermiszellen deutlich geringer als an den periklinen Innenseiten (Abb. 279a,b; 282a,b).

In der 3. Woche n.V. zeigten sich in *M. spicatum* bei pH 7.0 nur noch in den Mesophyllzellen FITC-Fluoreszenz-Intensitäten. An den periklinen Außen- und Innenseiten waren kaum Intensitäten zu messen (Abb. 280a,b). Bei pH 8.0 war zu diesem Zeitpunkt in den Epidermiszellen noch eine FITC-Fluoreszenz-Intensität zu messen. In beiden Ansätzen fand sich die höchste Intensität in den Mesophyllzellen (Abb. 283a).

In der 5. Woche n.V. fanden sich bei pH 7.0 kaum noch messbare Intensitäten an den Epidermiszellen (Abb. 281a,b). Auch in den Mesophyllzellen konnten nur noch geringe Intensitäten gemessen werden. Bei pH 6.0 waren dagegen in der letzten Versuchswoche noch deutliche FITC-Fluoreszenzen zu messen (Abb. 284a,b), die vor allem an den periklinen Innenseiten der Epidermiszellen und den Mesophyllzellen zu finden waren.

Messungen der FITC-Fluoreszenz-Intensitäten an Blättern von *M. spicatum*

Tafel 70: Messung der Intensitäten bei einem variablen pH: Abb. 273a,b: nach einer Woche. Abb. 274a,b: Nach drei Wochen. 275a,b: Nach fünf Wochen

Tafel 71: Messung der Intensitäten bei pH 8.0: Abb. 276a,b: nach einer Woche. Abb. 277a,b: Nach drei Wochen. 278a,b: Nach fünf Wochen

Tafel 72: Messung der Intensitäten bei pH 7.0: Abb. 279a,b: nach einer Woche. Abb. 280a,b: Nach drei Wochen. 281a,b: Nach fünf Wochen

Tafel 73: Messung der Intensitäten bei pH 6.0: Abb. 282a,b: nach einer Woche. Abb. 283a,b: Nach drei Wochen. 284a,b: Nach fünf Wochen

Abkürzungen der Tafeln 70-72:

Perikline Außenseite der Zelle (AS); perikline Innenseite der Zelle (IS); Mesophyllzelle (Me);

Tafel 70

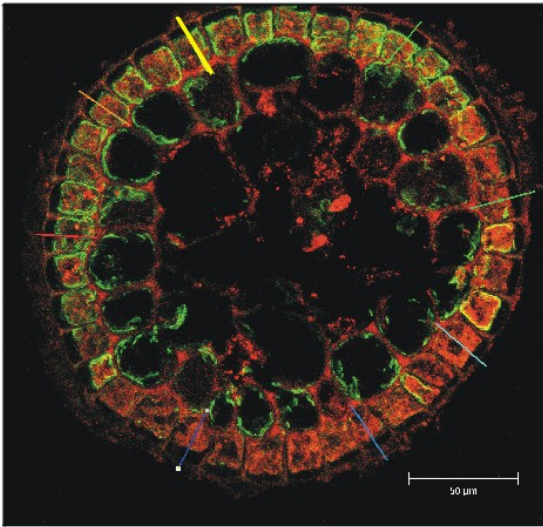


Abb. 273a

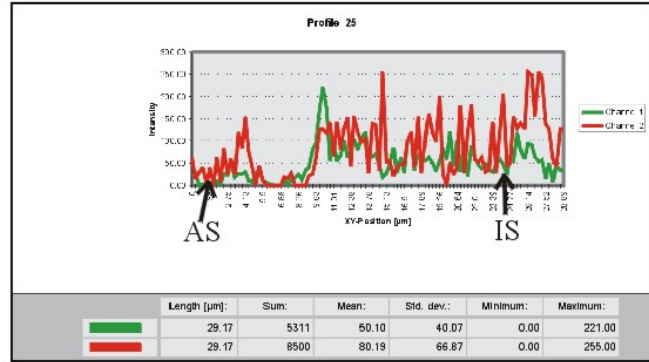


Abb. 273b

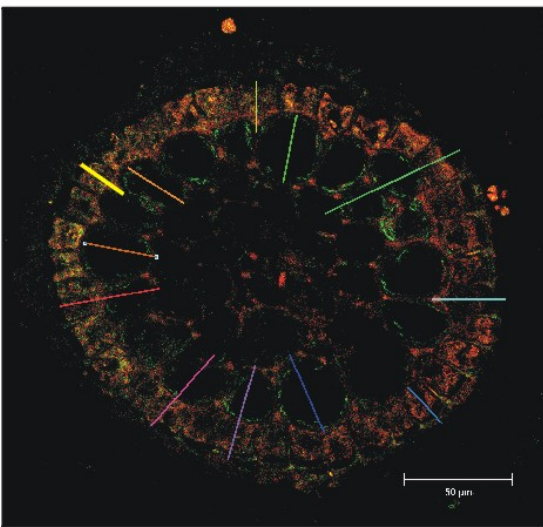


Abb. 274a

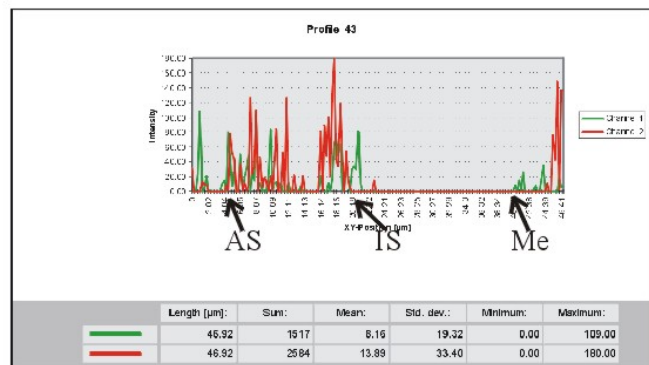


Abb. 274b

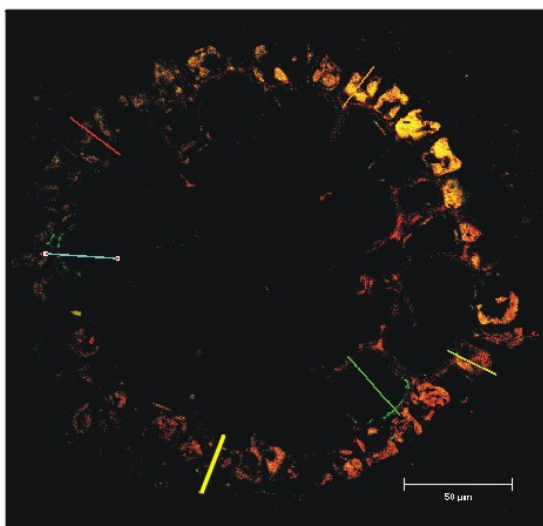


Abb. 275a

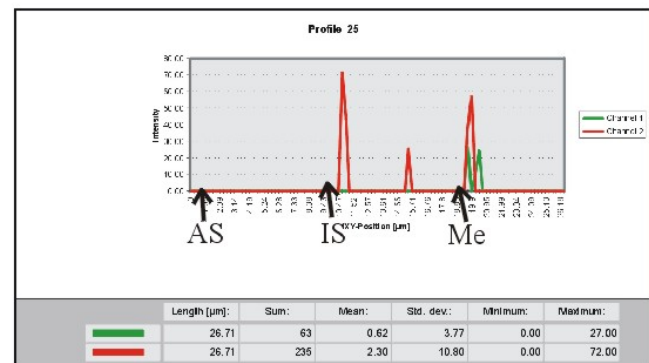


Abb. 275b

Tafel 71

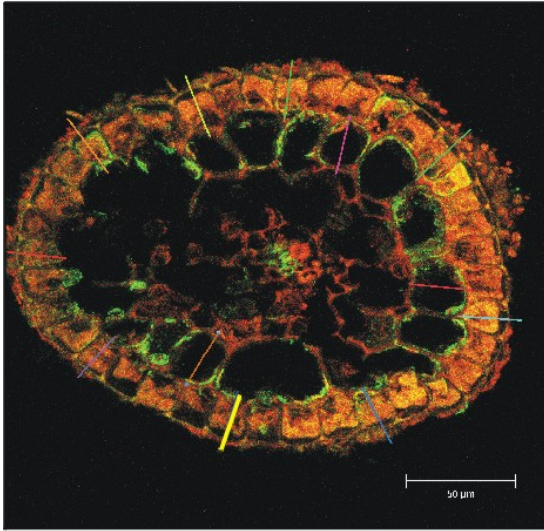


Abb. 276a

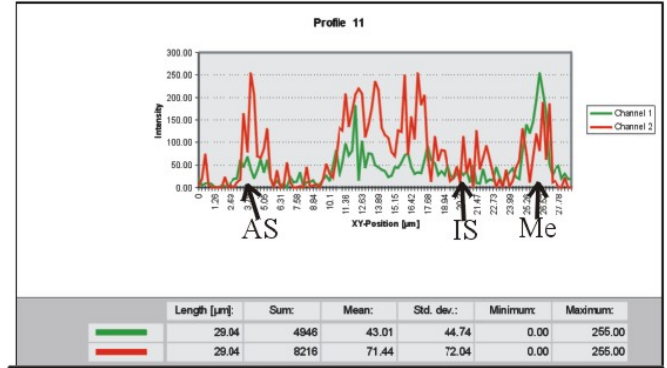


Abb. 276b

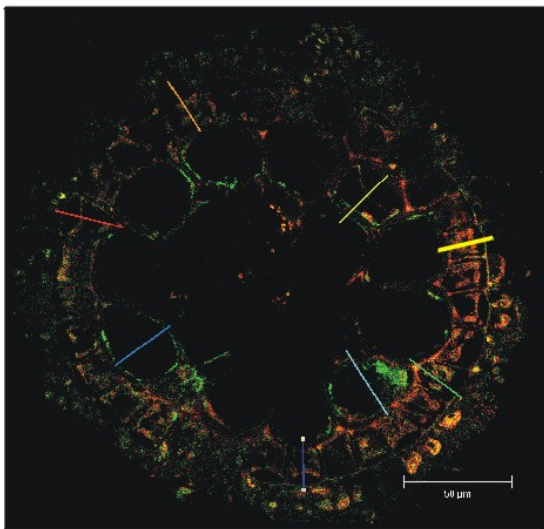


Abb. 277a

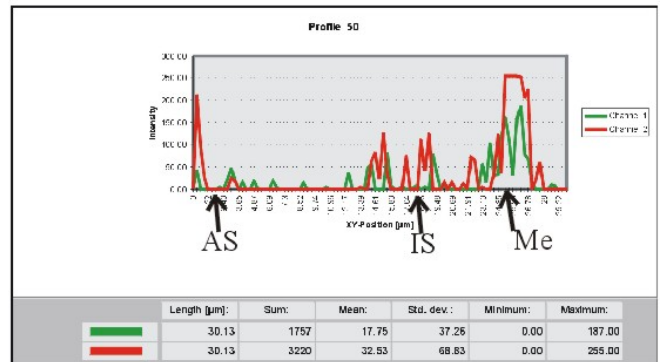


Abb. 277b

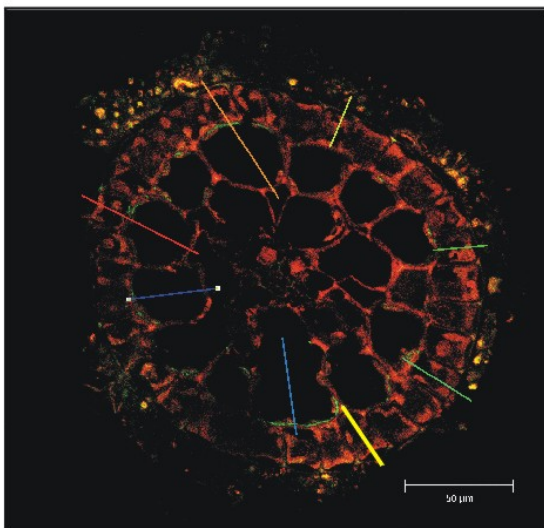


Abb. 278a

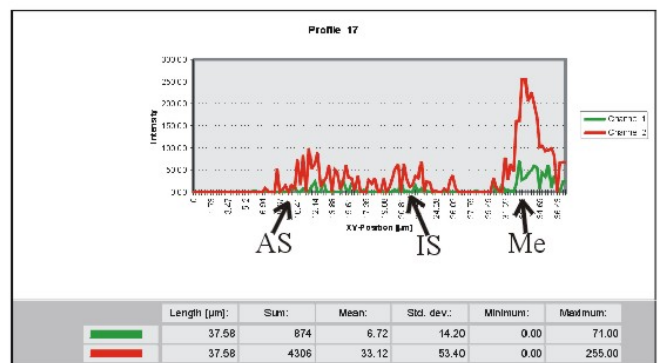


Abb. 278b

Tafel 72

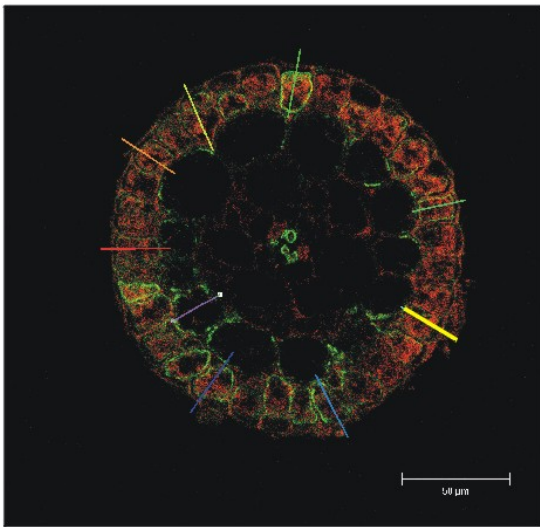


Abb. 279a

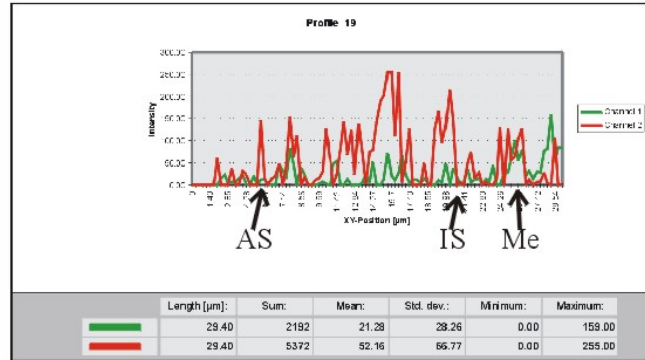


Abb. 279b

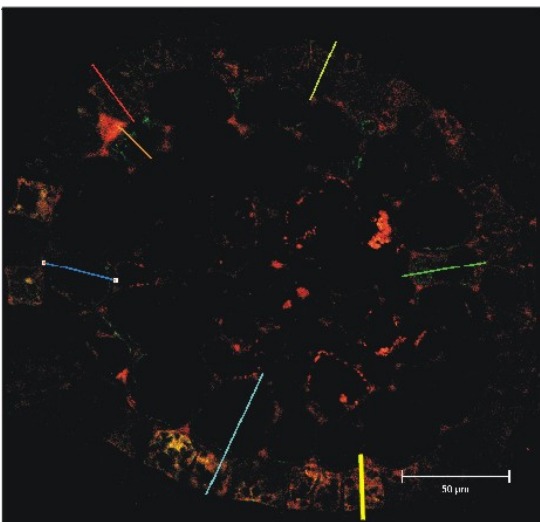


Abb. 280a

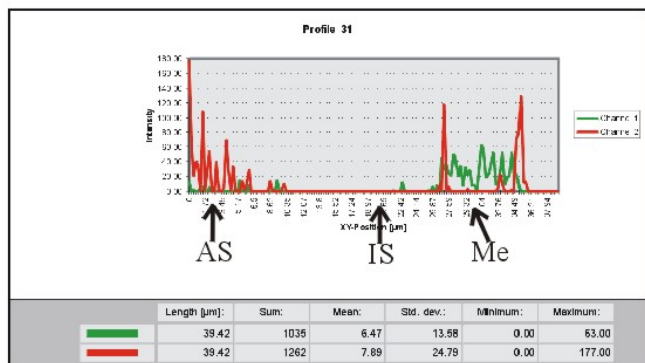


Abb. 280b

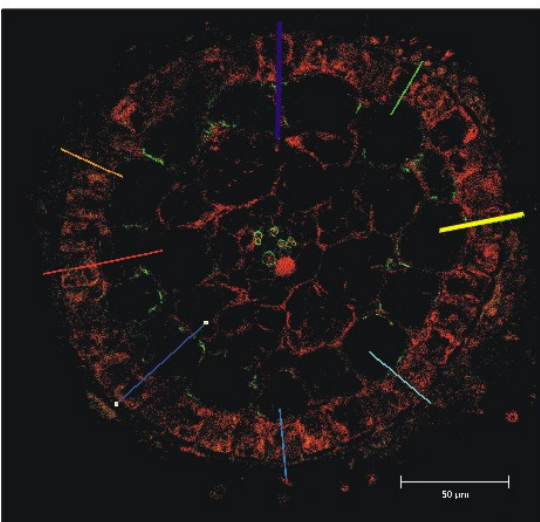


Abb. 281a

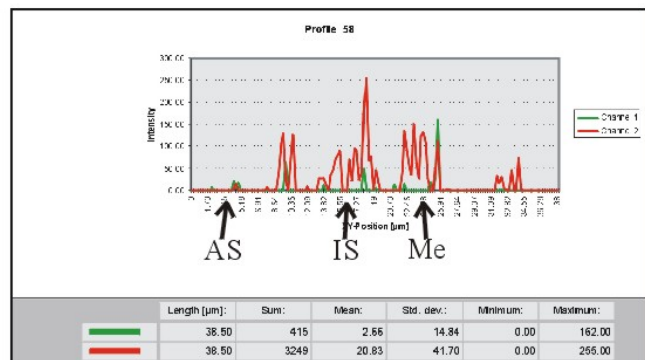


Abb. 281b

Tafel 73

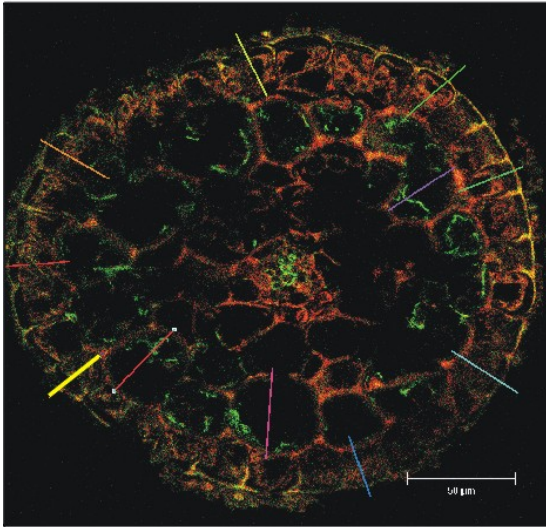


Abb. 282a

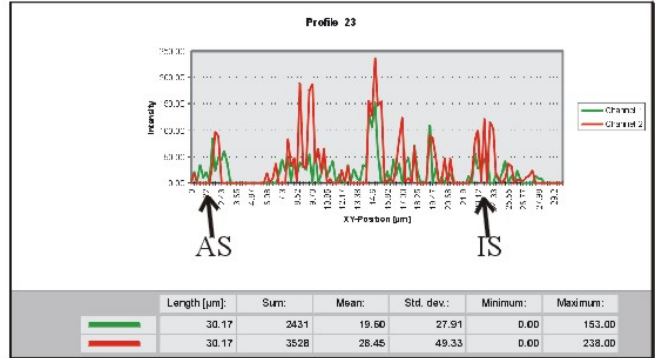


Abb. 282b

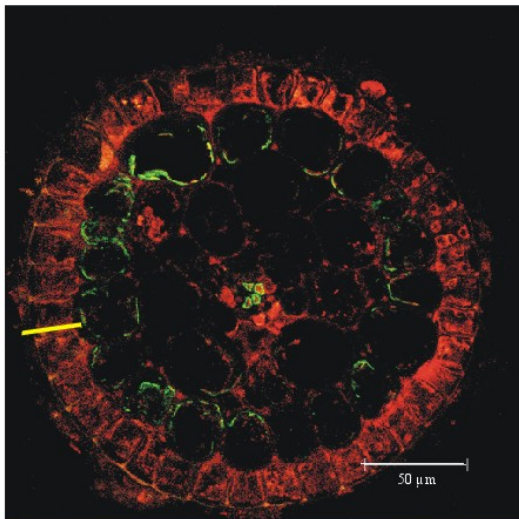


Abb. 283a

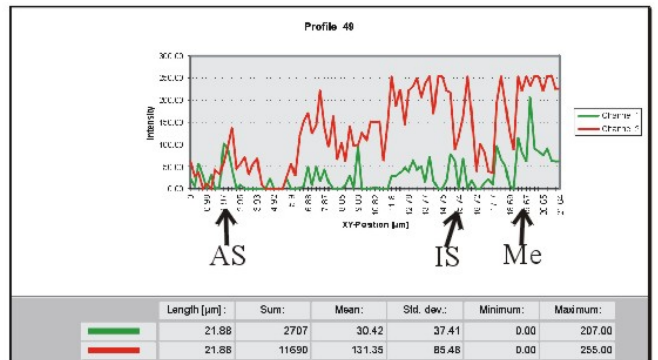


Abb. 283b

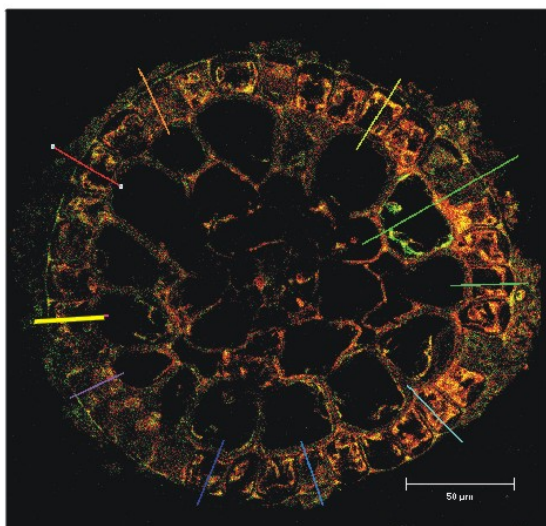


Abb. 284a

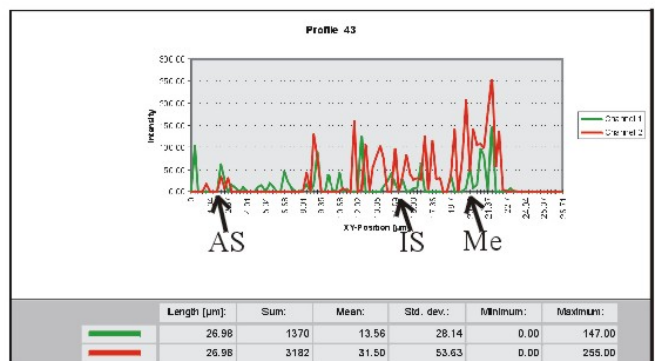


Abb. 284b

4. Diskussion

4.1 Physiologische Polarität an Blättern von Hydrophyten

Die Blätter einiger submerser Makrophyten zeigten bei Belichtung eine auffällige physiologische Polarität, die bei Dunkelheit nicht zu finden war. Die Umgebungen ihrer morphologischen Blattoberseiten (adaxial) wurden alkalisch und die morphologischen Blattunterseiten (abaxial) säuerten sich an. Dieses Phänomen wurde bei *Potamogeton lucens*, *P. perfoliatus*, *Elodea canadensis*, *E. nuttallii* und in geringem Maße auch bei den Schwimmblättern von *P. natans* gefunden. Auch die Blätter von *Vallisneria spiralis* zeigten eine Polarität. Diese fand sich jedoch nicht auf den abaxialen und adaxialen Seiten des Blattes wieder, sondern war als unterschiedlich breite Bande auf jeweils einer Seite des Blattes zu sehen. Arens (1933) berichtete, dass sich die Blätter von *V. spiralis* auf der Seite ansäuerten, die zuvor bestrahlt wurden. Das würde das unterschiedliche Verhalten der Pflanzen erklären, dass sich an der Blattspitze einmal die Blattunterseite ansäuerte und einmal die Blattoberseite. Andere Wasserpflanzen, wie *Stratiotes aloides*, die Unterwasserblätter von *P. natans*, *Myriophyllum spicatum* und *Cabomba caroliniana* zeigten dagegen eine Ansäuerung ihrer unmittelbaren Umgebung. Viele der untersuchten Pflanzen wiesen aber keine Reaktionen auf. Dazu gehörten u.a. *Hippuris vulgaris*, *M. verticillatum*, *M. aquaticum* sowie *Ceratophyllum demersum*, *C. submersum* und *Ranunculus penicillatus*.

Das Auftreten einer physiologischen Polarität und auch das Vermögen, die unmittelbare Umgebung der Blattoberflächen anzusäuern, hängt mit der Fähigkeit der Nutzung von Hydrogenkarbonat als Kohlenstoffquelle zusammen (Elzenga und Prins, 1989a). Durch die aktive Abgabe von H^+ -Ionen (Weisenseel und Linder, 1990) in die Grenzschicht an der Blattoberfläche verschiebt sich dort das Gleichgewicht zwischen HCO_3^-/CO_2 in Richtung CO_2 . Dadurch erhöht sich dessen Konzentration in dieser Grenzschicht und es kann aufgrund des Konzentrationsgefälles durch die Plasmamembran in die Zellen diffundieren (Elzenga und Prins, 1989b). Gleichzeitig mit der Protonenabgabe und einer K^+ -Aufnahme an der abaxialen Blattseite werden die adaxialen Blattseiten für OH^- -Ionen durchlässig und gelangen so in die Grenzschicht der Blattoberflächen (Weisenseel und Linder, 1990; Prins et al., 1982). Neben den Änderungen der pH-Werte ihrer Umgebung entsteht dadurch eine elektrische Potentialdifferenz zwischen den Blattober- und -unterseiten, die mehrere Millivolt beträgt, sowie ein Netto-Kationen-Strom von der Unter- zur Oberseite (Elzenga und Prins, 1989a). Ob es sich tatsächlich um eine Abgabe von H^+ - und OH^- -Ionen oder vielmehr um Aufnahmen von OH^- - und H^+ -Ionen handelt, ist noch nicht ganz geklärt, da stets nur deren Auswirkungen beschrieben wurden.

Alle untersuchten Pflanzen, bei denen eine physiologische Polarität auftrat, oder die ihre Grenzschicht an der Blattoberfläche ansäuerten, nutzen neben CO_2 auch HCO_3^- (vgl. 3.3.1.1.1, Tabelle 8). Bei Wasserpflanzen, die weder eine Polarität noch eine Ansäuerung zeigten, konnte lt. Literatur auch keine HCO_3^- -Nutzung festgestellt werden. Aufgrund ihrer Lebensweise ist dies auch einleuchtend. Zum Beispiel handelt es sich bei *Hippuris vulgaris* um einen Helophyten (Sumpfpflanze), der lediglich für kurze Zeit im Frühjahr nach dem Austrieb völlig unter Wasser lebt. Seine Blätter durchstoßen bald die Wasseroberfläche, so dass die Pflanzen an der Luft assimilieren (Casper und Krausch, 1980b). Es besteht somit nicht die Notwendigkeit, Mechanismen zu entwickeln, um HCO_3^- nutzen zu können. Das Gleiche gilt für das Tausendblatt *Myriophyllum aquaticum*. Es kommt aus Südamerika und lebt dort meist als Helophyt

am Ufer von eher sauren Gewässern (deWit, 1990). Nur bei uns wird es in Aquarien als rein submerse Pflanze gehalten, die saures Wasser benötigt. Auch *Myriophyllum verticillatum* benötigt solche Mechanismen nicht, da sie in eher sauren Gewässern zu finden ist (Krausch, 1996). Die beiden Hornkraut-Arten *Ceratophyllum demersum* und *C. submersum* kommen jedoch bevorzugt in kalkreichen Gewässern vor (Krausch, 1996). Eigentlich müsste bei ihnen ebenfalls eine Ansäuerung oder Polarität an den Blattoberflächen zu finden sein. Da dies nicht der Fall ist, könnten die Versuchsbedingungen ungünstig für die Pflanzen gewesen sein. Dass *C. demersum* HCO_3^- nutzt, haben van Haller und Bows (1976) festgestellt. Auch der Nachweis einer PM-H^+ -ATPase im Plasmalemma der Epidermiszellen deutet darauf hin (siehe 3.3.2.2). Da bei jeder Pflanzenart die polare Phase zu einem individuellen Zeitpunkt beginnt und in ihrer Dauer variiert (Miedema und Prins, 1992), liegt die Vermutung nahe, dass die anfängliche Belichtungszeit von 30min (siehe 2.7) zu lang und die polare Phase schon vorüber war. Der Lichtkompensationspunkt ist für jede Pflanze unterschiedlich und liegt bei Schattenpflanzen deutlich vor dem von Sonnenpflanzen. Aufgrund der dunkelgrünen Blattfarbe, der Abwesenheit von Stärkekörnern und der vielen kleinen Granastapel in den Chloroplasten kann *C. demersum* im Vergleich zu anderen Wasserpflanzen als Schattenpflanze angesehen werden. Das bedeutet, dass sie das Plateau der maximale Photosyntheserate eher erreicht, als andere Wasserpflanzen, bei gleicher Lichtintensität und einer bestimmten DIC-Konzentration (dissolved inorganic carbon) im Medium. Eine Erhöhung der CO_2 -Konzentration im Cytoplasma kann somit zu keiner weiteren Erhöhung der Photosyntheserate führen. Eine H^+ -Abgabe ist für die Pflanze zu diesem Zeitpunkt nicht mehr sinnvoll, da das entstehende CO_2 nicht mehr genutzt werden kann. Elzenga und Prins (1989a,b) wiesen nach, dass, bei konstanten Lichtintensitäten hohe CO_2 -Konzentrationen die H^+ -Abgaben an den Blattoberflächen unterdrücken können. Sie zeigten aber auch, dass durch eine Erhöhung der Lichtintensitäten diese Hemmung bei *Elodea canadensis* wieder aufgehoben werden kann.

Auch *R. penicillatus* zeigte im Polaritätsversuch (siehe 3.1ff) weder eine Polarität, noch eine Ansäuerung der Blattoberflächen. Newman und Raven (1999) wiesen jedoch nach, dass auch diese flutende Wasserpflanze HCO_3^- nutzen kann. Entweder lagen auch bei ihr die Versuchsbedingungen so, dass sie außerhalb ihrer polaren Phase untersucht wurde, oder die Abwesenheit einer Ansäuerung der Grenzflächen liegt in der besonderen Struktur der Epidermiszellen begründet (siehe 4.2.1).

Neben dem Einfluss der DIC-Konzentration und einer entsprechenden Lichtintensität hat auch die Lichtqualität einen Einfluss auf die Abgabe von H^+ -Ionen und somit auf die Ausbildung einer Polarität bzw. einer Ansäuerung der Grenzschicht. Die Blätter wurden mit Weißlicht mit einer Beleuchtungsstärke von $140 \mu\text{mol Quanten} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ bestrahlt. Nach den Untersuchungen von Marrè et al. (1989) hätte eine Bestrahlung mit Rotlicht den größten Effekt auf die H^+ -Abgabe gehabt, gleich gefolgt von weißem Licht. Aber auch bei Grün- und Blaulichtbestrahlung fände noch eine Ansäuerung der Umgebung statt.

Auch der pH-Wert an der Blattoberfläche der adaxialen Seite hat einen Einfluss auf die Bildung einer Polarität. Ein niedriger pH an der adaxialen Blattoberseite hat zur Folge, dass sich die Protonenpermeabilität an der Plasmamembran reduziert und so die Polaritätsbildung unterbleibt (Miedema und Prins, 1992). Im Gegensatz dazu bewirkt ein hoher pH an der adaxialen Blattoberseite eine hohe H^+ -Permeabilität an der Plasmamembran, was die Ausbildung einer physiologischen Polarität zur Folge hat (Miedema et al., 1996).

Die physiologischen Polaritäten bei einigen Blättern von Submersophyten werden nach den Hypothesen von Prins et al. (1982) durch eine H^+ -Abgabe an der morphologischen Blattunterseite (abaxial) und eine OH^- -Abgabe an der Blattoberseite (adaxial) hervorgerufen. Gleichzeitig entsteht dadurch eine elektrische Potentialdifferenz, durch die ein K^+ -Transport von der Blattunterseite zur Blattoberseite möglich ist, der apoplastisch oder symplastisch (Helder, 1975) erfolgen kann. Die Nutzung von HCO_3^- bei nicht polaren Wasserpflanzen, wie *S. aloides*, *M. spicatum* und *C. caroliniana* soll auf die selbe Art und Weise auf „submikroskopischem Raum“ erfolgen. Da jedoch stöchiometrisch ein H^+ ausreicht, um ein Molekül HCO_3^- in ein CO_2 umzuwandeln, und pro aufgenommenes CO_2 ein OH^- abgegeben wird (Prins et al., 1980), müssten sich die Blattoberflächen dieser Pflanzen neutral verhalten, wenn quasi nebeneinander OH^- und H^+ Ionen abgegeben würden. Da aber bei den meisten der hier untersuchten Pflanzen eine eindeutige Ansäuerung an den Blattoberflächen zu verzeichnen ist, ist diese Theorie so nicht zu halten.

Eine andere Theorie von Lucas (1983) postuliert unter anderem einen H^+/HCO_3^- -Symport. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass bei einem solch niedrigen pH, wie er an der Blattoberfläche zu finden ist, der meiste Kohlenstoff in Form von CO_2 vorliegt und somit für einen Transport von HCO_3^- wenig übrig bleibt.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine zeitlich versetzte Abgabe von H^+ -Ionen und OH^- -Ionen. Während der „polaren Phase“ der Pflanzen (Miedema und Prins, 1992) könnten H^+ -Ionen an das Medium abgegeben werden, um so CO_2 durch Diffusion aufzunehmen. Anschließend würden zum Ausgleich OH^- -Ionen nach außen abgegeben werden. Dies würden Untersuchungen an *Myriophyllum spicatum* bestätigen, bei denen trotz intensiver Belichtung der pH an den Blattoberflächen im alkalischen Bereich lag (Abb. 20). Denkbar wäre dann auch ein Antiport nach dem Mitchell-Typ (Lucas, 1983), mit dem in der nichtpolaren Phase OH^- -Ionen im Austausch mit HCO_3^- -Ionen transportiert werden würden (siehe auch 4.3.5).

Man kann also festhalten, dass eine physiologische Blattpolarität nur bei solchen submersen Angiospermen zu finden ist, die ausschließlich unter Wasser assimilieren und in kalkreichen Gewässern leben. Bei Hydrophyten, die in einem eher sauren Milieu wachsen, sowie bei Helophyten, treten sie nicht auf. Ferner gibt es in alkalischen Gewässern auch Pflanzen, deren Blätter keine Polarität aufweisen, sondern die ihre Umgebungen der Blattoberflächen nur ansäuern, um so HCO_3^- für sich nutzbar zu machen. Bei diesen Blatttypen treten auch Fälle auf, bei denen eine Ansäuerung zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung nicht zu finden ist. Bei polaren Blättern konnte durch geeignete Lichtbestrahlung die Ansäuerung und Alkalisierung der Blattoberflächen jederzeit induziert werden.

4.2 Unterschiedliche histologische und cytologische Strukturen

4.2.1 Die Blattstrukturen

Mit Hilfe von lichtmikroskopischen Untersuchungen konnten die Blätter der Wasserpflanzen grob in drei Blatttypen eingeteilt werden. Zu den äquifazialen Rundblättern zählen die Blätter der *Myriophyllum*-Arten, *Cabomba caroliniana*, *Ranunculus penicillatus* und *Ceratophyllum demersum*. Als äquifaziale Flachblätter können *Stratiotes aloides*, *Posidonia oceanica*, *Vallisneria spiralis*, *Hippuris vulgaris* und das Unterwasserblatt von *Potamogeton natans* angesehen werden. Letzteres hat zwar einen fast runden Blattquerschnitt, aber mehrere Leitbündel, die in einer Reihe nebeneinander liegen. Dies entspricht eher der Definition eines äquifazialen Flachblattes (Lüttge et al., 1988). Beim dritten Typ handelt es sich um bifaziale

Flachblätter, wozu das Schwimmblatt von *P. natans* eindeutig zugeordnet werden kann. Den Blättern von *Potamogeton lucens*, *P. perfoliatus*, *Elodea canadensis*, *E. nuttallii* und dem Unterwasserblatt von *Callitriche hamulata* sieht man ihren bifazialen Blattbau jedoch nicht sofort an. Bei *E. canadensis* und *E. nuttallii* kann jedoch deutlich zwischen einer oberen und unteren Epidermis unterschieden werden, ebenso unterscheiden sich bei *P. lucens* und *P. perfoliatus* die Zellen der oberen Epidermen in Größe und Form von den Zellen des unteren Abschlußgewebes. Bei *C. hamulata* zeigt das Mesophyll einen bifazialen Aufbau. Es enthält an der Blattunterseite im Mesophyll deutlich größere Interzellularen als an der Blattoberseite.

Diese Aufteilung der Blätter in die drei Blatttypen deckt sich auch mit dem Auftreten der physiologischen Polarität (vgl. 2.7). Bei den äquifazialen Rund- und Flachblättern war keine Polarität zu finden. Bei ihnen fand eine generelle Ansäuerung der Grenzschicht an den Blattoberflächen statt. Eine Ausnahme waren die Blätter von *H. vulgaris*, *M. verticillatum*, *M. aquaticum* und *Ranunculus penicillatus*, bei denen keine Reaktionen zu erkennen waren. Eine physiologische Polarität, wie sie unter 2.7 beschrieben wurde, fand sich bei den Wasserpflanzen mit bifazialen Flachblättern. Eine Ausnahme bildete hier das Unterwasserblatt von *C. hamulata*. Es zeigte im Polaritätsversuch keine Reaktionen und auch der Nachweis einer PM-H⁺-ATPase blieb negativ.

Die Wasserpflanzen haben sich sowohl durch physiologische Strategien, als auch in struktureller Hinsicht dem Leben im Wasser angepasst. Sie haben durch Zerschlitzung der Blätter ihre Oberflächen vergrößert, um so Nährstoffe besser aus ihrer Umgebung aufnehmen zu können. Da sie dies über die gesamte Pflanzenoberfläche tun (Sculthorpe, 1985), konnten sie ihr Leitbündelsystem in den Blättern deutlich reduzieren. Lediglich bei *Potamogeton lucens* und *P. perfoliatus* fanden sich in den Hauptblattnerven neben den Zellen des Phloems noch Xylemfasern (Napp-Zinn, 1984). Die Ausbildung eines Palisadenparenchyms als „Hauptassimilationsorgan“ unterbleibt meistens. Es ist lediglich in Schwimmblättern zu finden. Die Assimilation findet bei Submersophyten vor allem in der Epidermis statt, so dass durch den Wegfall des Palisadenparenchyms die Blattdicke deutlich verringert werden konnte. Ein ausgeprägtes Interzellularsystem, das mit Gasprodukten von Assimilation und Respiration gefüllt ist und mit dem Aerenchym der Stängel und dem Interzellularsystem der Wurzel in Verbindung steht, sorgt zum einen für eine ausreichende Sauerstoffversorgung der inneren Gewebe aller Pflanzenorgane und zum anderen für einen notwendigen Auftrieb der Pflanzen im Wasser (Sculthorpe, 1985). Bei *Elodea nuttallii* und *E. canadensis* konnten zudem zwischen den Zellen der unteren Epidermis Kanalzellen gefunden werden. Dies sind nach Krabel et al. (1995) Zellen, die zum Sammeln und transportieren von Gasen genutzt werden. Sie stehen ebenfalls mit dem Interzellularsystem der Wurzeln und dem Aerenchym der Stängel in Verbindung.

Festigungsgewebe aus Sklerenchymfasern konnte lediglich in den Blättern von *P. lucens*, *P. perfoliatus* und *P. natans* gefunden werden. Bei *Posidonia oceanica* leisten die vielen kleinen Zellen, die unterhalb der Epidermis gruppenweise zusammen liegen und in einer dichten Zellwandmatrix eingebettet sind, diese Stützfunktion (Napp-Zinn, 1984).

Die periklinen Außenwände der Epidermiszellen von Blättern sind verhältnismäßig dick, aber weniger stark lignifiziert als Zellwände von Luftblättern und zeichnen sich, z.B. bei *Posidonia oceanica* durch eine beachtliche Quellbarkeit aus (Gessner, 1968), was durch die aufgelockerte äußere Zellwandstruktur zu erklären ist. Auch in der Zellwand von *M. spicatum*, bei der deutlich eine Paralleltexur von Zellulosefibrillen in der Sekundärwand zu erkennen sind, finden sich vereinzelt Bereiche, die aufquellen können. Die dicken Zellwände geben der Blattstruktur zusätzlichen Halt. CO₂ kann

trotzdem durch sie hindurch diffundieren und so an die Außenseite der Plasmamembran gelangen. Von dort aus gelangt es, ebenfalls durch Diffusion, ins Cytoplasma (Raven et al., 1985). Da der gesamte Apoplast angesäuert wird (Prins et al., 1982), existiert ein großer Raum in dem sich CO_2 anreichern kann. Bei *R. penicillatus* hat sich eine besondere Struktur entwickelt. An der periklinen Außenseite der Epidermiszellen, zwischen einer äußeren, kompakten und einer inneren, lockeren Zellwand, entwickelt sich im Laufe des Blattwachstums eine Spalte, die immer breiter wird und sich bis in die antiklinen Seitenwände hinein fortsetzt. An den Seiten weisen die Wände Protuberanzen auf, die sich in die Zellen einstülpen und so die Oberflächen des daran anliegenden Plasmalemmas deutlich vergrößern (Napp-Zinn, 1984). Sie stellen ein charakteristisches Merkmal von Transferzellen dar. An solchen Stellen werden von Prins et al. (1982) „saure Punkte“ im Apoplasten vermutet. Dies wären Bereiche, an denen das durch die Zellwände gelangte HCO_3^- durch Ansäuerung in CO_2 umgewandelt und dann in die Zellen diffundieren könnte. Rascio et al. (1999) haben an solchen Transferstrukturen durch Niederschläge von Bleiphosphat, Aktivitäten von „lichtabhängigen H^+ -ATPasen“ nachgewiesen. Solche Transferstrukturen finden sich auch bei anderen Wasserpflanzen, wie z.B. bei *E. canadensis* und *C. caroliniana*. Jedoch konnten bei den meisten hier untersuchten Wasserpflanzen keine solche Strukturen gefunden werden. Dies deckt sich auch mit Beobachtungen von Prins et al. (1982) an submersen Angiospermen und mit denen von Franceschi und Lucas (1980), die nur bei einigen Characeen Charasomen gefunden haben. Es scheint so, als ob solche Wandprotuberanzen nicht unbedingt notwendig für die Nutzung von HCO_3^- sind. In vielen der hier untersuchten Wasserpflanzen liegen die antiklinen Zellwände der Epidermiszellen gerade nebeneinander, z.B. bei *C. demersum* und *P. oceanica* und stehen durch Plasmodiesmen miteinander in Verbindung. Manchmal findet man die Seitenwände und periklinen Innenwänden auch fingerförmig verformt und ineinander verzahnt, wie z.B. bei *Vallisneria spiralis*, *P. lucens* und *P. perfoliatus*. Die deutet wieder auf eine Vergrößerung der Zelloberflächen und eine höhere Transportrate hin.

Auf den periklinen Außenwänden der Epidermiszellen liegt meist eine sehr dünne Cuticula auf (Schreiber, 1922). Sie ist bei *M. verticillatum*, *R. penicillatus*, *C. demersum*, *H. vulgaris* und dem Schwimmblatt von *P. natans* auf der Ober- und Unterseite deutlich von der Zellwand zu unterscheiden, da die Zellwände selbst nicht cutinisiert sind und sie sich dadurch voneinander abgrenzen. Trotz der Cuticula ist der Stoffaustausch über die Blattoberfläche nicht unterbunden. Sharpe und Denny (1976) beschreiben eine rasche Penetration von Ionen durch die mit einer dünnen Cuticula aufgelagerte Zellwand von *P. pectinatus*. Bei einigen Pflanzen scheint es bestimmte Stellen auf den Blattoberflächen zu geben, an denen ein Stoffaustausch mit der Umgebung besonders einfach erfolgen kann. In Untersuchungen von Lyr und Streitberg (1955) wurden Blattoberflächen von verschiedenen Wasserpflanzen mit Toluidinblau angefärbt. Es zeigten sich bei einigen Pflanzen Stellen an den Blattoberflächen, die sich anfärben ließen und andere nicht. Die Bereiche oder die einzelnen Zellen, die sich blau anfärbten, nannten sie Hydropoten. An der Blattunterseite des Schwimmblattes von *P. natans* fanden sich solche Hydropoten. Bei *M. spicatum*, *C. demersum*, *V. spiralis*, *S. aloides* und *E. canadensis* waren keine solchen partiellen Anfärbungen zu erkennen. Bei ihnen verfärbten sich die gesamten Blattoberflächen blau. Bei *H. vulgaris* und *M. verticillatum* waren dagegen keine Färbungen sichtbar. Die Blattoberflächen von *P. lucens* färbten sich nur zu 60-80% und bei *P. perfoliatus* sah man nur vereinzelt ungefärbte Zellen. Diese Ergebnisse decken sich mit den eigenen Beobachtungen zur physiologischen Polarität (4.1). Bei allen Blättern, die sich in den Versuchen von Lyr und Streitberg (1955) blau anfärbten, konnte eine Ansäuerung der Grenzschicht an der Blattoberfläche oder eine physiologische Polarität festgestellt werden (siehe 3.1).

Wasserpflanzen, die keine Reaktionen zeigten, färbten sich auch nicht an. Da Toluidinblau als basischer Farbstoff saure Bereiche anfärbt (2.5.3.3), war dieses Ergebnis einleuchtend.

Eine weitere Besonderheit von Wasserpflanzen ist das Vorhandensein von Chloroplasten in der Epidermis. Sie stellt das Hauptassimilationsorgan bei Wasserpflanzen dar (Rascio et al., 1999; Napp-Zinn, 1984). In fast allen der untersuchten Hydrophyten konnten Chloroplasten sowohl im Mesophyll als auch in der Epidermis beobachtet werden. Lediglich bei *M. aquaticum* und *H. vulgaris* fanden sie sich nur in den Mesophyllzellen. Dies zeigt, dass es sich hierbei um Helophyten handelt, die das Mesophyll als Assimilationsorgan nutzen. In *C. caroliniana* konnten, entgegen den Aussagen von Napp-Zinn (1984), ebenfalls Chloroplasten in den Epidermiszellen gefunden werden.

Die gut entwickelten, linsenförmigen Plastiden sind meist nicht homogen in den Epidermiszellen verteilt. Während sie bei *P. oceanica* überwiegend an den periklinen Innenseiten der Zellen liegen, finden sie sich z.B. bei *S. aloides* auch an den periklinen Außenseiten oder den antiklinen Seiten wieder. Immer scheinen sie jedoch in kleineren Gruppen zusammen zu liegen. Diese Verteilung erinnert an Sonnen- und Schattenblätter. *P. oceanica* steht als Salzwasserpflanze gewöhnlich an sonnenexponierten Stellen, während die meisten Süßwasserpflanzen der heimischen Seen oft in beschatteten Uferregionen leben müssen. Die meisten Chloroplasten, sowohl in den Epidermis- als auch in den Mesophyllzellen enthielten kleine oder keine Stärkekörner zum Zeitpunkt ihrer Fixierung. Lediglich in den Mesophyllzellen von *M. aquaticum* und *V. spiralis*, sowie in den adaxialen Epidermiszellen der beiden Wasserpestarten *E. canadensis* und *E. nuttallii* konnten große Stärkereservoirs in den Chloroplasten entdeckt werden. Ein Chloroplastendimorphismus, wie er bei den Chloroplasten von Mesophyll- und Bündelscheidezellen in C_4 -Pflanzen vorkommt, war jedoch nicht zu erkennen.

Neben den Chloroplasten sind Mitochondrien weitere wichtige Zellorganellen, die in den Epidermiszellen der Wasserpflanzen in einer größeren Anzahl enthalten sind. Auffällig ist, dass sie nicht gleichmäßig in den Zellen verteilt sind, sondern vor allem an den antiklinen Seiten und der periklinen Innenseite der Epidermiszellen in kleinen Gruppen zusammen liegen. Sie konzentrieren sich an solchen Stellen, an denen entweder Wandprotuberanzen vorkommen, oder in den fingerartigen Strukturen an den Zellverzahnungen. Da Mitochondrien Energielieferanten sind, liegt die Vermutung nahe, dass an diesen Stellen aktive, energieabhängige Transportprozesse stattfinden.

4.2.2 Stängel- und Wurzelstrukturen

Das Auffällige an den Querschnitten der Stängel bei Wasserpflanzen ist ein Lakunensystem, das durch senkrecht und waagrecht eingezogene einzellschichtige Gewebepplatten, den Septen und Diaphragmen, gebildet wird. Es stellt ein weitlumiges Aerenchym dar (Napp-Zinn, 1973). Der bei der Photosynthese entstehende Sauerstoff kann nicht schnell genug in das umgebende Wasser an der Pflanzenoberfläche abgegeben werden und sammelt sich daher in diesem System an (Dale, 1957). Durch den ansteigenden Gasdruck bläht es sich auf, bis zwischen dem Zellverband kleine Löcher entstehen und das Gas als kleine Blasen ins Wasser abgegeben wird (Angelstein, 1911). Außerdem steht es mit den Interzellularen der Blätter in Verbindung, über die das Gas durch die Kanalzellen an die Umgebung abgegeben werden kann (Krabel et al., 1995). Das Gas selbst besteht nicht nur aus O_2 , sondern auch aus N_2 , und in geringen Mengen ist auch CO_2 enthalten (Kniep, 1915). Neben seiner Funktion als Aufnahmeort für Assimilations- und Respirationprodukte sorgt dieses luftgefüllte

System für den entsprechenden Auftrieb der Pflanzen. Außerdem steht es mit den Wurzeln in Verbindung und kann dort für den nötigen Gasaustausch sorgen (Sculphorpe, 1985; Longstreth, 1989).

Das Gefäßsystem in den Stängeln submerser Makrophyten ist in den meisten Fällen auf ein zentrales Leitbündel reduziert worden. Eine Ausnahme bildet z.B. *Ranunculus penicillatus*, dessen kleine Leitbündel im gesamten Stängelquerschnitt verteilt sind.

Ebenso wurde die Anzahl der Tracheiden und der Grad ihrer Verholzung reduziert (Sculphorpe, 1985). Manchmal fehlen richtige Gefäße, und die Elemente des Xylems und des Phloems liegen in keiner bestimmten Ordnung zusammen, z.B. bei *M. spicatum* und *E. nuttallii*. In anderen Stängelquerschnitten dagegen sind Xylem und Phloem zwar auch reduziert, aber in charakteristischer Weise angeordnet. So findet man in *C. caroliniana* kleine kollaterale Leitbündel, bei *P. natans* ein tetrarches, konzentrisches Leitbündel und bei *H. vulgaris* ein konzentrisches Leitbündel mit Innenxylem. Hier ist zu erkennen, dass ein organisiertes Leitbündel dann vorhanden ist, wenn die Pflanzen auch außerhalb des Wassers leben und sie auf ein gut strukturiertes Leitbündelsystem angewiesen sind, um Stängel und Wurzel mit Assimilaten und die Blätter oberhalb der Wasseroberfläche mit ausreichend Wasser zu versorgen.

Die Wurzeln von Submersophyten haben ihre Funktion der Nährstoffaufnahme weitgehend verloren. Das zumindest behauptet von Guttenberg (1968) in seiner ausführlichen Beschreibung der Angiospermenwurzel. Ganz anders sehen es Agami und Waisel (1986). Sie zeigen, dass die Wurzeln ihre terrestrischen Eigenschaften als „Multi-Funktions-Organ“ beibehalten haben. Nach ihren Untersuchungen nehmen die Wurzeln Wasser auf, reichern Nährstoffe an und transportieren sie weiter, beliefern ihre Spitzen mit Wachstumshormonen und verankern die Pflanzen im Boden. Zusätzlich haben sie neue Eigenschaften hinzu bekommen, wie z.B. einen besseren Gas-Transport und eine niedrigere Sensitivität gegenüber Reduktionsbedingungen. Sie unterscheiden sich von Wurzeln der Landpflanzen nur durch ihre Masse, da die Hauptwurzeln bald zugrunde gehen und durch kleine sekundäre Wurzel ersetzt werden. Diese entspringen aus dem Hypokotyl, dem Rhizom oder dem flutenden Stängel. Dies erklärt, warum die im Rindenparenchym enthaltenen Plastiden bei *M. spicatum* und *P. perfoliatus* als Chloroplasten vorliegen. Bei den hier untersuchten Wurzeln konnten keine Wurzelhaare gefunden werden. Ein Fehlen von Wurzelhaaren wurde auch von Hesse (1904) bei *M. spicatum* und *M. verticillatum* beobachtet. Viele andere Hydrophyten, wie z.B. *S. aloides*, bilden nur unter bestimmten Bedingungen Wurzelhaare aus, z.B. bei starker Strömung oder wenn sie in der Erde verankert sind.

Die Rhizodermis der Wurzeln bei Wasserpflanzen ist sehr vielgestaltig und hat eine sehr lange Lebensdauer (v. Guttenberg, 1968). Meist folgt darunter eine einschichtige Exodermis, die bei *Stratiotes aloides* allerdings fehlt. Bei *P. oceanica* findet sich an ihrer Stelle ein zwei- bis dreischichtiger Sklerenchymmantel.

Das Interzellular- und Lakunensystem der Blätter und Stängel steht mit dem der Wurzeln in Verbindung. In der Wurzel ist es aber lange nicht so ausgeprägt. Dadurch, dass es sich meistens um recht zarte Beiwurzeln handelt, zeigen sich nur kleine Interzellularen im Rindenparenchym. Eine Ausnahme macht die Wurzel von *S. aloides*. Ihre Wurzeln sind langlebiger und oft in Schlammböden verankert. Daher hat sich ein Lakunensystem entwickelt, wie man es bei andern Pflanzen in den Stängeln findet. Auf diese Weise wird eine Versorgung der Wurzeln mit Sauerstoff gewährleistet (von Guttenberg, 1968). Eine meist primäre Endodermis trennt den Zentralzylinder vom Rindenparenchym, wie z.B. bei *P. natans*, *P. lucens*, *V. spiralis* und *S. aloides*. Bei

anderen, vor allem bei Sumpfpflanzen, findet man auch Sekundär- und Tertiärendodermen.

Die Leitelemente, vor allem die Xylemelemente, sind meist reduziert, da Wasser über die gesamte Pflanzenoberfläche aufgenommen werden kann und so ein ausgeprägtes Wasserleitsystem von den Wurzeln zum Spross überflüssig macht (von Guttenberg, 1968). Oftmals befindet sich in der Mitte ein Xylemang und die Elemente des Phloems liegen darum, wie man dies bei *V. spiralis* beobachten kann. Während die Xylemelemente bei anderen Pflanzen reduziert sein können, finden sich aber immer Elemente des Phloems in Form von Phloemparenchym, Siebröhren und Geleitzellen im Zentralzylinder.

4.3 Die Lokalisation der PM-H⁺-ATPase

Mit einem primären monoklonalen Antikörper gegen ein Epitop der 100kDa PM-H⁺-ATPase und einem sekundären IgG-Antikörper, dessen Fc-Region (schwere Kette) entweder mit dem Fluorochrom FITC oder mit 10nm großen Goldpartikeln markiert ist, konnte die PM-H⁺-ATPase in verschiedenen Zellen von Blättern, Stängeln und Wurzeln einiger Hydrophyten lokalisiert werden.

Während sie mit Hilfe der FITC-Fluoreszenz in den einzelnen Geweben nachgewiesen werden konnte, war es durch die Immunogoldmarkierung möglich, die ATPase in den Zellen genau zu lokalisieren. So konnten die 10nm großen Goldpartikel des sekundären Antikörpers direkt an der Plasmamembran lokalisiert werden. Vermutlich bindet der primäre Antikörper (46E5B11) an einem Außenloop des Enzyms (mündliche Aussage, G. Obermeyer, 1999).

4.3.1 Die Auswirkung unterschiedlicher Fixierungsmittel

Um biologische Proben für die Elektronenmikroskopie optimal zu fixieren, d.h. einen guten Strukturerehalt zu gewährleisten, werden meist zwei Fixierungsschritte durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgt die Fixierung mit Glutaraldehyd, einem Dialdehyd. Dieses vernetzt Proteine zu komplexen Polymeren auf Pyrimidinbasis (Flegler et al., 1995). Lipide werden nicht fixiert. Dafür wird in einer zweiten Fixierung Osmiumtetroxid eingesetzt. Es greift sie an den ungesättigten Bindungen an und vernetzt sie. Eine Fixierung mit diesen beiden Komponenten und eine anschließende Immunlokalisation erbrachte keine Resultate. Es konnten keine Goldpartikel auf den Schnitten beobachtet werden. Auch ein Wegfall des Osmiumtetroxid und eine Verminderung der Glutaraldehydkonzentration brachte keinen Erfolg. Erst bei einer Reduzierung der Glutaraldehydkonzentration auf 0,1% konnten erste Goldpartikel entdeckt werden. Mit dem Ersetzen des Glutaraldehyds durch Formaldehyd konnten sowohl die Markierungsdichte, als auch die spezifische Verteilung deutlich verbessert werden. Formaldehyd fixiert ebenfalls Proteine, unterscheidet sich aber von Glutaraldehyd deutlich in seiner Reaktion mit diesen. Es kommt zu keinen großen, vernetzten Strukturen (Flegler et al., 1995), was zu Materialauslaugungen und damit zu einem schlechteren Erhalt der Proben führt. Mit 8% Formaldehyd, ohne Glutaraldehyd, war die durchschnittliche Anzahl der gezählten Goldpartikel zwar deutlich geringer, dafür war aber ihre spezifische Verteilung deutlich besser als mit 0,05% Glutaraldehyd als Zugabe. Auch die Wahl des Einbettungsmittel hatte Einfluss auf die Qualität der Markierung. Epoxidharze bilden besonders mit den Proteinen der Proben kovalente Bindungen aus, während Acryl-Harze die eingebetteten Proben durchdringen ohne an sie zu binden (Newman, 1989; Skjørten et al., 1992).

Um die Immunlokalisation weiter zu optimieren, waren verschiedene Behandlungsmethoden möglich. In Untersuchungen von Stirling und Graff (1995) wurden mehrere Methoden getestet, um das Antigen nach der Fixierung und Einbettung wieder freizulegen. Sie versuchten unter anderem durch Einwirkung von Hitze das Antigen für den Antikörper besser zugänglich zu machen. Auch eine Behandlung mit H_2O_2 mit einer nachfolgenden Erhitzung wurde zur Erhöhung der Antigenität durchgeführt (Brorson et al., 2001). Die Antigenität der PM- H^+ -ATPase konnte durch Erwärmen der Schnitte erhöht werden. Die Einwirkung von Hitze erfolgte an einem PCR durch eine stufenweise Erhöhung der Temperatur. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Puffer nicht zu kochen begann. Trotzdem zeigten sich nach der Behandlung zahlreiche Zerstörungen an den Schnitten, was den Strukturhalt der Proben zusätzlich minderte.

4.3.2 Primär- und FITC-Fluoreszenz

Neben der FITC-Fluoreszenz traten bei den meisten Untersuchungsobjekten auch Eigenfluoreszenzen auf. Verschiedene Pflanzeninhaltsstoffe fluoreszieren bei Bestrahlung unterschiedlich. Die Farbe bzw. Wellenlänge der Fluoreszenz hängt sowohl von der Wellenlänge des einstrahlenden Lichtes, als auch von den unterschiedlichen Pflanzenstoffen ab. So weisen vor allem Chlorophylle, Phenole und Anthocyane Primärfluoreszenzen auf. Die Primärfluoreszenzen bei Bestrahlung mit UV- oder Blaulicht liegen bei Chlorophyll im Rotbereich, bei Lignin sind sie bläulich-weiß und bei Cutin weißlich-gelb (Nordhorn-Richter, 1984). Ein Grund für solche Fluoreszenzen sind die phenolische Komponenten in Lignin und Cutin (Hutzler et al., 1998). Am CLSM wurden für die verschiedenen Wellenlängen der Emissionen zwei Kanäle bereit gestellt. Der erste Kanal (grün) wurde auf einen Wellenlängenbereich von 510-520nm eingestellt und sollte in erster Linie die FITC-Fluoreszenz anzeigen, deren Emissionswellenlänge um 515nm liegt. Der zweite Kanal (rot) zeigte Emissionen, die zwischen 600 und 700nm lagen. Neben der Chlorophyll-Fluoreszenz, die in diesem Wellenlängenbereich lag, wurden auch Emissionen von Zellwänden und Vakuoleninhaltsstoffen dargestellt. Alle anderen Wellenlängenbereiche dazwischen wurden ausgeblendet. Im ersten Kanal war überwiegend die FITC-Fluoreszenz dargestellt, bei einigen Proben wurden aber auch Epidermisauflagerungen (Abb. 178) und Zellwandkomponenten (Abb. 188) sichtbar. So handelt es sich z.B. bei den fluoreszierenden Strukturen in den Wurzeln von *Posidonia oceanica*, direkt unterhalb der Rhizodermis, um Primärfluoreszenzen der verdickten Zellwände. Die eigentliche FITC-Fluoreszenz wurde anhand von Kontrollaufnahmen und durch die visuelle Überprüfung der Echtfarben im Epifluoreszenzmikroskop eindeutig nachgewiesen.

Ein Problem war die fotografische Darstellung von Bildern, auf denen wenig Primär- und keine FITC-Fluoreszenz zu erkennen war. Diese waren oftmals so dunkel, dass sich nicht einmal Strukturen erkennen ließen. Dem wurde abgeholfen, indem die Helligkeit des Bildes erhöht wurde. Dadurch wurden sowohl im ersten als auch im zweiten Kanal unspezifische grüne und rote Zellstrukturen sichtbar. Im überlagerten Bild nahmen diese dann Farben von gelb bis orange an. Solche Strukturen beruhen also nicht auf Primärfluoreszenzen und FITC-Fluoreszenz.

4.3.3 Lokalisation der PM-H⁺-ATPase in Blättern von Wasserpflanzen

Die PM-H⁺-ATPase, die der monoklonale Antikörper markiert, konnte nicht in allen Blättern der untersuchten Wasserpflanzen gefunden werden. In vielen Hydrophyten, die untersucht wurden, waren keine FITC-Markierungen oder Markierungen mit Goldkörnern zu finden. Auch bei allen Helophyten, selbst wenn sie, zur Zeit der Blattentnahme, noch keine Luftblätter entwickelt hatten, waren keine Markierungen in den Epidermis- und Mesophyllzellen der Blätter zu finden. Jedoch zeigten sich in einigen Zellen der Leitbündel Markierungen.

In 14 von 32 untersuchten Wasserpflanzen (siehe 3.3.1.1.1) fanden sich jedoch in den Epidermis- und Mesophyllzellen der Blätter Markierungen einer PM-H⁺-ATPase. Dabei handelte es sich ausnahmslos um rein submers lebende Angiospermen. Da jedoch in allen Zellen PM-H⁺-ATPasen vorkommen (Palmgren, 2001), war dieses Ergebnis zunächst erstaunlich. Der benutzte primäre Antikörper, der sich gegen die 100kDa PM-H⁺-ATPase richtet und von Dr. Lützelschwab im Rahmen seiner Dissertation hergestellt wurde (siehe 1.5), bindet jedoch nur an einige der Isoformen der PM-H⁺-ATPase (Jahn et al., 1998). Kreuzreaktionen mit *Arabidopsis thaliana*-Isoformen, die einzeln in Hefe exprimiert wurden, zeigten, dass der Antikörper mit solchen Isoformen reagierte, die durch AHA1, AHA2 und AHA3 codiert sind (Palmgren und Christensen, 1994). Alle drei Isoformen findet man im Plasmalemma der Zellen von *Arabidopsis thaliana*. Ihre unterschiedliche Gencodierung lässt auf funktionelle Unterschiede schließen, sowie auf eine unterschiedliche Verteilung und Lokalisation in den Geweben und Zellen (DeWitt et al., 1996, Morsomme und Boutry, 2000). So wurden z.B. die Isoformen von AHA2 und AHA3 bei *A. thaliana* im Leitgewebe von Blatt und Stängel lokalisiert, sowie in den Pollenkörnern und im Pollenschlauch (Palmgren, 2001). Immunlokalisationen von deWitt und Sussmann (1995) haben gezeigt, dass diese Isoformen in solchen Zellen vorkommen, die für Transportprozesse signifikant sind, wie z.B. in Geleitzellen und in Schließzellen. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Bei Submersophyten, die lt. Literatur in der Lage sind, HCO₃⁻ als Kohlenstoffquelle nutzen zu können, wurden Markierungen der PM-H⁺-ATPase in den Epidermis- und Mesophyllzellen ihrer Blätter gefunden. Bei Hydrophyten und Helophyten, die lediglich CO₂ nutzen, wie z.B. *M. verticillatum* (Prins et al., 1982) und *H. vulgaris* (Marberly und Spence, 1983), finden sich dort keine Markierungen. Auch in den Epidermis- und Rindenparenchymzellen der Stängel von submersen Angiospermen, die lediglich CO₂ aufnehmen, werden keine Markierungen beobachtet. Man kann daher annehmen, dass das Vorhandensein einer FITC-Fluoreszenz oder Immunogold-markierung in den Blättern von Wasserpflanzen in direktem Zusammenhang mit der Fähigkeit der HCO₃⁻-Nutzung steht.

Zusätzlich findet man bei manchen Angiospermen, die HCO₃⁻ nutzen können, Markierungen in den Zellen der Leitgewebe, z.B. bei *P. oceanica*, *M. spicatum* und in den Laichkräutern *P. lucens* und *P. perfoliatus*. Die dort lokalisierten PM-H⁺-ATPasen stehen jedoch nicht mit der Fähigkeit der HCO₃⁻-Nutzung in Verbindung. Dies geht aus der Tatsache hervor, dass sich in den meisten Wasserpflanzen, deren Epidermis- und/oder Mesophyllzellen markiert sind, keine FITC-Fluoreszenz oder Markierungen mit Goldkörnern in den Zellen der Leitgewebe zu finden waren. Dafür traten solche Leitbündelmarkierungen aber bei Helophyten und Hydrophyten auf, die ausschließlich CO₂ als Kohlenstoff-Quelle nutzen können, wie z.B. *H. vulgaris*, *M. aquaticum* und *M. verticillatum*. Die PM-H⁺-ATPase wurde in den Geleitzellen lokalisiert (Abb. 206), was darauf hinweist, dass sie bei der Phloembeladung eine Rolle spielt (Bouché-Pillon et al., 1994). Während bei submers lebenden Wasserpflanzen auch in den Stängeln und sogar in den Wurzeln die Photosynthese ablaufen kann (Abb. 150) und so das Gewebe

mit Nährstoffen versorgt wird, findet man bei Sumpfpflanzen die „klassische“ Arbeitsteilung wieder. Die Stängel sind meist mit einer dicken Cuticula überzogen, die eine Stoffaufnahme erschwert. Die Wurzeln sind im Boden verankert, dem sie Nährstoffe entnehmen. Daraus folgt, dass in den Blättern dieser Pflanzen eine Phloembeladung stattfindet, um Assimilationsprodukte in die unteren Pflanzenteile zu transportieren. Das Fehlen einer PM-H⁺-ATPase Markierung in den Leitbündeln der anderen Wasserpflanzen heißt jedoch nicht, dass hier keine Transportvorgänge stattfinden. Neben der partiell apoplastischen Beladung der Siebröhren, mit Hilfe einer PM-H⁺-ATPase, gibt es auch eine symplastische Beladung, die ohne Mithilfe einer PM-H⁺-ATPase über Plasmodesmen funktioniert (Turgeon und Beebe, 1991; Heß, 1999).

4.3.4 Lokalisation der PM-H⁺-ATPase in Stängeln und Wurzeln

In den Abschlussgeweben und Rindenparenchymzellen von Stängel und Wurzel konnte bei den untersuchten submersen Makrophyten keine PM-H⁺-ATPase lokalisiert werden. Jedoch zeigten sich bei einigen Stängeln und Wurzeln Markierungen in den Leitbündeln der Zentralzylinder.

In wenigen Hydrophyten waren FITC-Fluoreszenzen bzw. Markierungen mit Goldkörnern in den Geleitzellen der Siebröhren zu finden. Dazu zählen *P. lucens*, *P. natans*, *M. spicatum* und *R. penicillatus*. Bei den anderen Hydrophyten waren keine Markierungen zu entdecken. Das Registrieren einer Markierung zeigt, dass auch in den Stängeln eine Phloembeladung stattfindet. Da die Zellen der Stängel von Hydrophyten Chloroplasten enthalten und somit zur Assimilation fähig sind (Krabel et al., 1995), macht eine solche Beladung einen Sinn. Das Auftreten einer apoplastischen Beladung nur bei den oben erwähnten vier Pflanzen heißt nicht, dass es in anderen Wasserpflanzen keine Phloembeladung gibt. Hier könnte das Phloem auch symplastisch beladen werden, worauf die Anwesenheit von Plasmodesmen hinweisen könnte (Abb. 127, 128). Nichtsdestoweniger stellen aber die Blätter immer noch die Hauptquelle der Assimilationsprodukte dar (Krabel et al., 1995). Die photosynthetische Aktivität in den Stängeln ist meist deutlich geringer als in den Blättern, so dass sie nicht ausreicht, um die Wurzeln mit Assimilationsprodukten zu versorgen (Rascio et al., 1991). Dies gilt vor allem auch für die untersuchten Helophyten, wie *H. vulgaris* und *M. aquaticum*, bei denen ebenfalls keine Markierungen in den Leitbündeln der Stängel zu finden waren.

In den Wurzeln der submersen Makrophyten fanden sich bei einigen der untersuchten Arten Markierungen der PM-H⁺-ATPase. Auch hier beschränken sie sich auf das Leitgewebe in den Zentralzylindern. Somit sieht es so aus, als ob die Wurzeln nicht in der Lage wären, HCO₃⁻ nutzen zu können. Dies scheint auch nicht nötig zu sein, da z.B. durch mikrobielle Aktivitäten in der Rhizosphäre die Konzentration an anorganischem Kohlenstoff, vor allem an CO₂, deutlich höher liegt als im Wasserkörper (Agami und Waisel, 1986). Gerade im Hinblick auf Wasserpflanzen, die in sauren Gewässern leben, wie z.B. das Brachsenkraut *Isoetes lacustris*, dem lediglich CO₂ im Wasser als Kohlenstoff-Quelle zur Verfügung steht, stellt das CO₂ im Sediment eine wichtige zusätzliche Quelle dar (Richardson et al., 1984). Aber auch Pflanzen wie *V. spiralis*, die in alkalischen Gewässern leben und HCO₃⁻ für sich nutzen können, sind in der Lage, aus dem Sediment über ihre Wurzeln CO₂ aufzunehmen, in den Lakunen der Wurzeln anzureichern und es von hier aus über die Stängel in die Blätter zu transportieren (Kimber et al., 1999). Darüber hinaus haben die Wurzeln von Wasserpflanzen ihre Fähigkeit zur Nährstoffaufnahme nicht, wie früher immer behauptet, verloren, sondern nutzen diese intensiv (Agami und Waisel, 1986).

4.3.5 Die asymmetrische Verteilung der PM-H⁺-ATPase in den Zellen

Bei Beobachtungen der FITC-Fluoreszenz-Markierungen in den Blättern von Hydrophyten fällt auf, dass sie sowohl in den Epidermiszellen, als auch in den Mesophyllzellen nicht gleichmäßig verteilt sind. Während bei *E. canadensis* die FITC-Fluoreszenz in den Zellen der unteren Epidermis noch einigermaßen gleich verteilt erscheint, sieht man bei *E. nuttallii* eine deutlich unregelmäßige Verteilung. Die FITC-Fluoreszenz ist an den periklinen Innenseiten der unteren Epidermiszellen beider Arten sichtlich heller als an den Außenseiten. Gelegentlich fallen auch in den oberen Epidermiszellen Markierungen der PM-H⁺-ATPase auf. Auch hier beschränken sie sich dann auf die periklinen Innenseiten der Zellen. In den ebenfalls polaren Blättern von *Potamogeton lucens* und *P. perfoliatus* zeigt sich auch eine ungleichmäßige Verteilung der Markierungen. Während die Zellen des, im intercostalen Bereich einschichtigen Mesophylls eine gleichmäßige Fluoreszenz zeigen, ist die Verteilung der Markierungen in den unteren Epidermiszellen eindeutig asymmetrisch. Hier findet sich an den periklinen Innenseiten eine deutlich stärkere FITC-Fluoreszenz als an den Außenseiten. Die ungleichmäßige Verteilung der Markierungen in den einzelnen Blattgeweben und in den Zellen führt zur Ausbildung einer physiologischen Blattpolarität. An den Blattunterseiten von polaren Blättern erfolgt eine Ansäuerung des Apoplasten und der Grenzschicht an der Blattoberfläche. Hier werden PM-H⁺-ATPasen benötigt, um H⁺-Ionen aus den Zellen zu pumpen. Nach einem Model von Prins et al. (1982) müssen zum Ausgleich an der Blattoberfläche OH⁻-Ionen abgegeben werden bzw. die Membranen für OH⁻-Ionen durchlässig werden (Weisenseel und Linder, 1990). Dadurch wird diese Seite alkalischer gegenüber der Blattunterseite. Die Protonenpermeabilität der Plasmamembran wird durch einen hohen pH-Wert an der Blattoberseite aufrechterhalten (Miedema et al., 1992), so dass es sinnvoll erscheint, hier keine PM-H⁺-ATPasen arbeiten zu lassen.

Die asymmetrische Verteilung in den Zellen selbst ist weniger leicht zu erklären. Vor

allem bei *P. lucens* fällt auf, dass an den periklinen Außenseiten der unteren Epidermiszellen kaum PM-H⁺-ATPasen zu finden sind, während die periklinen Innenseiten und Mesophyllzellen dicht besetzt sind (Abb. 285). Eine mögliche Interpretation der Ergebnisse wäre, dass die Umwandlung von HCO₃⁻ in CO₂ nicht in erster Linie in der von Prins und Elzenga (1989) beschriebenen „boundary layer“, also der Grenzschicht an der Blattoberfläche, stattfindet, sondern im Apoplasten der Blätter. Da HCO₃⁻ ebenso wie CO₂ durch die Zellwände diffundieren kann (Prins et al., 1982; Krabel et al., 1995), breitet es sich im

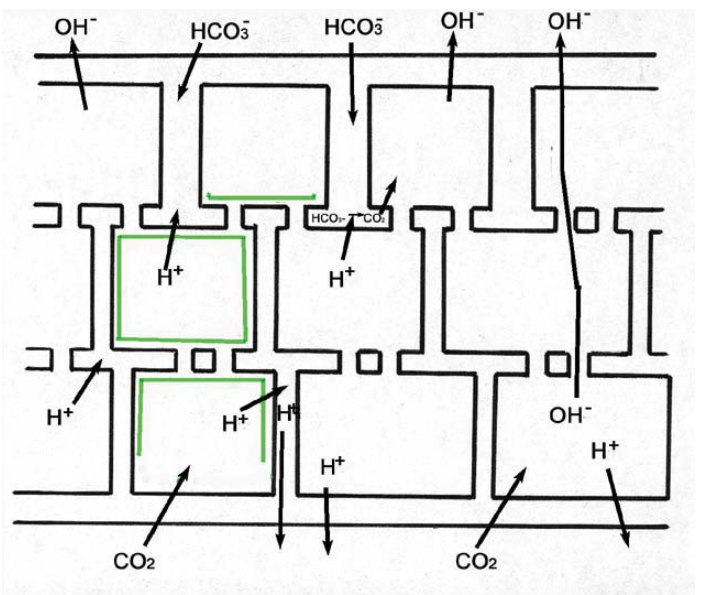


Abb. 285: Möglicher Aufnahme-Mechanismus bei einem polaren Blatt (grün : Verteilung der PM-H⁺-ATPase in Zellen)

Apoplasten aus. Dort wird es aufgrund der Protonenabgabe der PM-H⁺-ATPasen in CO₂ konvertieren und je nach Konzentrationsgefälle entweder durch die Zellmembranen in die angrenzenden Zellen diffundieren oder in die Interzellularen gelangen, wo es als Reserve „gelagert“ werden

kann. Dass das darin enthaltene Gas neben O_2 auch CO_2 enthält hat Kniep schon 1915 heraus gefunden.

Die Abgabe von H^+ -Ionen in den Apoplasten anstatt direkt an die Blattoberfläche, hat also einige Vorteile für die Pflanzen. Die H^+ -Ionen-Abgabe ist effektiver, da die meisten der abgegebenen Protonen ihren Zweck erzielen, HCO_3^- in CO_2 umzuwandeln, ohne Gefahr zu laufen, dass sie nach Abgabe an die Blattoberfläche mit dem Wasserstrom „weggespült“ werden. Das CO_2 gelangt direkt in die Zellen von Mesophyll und oberer Epidermis. Es muss keine langen Diffusionswege mehr von der Blattunterseite zu den übrigen Zellen zurücklegen.

Die Abgabe von H^+ -Ionen wird durch die Abgabe von OH^- -Ionen an der adaxialen Blattseite ausgeglichen. Dadurch wird sie alkalischer als die abaxiale Blattseite, an der ein Teil der H^+ -Ionen der PM- H^+ -ATPasen durch Diffusion an die Oberfläche gelangt und die Grenzschicht ansäuert. In der Grenzschicht kann sich dann wie im Apoplasten HCO_3^- in CO_2 umwandeln. Gleichzeitig sinkt aber die Konzentration an HCO_3^- auf dieser Seite. Daraus folgt, dass HCO_3^- vor allem über die adaxiale (Oberseite) Blattseite in den Apoplasten gelangen. Dort entsteht durch die Abgabe der OH^- -Ionen ständig neues HCO_3^- und bei einem weiteren Anstieg des pH auch CO_3^{2-} , das sich als $CaCO_3$ auf den Blättern niederschlägt.

Die nicht polaren, äquifazialen Rund- und Flachblätter der übrigen Hydrophyten, die eine FITC-Fluoreszenz bzw. eine Markierung mit Goldkörner aufwiesen, zeigten in ihren Epidermiszellen alle das gleiche Verteilungsmuster. Die PM- H^+ -ATPase war dort asymmetrisch verteilt. Um die Verteilung besser beurteilen zu können, wurden exemplarisch für ein äquifaziales Rundblatt die Goldkörner bei *M. spicatum* quantitativ erfasst und als lineare Dichteverteilung ausgewertet. Zum Vergleich wurde sie auch bei polaren Blättern von *Elodea canadensis* erfasst.

Dabei zeigte sich, dass bei *M. spicatum* an den periklinen Außenseiten deutlich weniger PM- H^+ -ATPasen markiert wurden als an den periklinen Innenseiten. Bei *E. canadensis* war dies genau umgekehrt. An den Zellen der abaxialen Epidermis zeigten sich die meisten Markierungen an den periklinen Außenseiten und die wenigsten an den periklinen Innenseiten. Dafür waren die Markierungen an den periklinen Innenseiten der adaxialen Epidermiszellen um so höher. Es scheint so, als ob dichte und weniger dichte Bereiche von Zelle zu Zelle abwechseln. Dieses Phänomen findet man auch bei *M. spicatum*. Die eine antikline Seite der Epidermiszellen enthält eine dichtere PM- H^+ -ATPase-Markierung als die in der unmittelbar daneben liegenden Zelle. Deren dichtere Bereich ist an ihrer gegenüberliegenden Seite zu finden. Dieses Verteilungsmuster findet sich auch in allen anderen äquifazialen, nicht polaren Blättern, die hier untersucht wurden. Die höhere Dichteverteilung der PM- H^+ -ATPase an den periklinen Innenseiten der Zellen von *M. spicatum* könnte auch hier die effektivere Nutzung der abgegebenen H^+ -Ionen sein, wie sie für die polaren Blätter von *P. lucens* postuliert wurde. Die höhere Dichteverteilung an den periklinen Außenseiten der abaxialen Epidermiszellen bei *E. canadensis* könnte an einem zu kleinen Apoplasten liegen, so dass die Zellen, um genügend CO_2 produzieren zu können, die Grenzschicht direkt ansäuern.

Bei dieser Verteilung der Markierungen der PM-H⁺-ATPase in Zellen und Geweben stellt sich die Frage nach dem Mechanismus der HCO₃⁻-Nutzung. Die Abgabe von H⁺-Ionen an den Apoplasten hat eine Ansäuerung der gesamten Blattoberfläche zur Folge, sowie eine zunehmende Alkalisierung des Cytoplasmas. Die Zellen müssen diese Abgabe aber wieder ausgleichen, um ihren intrazellulären pH aufrecht zu erhalten. Ein möglicher Weg wäre die zeitlich versetzte Abgabe von H⁺-Ionen und OH⁻-Ionen. Die Aktivität der PM-H⁺-ATPase wird durch Licht induziert (Bellando et al., 1995; Stahlberg und Van Volkenburgh, 1999), d.h. nachts werden keine H⁺-Ionen in den Apoplasten abgegeben. In dieser Zeit diffundiert sowohl CO₂ als auch HCO₃⁻ in den Apoplasten. Mit Beginn der Bestrahlung nimmt die PM-H⁺-ATPase ihre Tätigkeit auf und pumpt H⁺-Ionen in den Apoplasten, wo diese HCO₃⁻ in CO₂ umwandeln. In dieser Zeit säuert sich der Apoplast immer mehr an, so dass die Durchlässigkeit der Plasmamembran für H⁺-Ionen langsam sinkt (Miedema et al., 1996). Mit der Zeit gelangen auch H⁺-Ionen an der Blattoberfläche in die Grenzschicht und säuern diese an. Schließlich ist die Permeabilität der Plasmamembran für H⁺-Ionen so gering, dass die Umwandlung von HCO₃⁻ gestoppt wird. Möglich ist auch, dass die Menge an HCO₃⁻ im Apoplasten bereits erschöpft ist, lange bevor die Abgabe von H⁺-Ionen gestoppt wird. Dann wird nur noch in der Grenzschicht HCO₃⁻ in CO₂ umgewandelt. Mit dem Stopp der Protonenpumpe können nun die OH⁻-Ionen abgegeben und damit der pH in der Zelle reguliert werden. Die Grenzschicht an der Blattoberfläche wird langsam alkalisch. Ein Versuch mit *M. spicatum* zeigte, dass ihre Blattoberfläche nachmittags alkalisch wurde. Da es sich hierbei jedoch um einen Einzelversuch handelte, müssen weitere Untersuchungen folgen, um diese Hypothesen zu beweisen (Abb.286). Zudem ist nicht geklärt, ob sich dieser Vorgang in Laufe des Tages wiederholt. Denn nach dem Stopp der Protonenpumpen wird der Apoplast langsam alkalisch und dadurch wird die PM-H⁺-ATPase wieder aktiviert (Miedema et al., 1996).

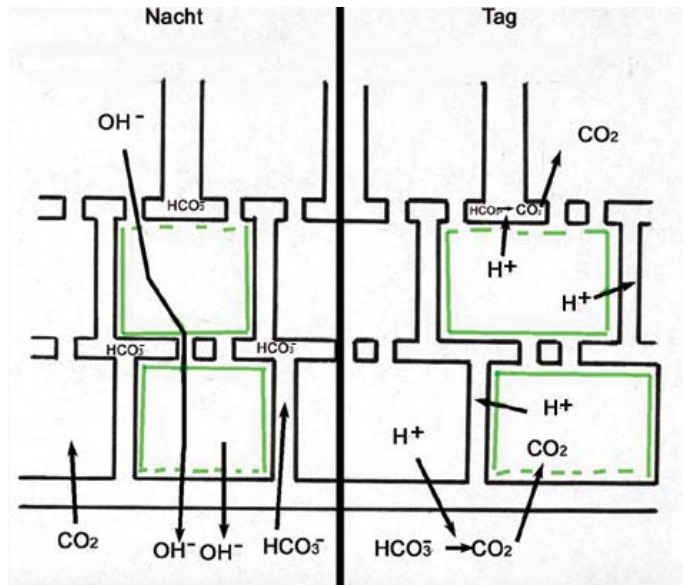


Abb. 286: Möglicher Aufnahme-Mechanismus bei einem nicht polaren Blatt (grün: Verteilung der PM-H⁺-ATPase)

Eine besondere Form eines Reaktionsraumes hat sich bei *R. penicillatus* entwickelt. Zwischen einer äußeren und inneren Zellwand an der periklinen Außenseite hat sich ein „inner space“ gebildet, der ein Teil des Apoplasten darstellt. Darin kann die Konvertierung von HCO₃⁻ in CO₂ stattfinden, ohne dass an der Blattoberfläche Ansäuerungen auftreten. Rascio et al. (1999) haben solche inneren Hohlräume auch bei *Ranunculus trichophyllus* entdeckt. Sie vermuten, dass neben der Ansäuerung durch eine PM-H⁺-ATPase zusätzlich eine apoplastische Kohlensäureanhydrase die Umwandlung in diesem Raum katalysiert.

4.4 Auswirkungen des pH auf die PM-H⁺-ATPase

Das Wachstum von *M. spicatum* bei verschiedenen pH-Werten zeigte nur geringe Unterschiede. In morphologischer Hinsicht konnte in den fünf Versuchswochen an den Pflanzen der drei Versuchsansätze kaum ein Unterschied festgestellt werden. *M. spicatum* wuchs in allen vier Ansätzen gleich schnell und bildete sowohl neue Blätter als auch neue Wurzeln aus. Ein deutlicher Unterschied war in der Veralgung der Versuchsansätze zu beobachten. Während sich bei pH 6.0 das Algenwachstum zunächst in Grenzen hielt, setzte es bei pH 7.0 und 8.0 recht bald ein, obwohl die Pflanzen vor Versuchsbeginn gründlich gereinigt wurden. Da alle Versuchspflanzen aus den Becken des Botanischen Gartens der Universität Karlsruhe stammten, die ein alkalisches Milieu aufwiesen, waren die daran anhaftenden Algen an hohe pH-Werte angepasst. Daher konnten sie sich bei pH 7.0 und 8.0 rascher verbreiten, während sie sich bei pH 6.0 zunächst adaptieren mussten. Eine weitere Auffälligkeit war die Bildung von CaCO₃, das sich auf den Blättern der Pflanzen niederschlug. Die Kalkbildung war bei pH 8.0 am größten und erfolgte zu einem früheren Zeitpunkt als bei pH 7.0. Bei pH 6.0 konnte keine Kalkbildung beobachtet werden. Der Grund der starken Ausfällung von CaCO₃ ist in der höheren Photosyntheserate der Pflanzen zu suchen. Durch die ständige Neulieferung von HCO₃⁻ beim Wasserwechsel war CO₂ kein limitierender Faktor mehr für die Photosynthese, so dass sich ihre Rate erhöhte. Da *M. spicatum* die Aufnahme von CO₂ der Nutzung von HCO₃⁻ vorzieht (Kirk, 1994), wurde dem Wasser schließlich so viel CO₂ entzogen, dass sich das Gleichgewicht in Richtung CO₃²⁻ verschob. Damit stieg der pH weiter an, da die Pufferkapazität des Wassers an seine Grenzen stieß. Anhand der pH-Messungen war ersichtlich, dass ΔpH^5 von einem auf den anderen Tag immer größer wurde. Das entstandene CO₃²⁻ fällt als Kalk (CaCO₃) auf den assimilierenden Blättern nieder und bildete zusammen mit den Algen eine dichte Akrustierung, so dass die Blätter am Ende der Versuchsdauer kaum noch in der Lage waren, zu assimilieren. Dieser Vorgang, der in der Natur als „Biogene Entkalkung“ vorkommt, wird dadurch kompensiert, dass sich am apikalen Ende der Pflanzen neue Blätter bilden, die zunächst nur wenig assimilieren (Schmidt, 1978). Dadurch akrustiert dort kein Kalk und die Blätter bleiben sauber. Untersuchungen hinsichtlich eines Vorhandenseins einer PM-H⁺-ATPase in jungen Blättern zeigten nur eine geringe Markierung in den Epidermiszellen. Erst wenn die älteren Blätter ihre Funktion nicht mehr ausüben können, übernehmen die jüngeren Blätter die Assimilation (Kirk, 1994).

Während der Versuche konnte eine Veränderung in der Lokalisation der PM-H⁺-ATPase in den Epidermiszellen festgestellt werden. Bei allen drei Ansätzen mit *M. spicatum* (pH 6.0, 7.0 und 8.0) wurde die FITC-Fluoreszenz in den Zellen geringer und verschwand am Ende der Versuchszeit fast vollständig. Eine eindeutige Zu- oder Abnahme aufgrund unterschiedlicher pH-Werte des Umgebungsmilieus konnte nicht festgestellt werden. Dies zeigten Messungen der FITC-Fluoreszenz-Intensitäten, die mit dem Computerprogramm TSCNT des CLSM durchgeführt wurden. Zunächst reduzierte sich die FITC-Fluoreszenz in den Epidermiszellen und später auch in den Mesophyllzellen. Diese Beobachtungen wurden auch bei *M. spicatum* gemacht, die zunächst in Wasser mit einem pH von 6.0 angesetzt wurden, wobei der pH dann im Laufe von fünf Wochen kontinuierlich anstieg. Eine Anpassung an die sich verringernden Kohlenstoffkonzentrationen war hier deutlich zu erkennen. Zu Beginn, bei pH 6.0, mit einem hohen Angebot an CO₂ und wenig HCO₃⁻, stieg die Photosyntheserate schnell an, da viel anorganischer Kohlenstoff genutzt wurde. Die Folge war ein rascher Anstieg des pH.

⁵ $\Delta \text{pH} = \text{pH} (2.\text{Tag}) - \text{pH} (1.\text{Tag})$

Danach konnte nur noch das CO_2 genutzt werden, das durch Diffusion an der Wasseroberfläche in den Wasserkörper gelangte. Dadurch verminderte sich die Photosyntheserate und der pH des Wassers stieg nun langsamer an.

Im selben Versuchsansatz wurde auch *M. aquaticum* untersucht. Es sollte geprüft werden, in wieweit sie sich an ändernde Umweltbedingungen anpassen konnte. Hier konnten jedoch keine Veränderungen in der Markierung der PM- H^+ -ATPase im Leitgewebe festgestellt werden. Ein Auftreten von neuen Markierungen bei steigendem pH, z.B. in den Epidermiszellen, konnte nicht beobachtet werden. Wasserpflanzen, wie *M. aquaticum*, die obligat in sauren Gewässern wachsen, scheinen nicht in der Lage zu sein, HCO_3^- nutzen zu können. Es konnten lediglich ein rasches Stängel- und Blattwachstum registriert werden. Jede Woche mussten die Spitzen der Pflanze entfernt werden, da diese aus dem Wasser herausragten. Eine Ausbildung von Überwasserblättern hätte aber zur Folge gehabt, dass die Unterwasserblätter absterben (deWit, 1990). Helophyten, wie *M. aquaticum* scheinen durch die Ausbildung von Luftblättern eine geringe CO_2 -Konzentration im Wasser kompensieren zu können (Napp-Zinn, 1984).

Bei der Messung der Membranspannungen wurden die maximalen Spannungsamplituden registriert. Sie dienten in erster Linie dazu, die Vitalität der Pflanzen zu beurteilen. Ein Einfluß der unterschiedlichen pH-Werte der Wachstumsmedien auf die Membranspannungen war nicht zu erkennen. Da die Gesamtkonzentrationen aller Ionen an der Innen- und Außenseite der Zelle eine Rolle spielen, ist der Einfluß der H^+ -Ionen, die nach außen gepumpt werden relativ gering (Plonsey und Barr, 1991). Es zeigte sich lediglich ein allgemeiner Rückgang der maximalen Spannungsamplituden gegen Ende der Versuchszeit, was wohl auf eine beginnende Seneszenz zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die unterschiedlichen pH-Bedingungen keinen nennenswerten Einfluss auf die Lokalisation und die Verteilung der PM- H^+ -ATPase in den ausgewachsenen Blättern von *M. spicatum* haben. Die beobachteten Verminderungen der FITC-Fluoreszenz in Laufe der Versuchszeit sind wohl auf eine beginnende Seneszenz zurückzuführen, da sie in allen vier Ansätzen mit *M. spicatum* auftraten.

4.5 Die Kohlenstoff-Konzentrations-Mechanismen

CO_2 ist in Wasser aufgrund seiner 10.000-mal geringeren Diffusionsgeschwindigkeit der limitierende Faktor für die Photosyntheserate von aquatischen, photoautotrophen Organismen (Prins und Elzenga, 1989). Außerdem kann es in verschiedenen Zustandsformen vorliegen. Je nach pH des Gewässers liegt es gelöst als CO_2 , als H_2CO_3 , als HCO_3^- oder als CO_3^{2-} vor (Badger, 1987). Die in den unterschiedlichen Habitaten existierenden Organismen haben daher Strategien entwickelt, um die CO_2 Konzentration in ihrer unmittelbaren Umgebung zu erhöhen und dadurch eine höhere Photosyntheserate zu erzielen (Lucas und Berry, 1985). Neben den oben besprochenen Mechanismen bei submersen Angiospermen, liegen bei Algen und Cyanobakterien andere Aufnahmewege vor.

Für Cyanobakterien wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen, wie sie HCO_3^- als Kohlenstoff-Quelle nutzen können. In allen wird von einer aktiven Aufnahme, entweder durch einen Symport oder einen Antiport, mit Hilfe einer p-Typ-ATPase ausgegangen (Badger et al., 1978). Zusätzlich soll eine Kohlensäureanhydrase, die in der Plasmamembran lokalisiert ist, am Transport beteiligt sein (Lucas und Berry, 1985).

Bei grünen Mikroalgen, wie z.B. *Chlamydomonas reinhardtii* wird eine Kohlendensäureanhydrase im periplasmatischen Raum vermutet, die HCO_3^- in CO_2 umwandelt, so dass dieses dann durch Diffusion oder mit Hilfe einer Pumpe durch die Plasmamembran gelangt (Badger, 1987).

Für Characeen gibt es zwei Modelle, wie sie HCO_3^- nutzen könnten. Das eine beschreibt einen aktiven H^+ -Ionen-Efflux in sauren Banden und dadurch eine Umwandlung von HCO_3^- in CO_2 . Die OH^- -Ionen werden in den alkalischen Banden abgegeben (Ferrier, 1980; Walker et al., 1980). Ein anderes Modell hat Lucas (1985) vorgeschlagen. Er geht von einer direkten HCO_3^- -Aufnahme durch einen $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ -Symporter aus, an dem eine H^+ -ATPase beteiligt ist. Auch hier wird die Beteiligung einer Kohlendensäureanhydrase diskutiert.

Bei marinen Angiospermen wird ein Mechanismus zur Aufnahme von HCO_3^- vermutet, der dem von Cyanobakterien und Mikroalgen ähnelt. Dabei geht es um eine direkte Aufnahme von HCO_3^- und eine externe Kohlendensäureanhydrase spielt wohl eine wichtige Rolle (Invers et al., 1999). Untersuchungen an *Posidonia oceanica*, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, zeigen in den Epidermiszellen der Blätter deutliche FITC-Fluoreszenz-Markierungen. Dies könnte auf einen Konzentrations-Mechanismus hinweisen, wie er in vielen submersen Süßwasser-Makrophyten zu finden ist.

4.6 Ausblick

Die Lokalisation der PM- H^+ -ATPase in den Geweben von Blättern, Stängel und Wurzeln sowie ihre Verteilung in den Zellen zeigt neue Aspekte im Kohlenstoff-Konzentrations-Mechanismus submerser Makrophyten. Diese gilt es jetzt weiter zu verfolgen und zu bestätigen oder zu widerlegen. Dazu müssen zunächst die polaren Phasen von einigen Süßwassermakrophyten bestimmt werden, die die Umgebung der Blattoberflächen ansäuern. Dies könnte mit Hilfe von mehreren pH-Elektroden erfolgen, wie sie Miedema und Prins (1992) beschrieben haben. Der in dieser Arbeit angewandte Test mit dem Indikatorfarbstoff Bromkresolpurpur (2.7) ist für längere Messungen ungeeignet, da die Proben nach einer gewissen Zeit austrocknen.

An zweiter Stelle sollte die Verbesserung des Strukturerhalts bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Antigenität stehen. Vielleicht könnte eine Formaldehydfixierung mit Hilfe der Mikrowellentechnik Besserungen bringen. Ansonsten müssen weitere Fixierungsgemische ausgetestet werden.

Weitere Untersuchungen der Lokalisation der PM- H^+ -ATPase in Abhängigkeit vom pH müsste mit Keimlingen erfolgen, die von Anfang an unter den unterschiedlichen pH-Bedingungen wachsen. An ihnen könnte die Ausbildung und Verteilung von PM- H^+ -ATPasen im Plasmalemma von Epidermis- und Mesophyllzellen eingehender untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Süßwasser- und Salzwassermakrophyten sind sekundär ins Wasser zurückgekehrte Landpflanzen. Dabei haben sie sich neuen Umweltbedingungen erfolgreich angepasst und sind heute in allen Gewässern der Erde zu finden.

Neben Schwierigkeiten, wie Lichtmangel und O₂-Mangel, stellt die Verfügbarkeit von CO₂ für die Wasserpflanzen ein Problem dar. Diese hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zum einen spielt die Temperatur des Wassers eine wichtige Rolle. In kaltem Wasser kann sich mehr CO₂ lösen als in warmem Wasser. Dann hat der pH des Gewässers einen Einfluss auf die Menge an gelöstem CO₂. Bei einem pH um 9.0 liegt anorganischer Kohlenstoff fast ausschließlich als HCO₃⁻ vor, bei noch höheren Werten als CO₃²⁻. Bei niedrigen pH-Werten, um 6.0, findet sich dagegen überwiegend gelöstes CO₂ bzw. H₂CO₃ im Wasser. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Verfügbarkeit von CO₂ stellt seine Diffusionsgeschwindigkeit dar. Sie ist im Wasser 10.000-mal geringer als in der Luft, so dass selbst in einem sauren Gewässer, welches mit der Atmosphäre im Gleichgewicht steht, die Verfügbarkeit von CO₂ reduziert ist.

Cyanobakterien, Mikroalgen, Makroalgen und viele Wasserpflanzen haben daher unterschiedliche Strategien entwickelt, um neben CO₂ auch HCO₃⁻ als Kohlenstoff-Quelle nutzen zu können. Neben Wasserpflanzen, die alkalische Gewässer meiden und so der Reduzierung der CO₂-Konzentration durch andere Zustandsformen entgehen und Sumpfpflanzen, die nach einer kurzen submersen Phase ihre Blätter über die Wasseroberfläche hinaus schieben und an der Luft assimilieren, gibt es zahlreiche submerse Makrophyten, die in der Lage sind HCO₃⁻ zu nutzen.

Bei einigen Pflanzen, wie z.B. *Potamogeton lucens* und *Elodea canadensis* wurden an den Blättern physiologische Polaritäten festgestellt. Sie säuern die unmittelbare Umgebung ihrer Blattunterseiten an, während die Blattoberseiten zunehmend alkalischer werden. Die Untersuchung anderer Hydrophyten ergab meistens eine Ansäuerung der gesamten Blattoberfläche. Diese Veränderung des pH in der unmittelbaren Umgebung der Blattoberflächen führt dazu, dass das im Wasser vorhandene HCO₃⁻ sich in CO₂ umwandelt und so durch Diffusion über die gesamte Blattoberfläche in die Pflanzen gelangt. Es wurde vermutet, dass die Pflanzen aktiv H⁺-Ionen an die Umgebung abgeben, um so die CO₂-Konzentration an ihren Blattoberflächen zu erhöhen. Parallel dazu wurden OH⁻-Ionen abgegeben, um den intrazellulären pH aufrecht zu erhalten. Dies erfolgte bei polaren Blättern an der Blattoberseite, die dadurch alkalisch wurden. Auf welche Weise solche Pflanzen ihren intrazellulären pH aufrecht erhielten, die ihre gesamte Blattoberfläche ansäuerten, war bis zu diesem Zeitpunkt unklar.

Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (46E5B11) konnte in den Epidermiszellen der Blattunterseite von *Elodea canadensis* eine 100kDa PM-H⁺-ATPase lokalisiert werden, die in den Zellen der Blattoberseite nicht zu finden war. Damit lag die Vermutung nahe, dass diese mit der Fähigkeit der Nutzung von HCO₃⁻ in Zusammenhang steht.

Neben *E. canadensis* wurden die Blätter zahlreicher Wasserpflanzen mit Hilfe der Antigen-Antikörper-Technik durch indirekte Markierung auf ein Vorhandensein der PM-H⁺-ATPase hin untersucht. und von einigen ausgewählten Pflanzen auch die Stängel und Wurzeln. Mit dem Fluorochrom FITC, welches an einem sekundären Antikörper anhaftete, konnte die Lokalisierung der Protonenpumpe im Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) sichtbar gemacht werden. Dabei wurde festgestellt, dass die PM-H⁺-ATPase nur bei solchen Pflanzen in den Epidermis- und Mesophyllzellen der Blätter

vorkam, die HCO_3^- als Kohlenstoff-Quelle nutzen konnten. Die PM- H^+ -ATPase wurde in physiologisch polaren Blättern in den Epidermiszellen an der Blattunterseite und in den Mesophyllzellen lokalisiert und bei nicht polaren Blättern in der gesamten Epidermis sowie gelegentlich in den angrenzenden Mesophyllzellen. In Blättern von Wasserpflanzen, die lediglich CO_2 aufnehmen, fanden sich keine Markierungen, höchstens in den Leitbündeln war eine FITC-Fluoreszenz zu erkennen. Auch in den Stängeln und Wurzeln wurden gelegentlich in den Leitbündeln Markierungen entdeckt. Dies zeigte, dass die Pflanzen nur über die Blätter in der Lage sind, HCO_3^- zu nutzen.

Diese Ergebnisse wurden durch histologische und cytologische Untersuchungen mit dem Licht- und Elektronenmikroskop ergänzt. Dabei fanden sich strukturelle Besonderheiten in Blättern, Stängel und Wurzeln, die mit dem Vorkommen einer PM- H^+ -ATPase und mit der Nutzung von HCO_3^- in Verbindung stehen. Biochemische Untersuchungen zeigten die Spezifität des eingesetzten monoklonalen Antikörpers gegen die PM- H^+ -ATPase.

Die Untersuchungen mit dem CLSM zeigten neben der ungleichen Verteilung in den verschiedenen Blattgeweben auch eine asymmetrische Verteilung in den einzelnen Zellen. Nach der Ermittlung einer optimalen Fixierung für die Elektronenmikroskopie, bei der sowohl die Struktur als auch die Antigenität für den Antikörper erhalten blieb, wurde die Verteilung der PM- H^+ -ATPase im Elektronenmikroskop mit einer Immunogoldmarkierung untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Lokalisationen der Protonenpumpen vor allem an den Plasmamembranen der periklinen Innenseiten der Epidermiszellen, den antiklinen Seiten und im Plasmalemma der angrenzenden Mesophyllzellen lagen.

Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnten zwei Hypothesen über die Aufnahmemechanismen von HCO_3^- bei polaren und nicht polaren Blättern von Wasserpflanzen erstellt werden. Die asymmetrische Verteilung der PM- H^+ -ATPase in den Blättern von Wasserpflanzen, sowohl in den Geweben als auch auf cytologischer Ebene legt die Vermutung nahe, dass bei polaren Blättern HCO_3^- in erster Linie über die Blattoberseite in den Apoplasten gelangt und dort in CO_2 umgewandelt wird. Die Ansäuerung der Blattunterseite kommt durch die Ansäuerung des Apoplasten zustande. Dort wird ebenfalls HCO_3^- in CO_2 umgewandelt und aufgenommen.

Die Verteilung der PM- H^+ -ATPase in nicht polaren Blättern lässt einen anderen Aufnahmemechanismus vermuten. Die Ansäuerung des Apoplasten und der Blattoberfläche könnte zeitlich versetzt von der Abgabe der OH^- -Ionen stattfinden. Mit Beginn der Belichtung werden H^+ -Ionen in den Apoplasten und an die Blattoberfläche abgegeben. Ab einem bestimmten pH im Apoplasten wird die Aktivität der PM- H^+ -ATPase dann gehemmt und die H^+ -Ionen-Abgabe gestoppt. Jetzt können OH^- -Ionen abgegeben werden, um den intrazellulären pH zu regulieren.

Da der extrazelluläre pH einen bedeutenden Einfluss auf die Aktivität der PM- H^+ -ATPase hat, wurde *M. spicatum* und *M. aquaticum* über fünf Wochen bei verschiedenen pH-Werten gehalten. Eine Messung der Membranspannung während der Versuchszeit zeigte jedoch kaum einen Einfluss. Bei der Lokalisation und der Verteilung der PM- H^+ -ATPase konnten Veränderungen bemerkt werden, die jedoch eher auf eine Degeneration der Blätter als auf einen tatsächlichen Effekt der unterschiedlichen pH-Werte zurückzuführen sind.

Der Nachweis der PM- H^+ -ATPase und ihre asymmetrische Verteilung in den Zellen wirft neue Fragen auf und zeigt, dass der Mechanismus der HCO_3^- -Nutzung noch nicht restlos verstanden ist.

6. Literatur

- AGAMI, M.; WAISEL, Y. (1986): The ecophysiology of roots of submerged vascular plants; *Physiol. Vég.*; 24 (5); 607-624
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. (1995): *Molekularbiologie der Zelle*; 3. Auflage; VCH; Weinheim
- ANDRIA, J. R.; PÉREZ-LLORÉNS, J. L.; VERGARA, J. J. (1999): Mechanisms of inorganic carbon acquisition in *Gracilaria gaditana* nom. prov. (Rhodophyta); *Planta*; 208; 564-573
- ANGELSTEIN, U. (1911): Über die Kohlensäureassimilation submerser Wasserpflanzen in Bikarbonat- und Karbonatlösungen; *Beitr. Biol. Pfl.*; 10; 87-117
- ARENS, K. (1933): Physiologisch polarisierter Massenaustausch und Photosynthese bei submersen Wasserpflanzen 1; *Planta*; 20; 622-658
- BADGER, M. R. (1987): The CO₂-concentrating mechanism in aquatic phototrophs; in: Hatch, M. D.; Boardman, N. K.(eds): *The Biochemistry of Plants*; Vol. 10: Photosynthesis; Academic Press, Inc.; San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto; 219-274
- BADGER, M.R.; ANDREWS, T.J. (1982): Photosynthesis and inorganic usage by the marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp.; *Plant Physiol.*; 70; 517-523
- BADGER, M.R.; KAPLAN, A.; BERRY, J.A. (1978): A mechanism for concentrating CO₂ in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Anabaena variabilis* and its role in photosynthetic CO₂ fixation; *Carnegie Inst.; Washington Yearb.*; 77; 251-261
- BAIN, J. T.; PROCTOR, M. C. F. (1980): The requirement of aquatic bryophytes for free CO₂ as an inorganic carbon source: some experimental evidence; *New Phytologist*; 86; 393-400
- BAUR, M.; MEYER, A. J.; HEUMANN, H.-G.; LÜTZELSCHWAB, M.; MICHALKE, W. (1996): Distribution of plasma membrane H⁺-ATPase and polar current patterns in leaves and stems of *Elodea canadensis*; *Bot. Acta*; 109; 382-387
- BECKER, D.; ZEILINGER, C.; LOHSE, G.; DEPTA, H.; HEDRICH, R. (1993): Identification and biochemical characterization of the plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells of *Vicia faba* L.; *Planta*; 190; 44-50
- BELLANDO, M.; MARRÈ, M.T.; SACCO, S.; TALARICO, A.; VENEGONI, A.; MARRÈ, E. (1995): Transmembrane potential-mediated coupling between H⁺ pump operation and K⁺ fluxes in *Elodea densa* leaves hyperpolarized by fusicoccin, light or acid load; *Plant, Cell Environ.*; 18; 963-976
- BOHLE, H. W. (1995): *Spezielle Ökologie: Limnische Systeme*; Springer Verlag; Berlin, Heidelberg

- BOUCHÉ-PILLON; S.; FLEURAT-LESSARD, P.; FROMONT, J.-CH.; SERRANO, R.; BONNEMAIN, J.-L. (1994): Immunolocalization of the plasma membrane H⁺-ATPase in minor veins of *Vicia faba* in relation to phloem loading; *Plant Physiol.*; 105; 691-697
- BOZZO, G. G.; COLMAN, B. (2000): The induction of inorganic carbon transport and external carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii* ist regulated by external CO₂ concentration; *Plant, Cell Environ.*; 23; 1137-1144
- BRADFORD, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding; *Anal. Biochem.*; 72; 248-254
- BRISKIN, D. P.; REYNOLDS-NIESMAN, I. (1991): Determination of H⁺/ATP stoichiometry for the plasma membrane H⁺-ATPase from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue; *Plant Physiol.*; 95; 242-250
- BRORSON, S. H.; HANSEN, A. R.; NIELSEN, H. Z.; WOXEN, I. K. (2001): A comparative study of the immunogold labeling on H₂O₂-treated and heated epoxy sections; *Micron*; 32;147-151
- BRÜNNER, G. (1953): Wasserpflanzen, Beschreibung, Bewertung und Kulturpraxis der wichtigsten in Vivarien gehaltenen Wasser- und Sumpfpflanzen; Gustav Wenzel & Sohn; Braunschweig
- CAMONI, L.; IORI, V.; MARRA, M.; ADUCCI, P. (2000): Phosphorylations-dependent interaction between plant plasma membrane H⁺-ATPase and 14-3-3 proteins; *J. Biol. Chem.*; 275; 9919-9923
- CAMPBELL, A.(1983): Was lebt im Mittelmeer. Pflanzen und Tiere der Mittelmeerküsten in Farbe; Kosmos Natur Führer; Franckh´sche Verlagshandlung, Stuttgart
- CASPER; S. J.; KRAUSCH, H.-D. (1980a): Pteridophyta und Anthophyta, 1. Teil: Lycopodiaceae in: Ettl, H.; Gerloff, J.; Heynig, H. (Hrsg): Süßwasserflora von Mitteleuropa; Bd. 23; Gustav Fischer Verlag; Stuttgart, New York
- CASPER; S. J.; KRAUSCH, H.-D. (1980b): Pteridophyta und Anthophyta, 2. Teil: Saururaceae bis Asteraceae in: Ettl, H.; Gerloff, J.; Heynig, H. (Hrsg): Süßwasserflora von Mitteleuropa; Bd. 24; Gustav Fischer Verlag; Stuttgart, New York
- COLEMAN, J.R.; GROSSMANN, A. R. (1984): The biosynthesis of carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii* during adaptation to low CO₂; *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81, 6049-6053
- DALE, H. M. (1957): Developmental studies of *Elodea canadensis* Michx. II. Experimental studies on morphological effects of darkness; *Can. J. Bot.*; 35; 51-54
- DAME, J. B.; SCARBOROUGH, G. A. (1980): Identification of the hydrolytic moiety of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase and demonstration of a phosphoryl-enzyme intermediate in its catalytic mechanism; *Biochemistry*; 19; 2931-2937

- DANSCHER, G. (1981): Localization of gold in biological tissue: a method for light and electron microscopy, *Histochemistry*, 71, 81-88
- DEBROSSES; G.; STELLING, J.; RENAUDIN, J. P. (1998): Dephosphorylation activates the purified plant plasma membrane H⁺-ATPase. Possible function of phosphothreonine residues in a mechanism not involving the regulatory C-terminal domain of the enzyme; *Eur. J. Biochem.*; 251; 496-503
- DE WIT, H. C. D. (1990): *Aquarienpflanzen*; 2. überarb. u. neugestaltete Aufl.; Eugen Ulmer Verlag GmbH & Co; Stuttgart
- DEWITT, N. D.; HONG, B.; SUSSMANN, M. R.; HARPER, J. F. (1996): Targeting of two *Arabidopsis* H⁺-ATPase isoforms to the plasma membrane; *Plant Physiol.*; 112; 833-844
- DEWITT; N. D.; SUSSMANN, M. R. (1995): Immuno-cytochemical localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) in phloem companion cells; *Plant Cell*; 7; 2053-2067
- ECKERT, W. A.; KARTENBECK, J. (1997): *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie*; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- ELZENGA, J. T. M. (1989): *The mechanism for bicarbonate utilization in water plants*; Proefschrift; Rijksuniversiteit Groningen
- ELZENGA, J. T. M.; PRINS, H. B. A. (1989a): Light-induced polar pH changes in leaves of *Elodea canadensis*. I. Effects of carbon concentration and light intensity; *Plant Physiol.*; 91; 62-67
- ELZENGA, J. T. M.; PRINS, H. B. A. (1989b): Light-induced polar pH changes in leaves of *Elodea canadensis*. II. Effects of ferricyanide: Evidence for modulation by the redox state of the cytoplasm; *Plant Physiol.*; 91; 68-72
- ETTL, H.; GERLOFF, J.; HEYNIG, H. (1980): *Süßwasserflora von Mitteleuropa*; Bd. 23 u. 24; Gustav Fischer Verlag; Stuttgart, New York
- FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J. A. (1997): *Aquatic photosynthesis*; Blackwell Science
- FERRIER, J. M. (1980): Apparent bicarbonate uptake and possible plasmamembran proton flux in *Chara corallina*; *Plant Physiol.*; 66; 1198-1199
- FLEGLER, S. L.; HECKMANN JR., J. W.; KLOMPARENS, K. L. (1995): *Elektronenmikroskopie. Grundlagen, Methoden, Anwendungen*; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford
- FRANCESCHI, V. R.; LUCAS, W. J. (1980): Structure and possible function(s) of charosomes; complex plasmalemma-cell wall elaborations present in some characean species; *Protoplasma*; 104; 253-271
- FRANCI, C.; VIDAL, C. (1988): Coupling redox and encymic reactions improves the sensitivity of the ELISA-spot assay; *J. Immunol. Methods*; 107; 239-244

- FU, H.; SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C. (2000): 14-3-3 proteins: structure, function and regulation; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 40; 617-647
- GESSNER, F. (1968): Die Zellwand mariner Phanerogamen; *Marine Biol.*; 1; 181-200
- GISI, U.; SCHULIN, R.; STADELMANN, F. X.; STRICHER, H. (1997): *Bodenökologie*; 2. neu bearb. u. erw. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- HAFNER, L.; PHILIPP, E. (1996): Ökologie, in: *Materialien für den Sekundarbereich II, Biologie*; Schroedel Schulbuchverlag, Hannover
- HASSMAN, M., INANÇ, N. (1957): Investigations on the anatomical structure of certain submerged, floating and amphibious hydrophytes; *Istanbul Üniv. Fen Fak. Mecm., Ser. B*; 22; 137-153
- HELDER, R.J. (1975): Polar potassium transport and electrical potential difference across the leaf of *Potamogeton lucens* L.; *Proceedings Koninklijke Nederlandse Academie van Wetenschappen*; C 78; 189-197
- HEß, D. (1999): *Pflanzenphysiologie*; Verlag Eugen Ulmer; Stuttgart
- HESSE, H. (1904): *Beiträge zur Morphologie und Biologie der Wurzelhaare*; Dissertation, Jena
- HEUMANN, H.-G. (1992): Microwave-stimulated glutaraldehyde and osmium tetroxide fixation of plant tissue: ultrastructural preservation in seconds; *Histochemistry*; 97; 341-347
- HEYN, ERICH (1975): *Wasser. Ein Problem unserer Zeit; Themen zur Geographie und Gemeinschaftskunde*; 3. Auflage; Verlag Moritz Diesterweg; Frankfurt a. M., Berlin, München
- HUTZLER, P.; FISCHBACH, R.; HELLER, W.; JUNGBLUT, T. P.; REUBER, S.; SCHMITZ, R.; VEIT, M.; WEISSENBOCK, G.; SCHNITZLER, J.-P. (1998): Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal scanning microscopy; *J. Ex. Bot.*; 49; 323; 953-965
- INVERS, O.; PÉREZ, M.; ROMERO, J. (1999): Bicarbonate utilization in seagrass photosynthesis: role of carbonic anhydrase in *Posidonia oceanica* (L.) Delile and *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson; *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*; 235; 125-133
- JAHN, T.; BALUSKA, F.; MICHALKE, W.; HARPER, J. F.; VOLKMANN, D. (1998): Plasma membrane H⁺-ATPase in the root apex: Evidence for strong expression in xylem parenchyma and asymmetric localization within cortical and epidermal cells; *Physiol. Plant.*; 104; 311-316
- JAHNKE, L. S.; EIGHMY, T. T.; FAGERBERG, W. R. (1991): Studies of *Elodea nuttallii* grown under photorespiratory conditions. I. Photosynthetic characteristics; *Plant Cell Environ.*; 14; 147-156

- JURZITZA, G. (1987): Anatomie der Samenpflanzen; Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York
- KADONO, Y. (1980): Photosynthetic carbon sources in some *Potamogeton* species; Bot. Mag. Tokyo; 93; 185-194
- KAPLAN, A. (1985): Adaptation to CO₂ levels: Induction and the mechanism for inorganic carbon uptake, in: Lucas, W.J.; Berry, J.A. (eds.) (1998): Inorganic Carbon Uptake by Aquatic Photosynthetic Organisms; chapter 21; American Society of Plant Physiologists; Symposium Series; Rockville; MD; 325-338
- KAPLAN, A.; BADGER, M. R.; BERRY, J. A. (1980): Photosynthesis and intracellular inorganic carbon pool in the blue-green alga *Anabaena variabilis*: Response to external CO₂ concentration; Planta; 149; 219-226
- Kaspar, H. (1992): Pflanzen im Aquarium: Ihre Funktion und Pflege; 2. Überarb. Auflage; Ulmer Verlag, Stuttgart
- KETTNER, C. (1999): Elektrophysiologische Charakterisierung der vakuolären H⁺-ATPase von *Saccharomyces cerevisiae*; Shaker Verlag; Aachen
- KIMBER, A.; CRUMPTON, W.G.; PARKIN, T.B.; SPALDING, M.H. (1999): Sediment as a carbon source for the submersed macrophyte *Vallisneria*; Plant, Cell Environ.; 22; 1595-1600
- KIRK, J. T. O. (1994): Light and photosynthesis in aquatic ecosystems; 2nd edition; Cambridge University Press; Cambridge
- KNIEP, H. (1915): Über den Gasaustausch der Wasserpflanzen: ein Beitrag zur Kritik der Blasenzählmethode ; Jb. Wiss. Bot.; 56; 460-510
- KRABEL, D.; ESCHRICH, W.; GAMALEI, Y. V.; FROMM, J.; ZIEGLER, H. (1995): Acquisition of carbon in *Elodea canadensis* Michx.; J. Plant Physiol.; 145; 50-56
- KRAUSCH, H.-D. (1996): Farbatlas der Wasser- und Uferpflanzen; Eugen Ulmer GmbH; Stuttgart
- KYHSE-ANDERSEN, J. (1984): J. Biochem. Biophys. Methods; 10; 203-209
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4; Nature, 227; 680-685
- LAMPERT, W.; SOMMER, U. (1993): Limnoökologie; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- LONGSTRETH, D. J. (1989): Photosynthesis and photorespiration in freshwater emergent and floating plants; Aquatic Botany; 34; 287-299
- LUCAS, W. . (1983): Photosynthetic assimilation of exogenous HCO₃⁻ by aquatic plants; Ann. Rev. Plant Physiol, 34, 71-104

- LUCAS, W. J. (1985): Bicarbonate utilization by *Chara*: A re-analysis; in: Lucas, W. J.; Berry, J. A. (eds): Inorganic carbon uptake by aquatic photosynthetic organisms; Chapter 16; American Society of Plant Physiologists: Symposium series; Rockville, MD; 229-254
- LUCAS, W. J.; BERRY, J. A. (1985): Inorganic carbon transport in aquatic photosynthetic organisms; *Physiol. Plant.*; 65; 539-543
- LUCAS, W.-J.; BRECHIGNAC, F.; MIMURA, T.; OROSS, J. W. (1989): Charasomes are not essential for photosynthetic utilization of exogenous HCO_3^- in *Chara corallina*; *Protoplasma*; 151; 106-114
- LÜTTGE, U.; KLUGE, M.; BAUER, G. (1988): Botanik; VCH-Verlag, Weinheim
- LÜTTGE, U.; HIGINBOTHAM, N. (1979): Transport in plants; Springer Verlag; New York
- LÜTZELSCHWAB, M. (1990): Biochemische und immunologische Charakterisierung von Funktionen der Plasmamembran in *Curcubita pepo* L.: Evidenz für Heterogenität der Plasmamembran; Inaugural-Dissertation in der Fakultät für Biologie der Albert-Ludwig-Universität, Freiburg i. Br.
- LYR, H.; STREITBERG, H. (1955): Die Verbreitung von Hydropoten in verschiedenen Verwandtschaftskreisen der Wasserpflanzen; *Wiss. Z. Univ. Halle*; Jahrg.4; 3; 471-484
- MABERLY, S. C.; SPENCE, D. H. N. (1983): Photosynthetic inorganic carbon use by freshwater plants; *J. Ecol.*; 71; 705-724
- MADSEN, T. V.; SAND-JENSEN, K. (1991): Photosynthetic carbon assimilation in aquatic macrophytes; *Aquatic Botany*; 41; 5-40
- MALERBA, M.; BIANCHETTI, R. (2001): 14-3-3 protein-activated and autoinhibited forms of plasma membrane H^+ -ATPase; *Biochem. Biophys. Res. Com.*; 286; 984-990
- MARRÈ, M. T.; ALBERGONI, F.G.; MORONI, A.; MARRÈ, E. (1989): Light-induced activation of electrogenic H^+ -extrusion and K^+ uptake in *Elodea densa* depends on photosynthesis and is mediated by the plasma membrane H^+ -ATPase; *J. Exp. Bot.*; 40; 212; 343-352
- MATSUDA, Y.; WILLIAMS, T. G.; COLMAN, B. (1999): Quantification of the rate of CO_2 formation in the periplasmic space of microalgae during photosynthesis. A comparison of whole-cell rate constants for CO_2 and HCO_3^- uptake among three species of the green alga *Chlorella*; *Plant Cell Environ.*; 22; 397-405
- MCCULLY, M. E.; DALE, H. M. (1961): Heterophylly in *Hippuris*, a problem in identification; *Can. J. Bot.* 39; 1099-1116
- MICHELET, B.; BOUTRY, M. (1995): The plasma membrane H^+ -ATPase. A high regulated enzyme with multiple physiological functions; *Plant Physiol.*; 108; 1-6
- MIEDEMA, H.; FELLE, H.; PRINS, H. B. A. (1992): Effect of high pH on the plasma membrane potential and conductance in *Elodea densa*; *J. Membr. Biol.* 128; 63-49

- MIEDEMA, H.; PRINS, H. B. A. (1992): Coupling of proton fluxes in the polar leaves of *Potamogeton lucens* L.; J. Exp. Bot. 43; 252; 907-914
- MIEDEMA, H.; STAAL, M.; PRINS, H. B. A. (1996): pH-induced proton permeability changes of plasma membrane vesicles; J. Membr. Biol.; 152; 159-167
- MIYACHI, S.; TSUZUKI, M.; YAGAWA, Y. (1985): Carbonic anhydrase in various microalgae, in: Lucas, W. J.; Berry, J. A. (eds.) (1998): Inorganic carbon uptake by aquatic photosynthetic organisms; chapter 11; American Society of Plant Physiologists; Symposium Series; Rockville; MD; 145-154
- MODIGH, M.; LORENTI, M.; MAZZELLA, L. (1998): Carbon assimilation in *Posidonia oceanica*: Biotic determinants; Bot. Marina, 41,249-256
- MOLLENHAUER, H. H. (1964): Plastic embedding mixtures for the use in electron microscopy; Stain Techn.; 39; 111-114
- MØLLER, J. V.; JUUL, B.; LE MAIRE, M. (1996): Structural organization, ion transport and energy transduction of p-type-ATPase; Biochim. Biophys. Acta; 1286; 1-51
- MORSOMME, P.; BOUTRY, M. (2000): The plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation; Biochim. Biophys. Acta; 1465; 1-16
- MUNK, K. (Hrsg.) (2000): Grundstudium Biologie; Biochemie, Zellbiologie, Ökologie, Evolution; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin
- NAPP-ZINN, K. (1973): Anatomie des Blattes, II. Blattanatomie der Angiospermen, A. Entwicklungsgeschichtliche und topografische Anatomie des Angiospermenblattes in: Zimmermann, W.; Carlquist, S.; Ozenda, P.; Wulff, H. D.: Handbuch der Pflanzenanatomie; 2. Neubearb. Auflage; Spez. Teil; Bd. VIII, Teil 2A; Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart
- NAPP-ZINN, K. (1984): Anatomie des Blattes, II. Blattanatomie der Angiospermen, B. Experimentelle und ökologische Anatomie des Angiospermenblattes in: Braun, H. J.; Carlquist, S.; Ozenda, P.; Roth, I.: Handbuch der Pflanzenanatomie; Spez. Teil; Bd. VIII, Teil 2B; Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart
- NEWMAN, G. R. (1989): LR-White embedding medium for colloidal gold methods in: Hayat, M. A. (ed.): Colloidal Gold: Principles, Methods and Applications; Vol. 2; Academic Press, New York; 47-73
- NEWMAN, J. R.; RAVEN, J. A. (1999): CO₂ is the main inorganic C species entering photosynthetically active leaf protoplasts of the freshwater macrophyte *Ranunculus penicillatus* ssp. *pseudofluitans*; Plant Cell Environ.; 22; 1019-1026
- NORDHORN-RICHER, G. (1984): Primäre Fluoreszenz bei Moosen; LEITZ-Mitt. Wiss. u. Techn.; Bd. VIII; Nr. 6; 167-170

- OBERMEYER, G.; LÜTZELSCHWAB, M.; HEUMANN, H.-G.; WEISENSEEL, M. H. (1992): Immunolocalization of H⁺-ATPase in the plasma membrane of pollen grains and pollen tubes of *Lilium longiflorum*; Protoplasma; 171; 55-63
- OLIVARI, C.; MEANTI, C.; DE MICHELIS, M. I.; RASI-CALDOGNO, F. (1998): Fusicoccin binding to its plasma membrane receptor and the activation of the plasma membrane H⁺-ATPase; Plant Physiol.; 116; 529-537
- OUFATTOLE, M.; ARANGO, M. BOUTRY, M. (2000): Identification and expression of three new *Nicotiana plumbaginifolia* genes which encode isoforms of a plasma-membrane H⁺-ATPase, and one of which is induced by mechanical stress; Planta; 10; 715-722
- PALADE, G. E. (1952): A study of fixation for the electron microscopy; J. Exp. Med.; 95; 285-298
- PALMGREN, M. G. (1991): Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase; Physiol. Plant.; 83; 314-323
- PALMGREN, M. G. (1998): Proton gradients and plant growth: Role of the plasma membrane H⁺-ATPase, in: Callow, J.A. (1998): Advances in botanical research; Vol. 28; Academic Press; San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto
- PALMGREN, M. G. (2001): Plant plasma membrane H⁺-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake; Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.; 52; 817-845
- PALMGREN, M. G.; CHRISTENSEN, G. (1994): Functional comparison between plasma membrane H⁺-ATPase isoforms expressed in yeast; J. Biol. Chem.; 269; 3027-3033
- PALMGREN, M. G.; SOMMARIN, M.; SERRANO, R.; LARRSON, C. (1991): Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plasma membrane H⁺-ATPase; J. Biol. Chem.; 266; 20470-20475
- PARETS-SOLER, A.; PARDO, J. M.; SERRANO, R. (1990): Immunocytolocalization of plasma membrane H⁺-ATPase; Plant Physiol.; 93; 1654-1658
- PLONSEY R.; BARR, R.C. (1991): Bioelectricity. A quantitative Approach; Plenum Press; New York
- PRICE, G. D.; WHITECROSS, M. J. (1983): Cytochemical localization of ATPase activity on the plasmalemma of *Chara corallina*; Protoplasma; 116; 65-74
- PRICE; G. D.; BADGER, M. R. (1985): Inhibition by proton buffers of photosynthetic utilization of bicarbonate in *Chara corallina*; Aust. J. Plant Physiol.; 12; 257-267
- PRINS, H. B. A.; DEGUIA, M. B. (1986): Carbon source of the water soldier, *Stratiotes aloides* L.; Aquat. Bot.; 26; 225-234
- PRINS, H. B. A.; ELZENGA, J.T.M. (1989): Bicarbonate utilization: Function and mechanism; Aquat. Bot.; 34; 59-83

- PRINS, H. B. A.; SNEL, J. F. H.; HELDER, R. J.; ZANSTRA, P. E. (1980): Photosynthetic HCO_3^- utilization and OH^- excretion in aquatic angiosperms. Light induced pH changes at the leaf surface; *Plant Physiol.*; 66; 818-822
- PRINS, H. B. A.; SNEL, J. F. H.; ZANSTRA, P. E.; HELDER, R. . (1982): The mechanism of bicarbonate assimilation by the polar leaves of *Potamogeton* and *Elodea*. CO_2 concentrations at the leaf surface; *Plant Cell Environ.*; 5; 207-214
- RASCIO, N.; CUCCATO, F.; VECCHIA, F. D.; LA ROCCA, N.; LARCHER, W. (1999): Structural and functional features of the leaves of *Ranunculus trichophyllus* Chaix., a freshwater submerged macrophyte⁶; *Plant Cell Environ.*; 22; 205-212
- RASCIO, N.; MARIANI, P.; TOMMASINI, E.; BODNER, M.; LARCHER, W. (1991): Photosynthetic strategies in leaves and stems of *Egeria densa*; *Planta*; 185; 297-303
- RASPAIL (1833): *Nouv. Système de chim. org.*
- RAUH, W.; SENGHAS, K.(1988): Schmeil Fitschen: *Flora von Deutschland und seinen angrenzenden Gebieten*; Quelle & Meyer Verlag, Heidelberg, Wiesbaden, 88. Auflage
- RAVEN, J. A.; OSBORNE, B. A.; JOHNSTON, A. M. (1985): Uptake of CO_2 by aquatic vegetation; *Plant Cell Environ.*; 8; 417-425
- 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
- RICHARDSON, K.; GRIFFITHS, H.; REED, M. L.; RAVEN, J. A.; GRIFFITHS, N. M. (1984): Inorganic carbon assimilation in the Isoetids, *Isoetes lacustris* L. and *Lobelia dortmanna* L.; *Oecologia*; 61; 115-121
- RICHTER, G. (1996): *Biochemie der Pflanzen*; Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York
- RIEDE, W. (1921): *Untersuchungen über Wasserpflanzen*; *Flora* 114; 1-118
- RIEDL, R. (1983): *Fauna und Flora des Mittelmeeres*; 3. Auflage; Verlag Paul Parey; Hamburg, Berlin; 1983
- ROELOFS, J. G. M.; SCHURKES, J. A. A.; SMITS, A. J. M. (1984): Impact of acidification and eutrophication on macrophyte communities in soft waters. II. Experimental studies; *Aquatic Bot.*; 18; 389-411
- SAND-JENSEN, K. (1983): Photosynthetic carbon source of stream macrophytes; *J. Exp. Bot.*, 34; 198-210
- SCHENK, H. (1886): *Vergleichende Anatomie der submersen Gewächse*; *Bibl. bot.* 1; 1-67

⁶ Wort im Titel so falsch geschrieben.

- SCHMIDT, E. (1978): Ökosystem See. Das Beziehungsgefüge der Lebensgemeinschaften im eutrophen See und die Gefährdung durch zivilisatorische Eingriffe; 3. Auflage; Quelle und Meyer Verlag, Heidelberg,
- SCHREIBER, E. (1922): Über die Kuticula der submersen Wasserpflanzen; Österr. bot. Z.; 71; 87-89
- SCHWOERBEL, J. (1980): Methoden in der Hydrobiologie, Süßwasserbiologie; 2. neu bearbeitete Auflage; G. Fischer Verlag; Stuttgart
- SCULTHORPE, C.D. (1985): The biology of aquatic vascular plants; Koeltz Scientific Books; Königstein; 1985 (Reprint von 1967)
- SEBALD, O.; SEYBOLD, S.; PHILIPPI, G. (1990): Die Farn- und Blütenpflanzen Baden-Württembergs; Bd. 4; Spez. Teil (Spermatophyta, Unterklasse Rosidae) Haloragaceae bis Apiaceae; Verlag Eugen Ulmer; Stuttgart
- SEIDELIN, A. (1910): The structure and biology of arctic flowering plants. I. 5. Hippuridaceae, Halorrhagidaceae and Callitrichaceae; Medd. om Grønland, 36; 295-332
- SHARPE, V.; DENNY, P. (1976): Electron microscope studies on the absorption and localization of lead in the leaf tissue of *Potamogeton pectinatus* L.; J. Ex. Bot.; 27; 101; 1155-1162
- SITTE, P.; ZIEGLER, H.; EHRENDORFER, F.; BRESINSKY, A. (1998): Straßburger Lehrbuch der Botanik; 34. Auflage; Gustav Fischer Verlag; Stuttgart, Jena, New York
- SKJØRTEN, F. J.; BRORSON, S. H.; ROALD, B.; STRØM, E. H.; LUND, B. (1992): The use of postembedding immunoelectron microscopy in the diagnosis of glomerular diseases; APMIS; 100; 1001-1007
- SKULACHEV, V. P. (1994): Bioenergetics: the evolution of molecular mechanisms and the development of bioenergetic concepts; Antonie van Leeuwenhoek; 65; 271-284
- SOKOLOWSKAJA, A. (1929): Über die Schleimorgane der *Myriophyllum*-Arten und ihre Überwinterungsweise; Flora; 124; 204-214
- SPENCE, D. H. N.; MARBERLY, S. C. (1985): Occurrence and ecological importance of HCO_3^- use among aquatic higher plants, in: Lucas, W.J.; Berry, J.A. (eds): Inorganic Carbon Uptake by Aquatic Photosynthetic Organisms; American Society of Plant Physiologists; Rockville, MD; 125-143
- STAHLBERG, R.; VAN VOLKENBURGH, E. (1999): The effect of light on membrane potential, apoplastic pH and cell expansion in leaves of *Pisum sativum* L. var. Argenteum. Role of the plasma membrane H^+ -ATPase and photosynthesis; 208; 188-195
- STEEMAN-NIELSEN, E. (1947): Photosynthesis of aquatic plants with special reference to the carbon sources; Dansk Botanisk Archiv; 12; 3-140

- STEMPAK, J. G.; WARD, R. T. (1964): An improved staining method for electron microscopy; *J. Cell Biol.*; 22; 697
- STIRLING, J. W.; GRAFF, P. S. (1995): Antigen unmasking for immunoelectron microscopy: labeling is improved by treating with sodium ethoxide or sodium metaperiodate, then heating on retrieval medium; *J. Histochem. Cytochem.*; 43; 2; 115-123
- STREBLE, H.; KRAUTER, D. (1988): *Das Leben im Wassertropfen; Mikroflora und Mikrofauna des Süßwassers*; 8. Auflage; Kosmos Verlag; Stuttgart
- SVENNELID, F.; OLSSON, A.; PIOTROWSKI, M.; ROSENQUIST, M.; OTTMANN, C.; LARSSON, CH.; OECKING, C.; SOMMARIN, M. (1999): Phosphorylation of Thr-948 at the C-terminus of the plasma membrane H⁺-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 Protein; *Plant Cell*; 11; 2379-2391
- SZE, H. (1985): H⁺-translocating ATPase: Advances using membrane vesicles; *Annu. Rev. Plant Physiol.*; 36; 175-208
- SZE, H.; WARD, J. M.; LAI, S. (1992): Vacuolar proton-translocating ATPases from plants: Structure, function and isoforms; *J. Bioenerg. Biomenbr.*; 24; 371-381
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2000): *Physiologie der Pflanzen*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- TRUMP, B. F.; SMUCKLER, E.A.; BENDITT, E. P. (1961): A method for staining epoxy sections for light microscopy; *Ultrastruc. Res.*; 5; 343-348
- TSUZUKI, M.; MIYACHI, S.; BERRY, J. A. (1985): Intracellular accumulation of inorganic carbon and its active species taken up by *Chlorella vulgaris* 11h, in: Lucas, W.J.; Berry, J.A. (eds.) (1998): *Inorganic Carbon Uptake by Aquatic Photosynthetic Organisms*; chapter 5; American Society of Plant Physiologists; Symposium Series; Rockville; MD; 53-66
- TURGEON, R.; BEEBE, D. U. (1991): The evidence for symplastic phloem loading; *Plant Physiol.*; 96; 349-354
- VAN GINKEL, L. C.; PRINS, H. B. A. (1998): Bicarbonate utilization and pH polarity. The response of photosynthetic electron transport to carbon limitation in *Potamogeton lucens* leaves; *Can. J. Bot.*, 76, 1018-1024
- VAN HALLER, T. K.; BOWS, G. (1976): Comparison of the photosynthetic characteristics of three submersed aquatic plants; *Plant Physiol.*; 58; 761-768
- VAN WINKLE, L. J. (1999): *Biomembrane transport*; Academic Press; San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto
- VERA-ESTRELLA, R.; BARKLA, B. J.; HIGGINS, V. J.; BLUMWALD, E. (1994): Plant defence response to fungal pathogens – activation of host-plasma membrane H⁺-ATPase by elicitor-induced enzyme dephosphorylation; *Plant Physiol.*; 104; 209-215

- VILLALBA, J. M.; LÜTZELSCHWAB, M.; SERRANO, R. (1991): Immunocytochemical localization of plasma-membrane H⁺-ATPase in maize coleoptiles and enclosed leaves; *Planta*; 185; 458-461
- VON GUTTENBERG, H. (1968): Der primäre Bau der Angiospermenwurzel in: Zimmermann, W.; Ozenda, P. Wulff, H. (Hrsg.): *Handbuch der Pflanzenanatomie*; 2. Neub. Auflage; Bd. VIII, Teil 5; Gebrüder Borntraeger; Berlin, Stuttgart
- WALKER, N. A.; SMITH, F. A.; CATHERS, I. R. (1980): Bicarbonate assimilation by freshwater charophytes and higher plants: I. Membrane transport of bicarbonate ions is not proven; *J. Membr. Biol.*; 57; 51-58
- WEISENSEEL, M. H.; DORN, A.; JAFFE, L.F. (1979): Natural H⁺ current traverse growing roots and root hairs of barley (*Hordeum vulgare* L.); *Plant Physiol.*; 64; 512-518
- WEISENSEEL, M. H.; LINDER, B. (1990): Polar current patterns in the leaves of the aquatic angiosperm *Elodea canadensis*; *Protoplasma*; 157; 193-202
- WENDELBERGER, E. (1986): *Pflanzen der Feuchtgebiete; Gewässer, Moore, Auen*; BLV Verlagsgesellschaft; München, Wien, Zürich

7. Anhang

Tabelle 11: Proteinbestimmung der Mikrosomenfraktionen

Pflanzen	Pflanzenorgan	Proteingehalt [µg/ml]	Eingesetztes Frischgew. [g]	Proteingehalt/ Frischgew. [µg/g]
Cabomba caroliniana	Blatt	110	28,478	3,86
	Stängel	17,35	8,53	2,03
	Wurzel	10,17	0,375	27,12
Callitriche hamulata	Blatt	110	10,434	11,0
	Stängel		4,363	
	Wurzel	-	-	-
Ceratophyllum demersum	Blatt	104	9,918 28,706	10,0
	Stängel		1,013 4,689	
Elodea canadensis	Blatt	455 1020	37,182 28,566	12,0 45,0
	Stängel	-	-	-
	Wurzel	-	-	-
Hippuris vulgaris	Blatt	120	8,219	15,0
	Stängel	140	9,702	14,0
	Wurzel	10,36	0,518	20,0
Myriophyllum aquaticum	Blatt	6,05	3,34	1,73
	Stängel	4,91	6,866	0,78
	Wurzel	240	4,345	5,50
Myriophyllum spicatum	Blatt	800 110	49,244 8,168	16,0 13,0
	Stängel	200 21,4	15,997 10,299	13,0 2,07
	Wurzel	-	-	-
Potamogeton lucens	Blatt	1400 620 400	20,8 46,71 20,0	67,0 13,0 20,0
	Stängel	600	13,4 1,96	45,0
	Wurzel	-	-	-
Potamogeton perfoliatus	Blatt	980 3320 336	10,0 25,1 6,184	98,0 132,0 27,0
	Stängel	600 580 27,0	3,9 9,81 4,031	200,0 59,0 6,69
	Wurzel	-	-	-
Ranunculus penicillatus	Blatt	590	48,768	12,0
	Stängel	370	24,451	15,0
	Wurzel	350	6,182	57,0
Stratiotes aloides	Blatt	600 220 570	35,1 37,004 25,008	17,0 5,9 23,0
	Wurzel		10,7 4,038 1,399	
Vallisneria spiralis	Blatt	940 170	32,4 32,36	29,0 5,30
	Wurzel	520 280	14,0 16,0	37,0 18,0

Tabelle 12: Auszählung der Goldpartikel zur Ermittlung der optimalen Fixierung

	Fixierung	Einbettungsmittel Vorbehandlungen	Ges. Anzahl d. Goldpartikel (G) in 23 μm^2		Anzahl d. Goldpartikel a. d. Plasmamembran (GP)		Spezifische Verteilung der Goldpartikel (GP/G)	
1	2,5% Glutaraldehyd 1% OsO ₄	Epon LR-White	0		0		0	
			0		0		0	
2	2.5% Glutaraldehyd	Epon LR-White	0		0		0	
			0		0		0	
3	2,5% Glutaraldehyd 1% Osmium Mikrowellenfixierung	LR-White	0		0		0	
4	2.5% Glutaraldehyd Mikrowellenfixierung	LR-White	0		0		0	
5	0,1% Glutaraldehyd 2.5% Formaldehyd	LR-White	61		25		0,41	
			36		17		0,47	
			13		5		0,38	
6	0,05% Glutaraldehyd 3% Formaldehyd	LR-White	55		18		0,33	
			38		24		0,63	
7	8% Formaldehyd	LR-White	14	16	12	13	0,86	0,81
			9	22	8	22	0,88	1,00
			8	13	8	9	1,00	0,69
			17	9	16	6	0,94	0,66
			7	16	7	16	1,00	1,00
			12	17	10	17	0,83	1,00
8	8% Formaldehyd	LR-White	43	97	39	89	0,90	0,92
			47	19	42	18	0,89	0,95
			35	22	32	18	0,91	0,82
			43	77	35	73	0,81	0,95

Tabelle 13: pH-Messungen bei *M. spicatum* und *M. aquaticum*

Tag	Ansatz 1 variabler pH, Ms	Absatz 2 variabler pH, Ma	Ansatz 3 pH 8.0 Ms	Ansatz 4 pH 7.0 Ms	Ansatz 5 pH 6.0 Ms
1	6,0	6,0	8,01	7,01	6,05
2	6,43	6,56	9,00	8,96	8,16
3	6,84	6,64	7,98	7,05	5,98
4	6,86	6,54	8,53	7,70	6,40
5	6,87	6,98	8,64	7,87	6,60
6	7,29	7,57	8,94	8,17	6,61
7	7,20	7,35	8,00	7,01	5,98
8	-	-	8,86	7,91	6,6
9	7,94	8,27	7,98	6,96	6,00
10	8,04	8,10	8,56	7,46	6,39
11	8,69	8,35	8,87	7,97	6,69
12	8,98	8,43	8,01	7,04	6,00
13	8,83	8,08	8,51	7,58	6,28
14	8,96	8,27	8,92	8,73	6,48
15	9,11	8,21	8,04	7,04	6,04
16	9,16	8,36	8,51 Δ pH 0,47	7,76 Δ pH 0,72	6,34
17	9,26	8,19	8,64	7,90	6,39
18	9,27	8,22	8,06	6,98	6,04
19	9,38	8,47	8,23	7,43	6,28
20	9,39	8,84	8,65	7,73	6,32
21	9,44	8,68	8,73	8,15	6,36
22	9,55	8,85	8,06	7,03	5,99
23	9,47	8,67	8,72	7,84	6,44
24	-	-	8,92	8,16	6,50
25	9,52	8,84	8,01	7,06	5,97
26	9,53	8,85	8,79	7,84	6,27
27	9,52	8,86	9,03	8,68	6,42
28	9,55	8,79	7,92	7,03	5,97
29	-	-	8,99	8,11	6,25
30	9,59	8,83	9,06	8,43	6,33
31	9,48	8,89	8,02	7,04	6,04
32	9,53	8,59	8,55	7,55	6,19
33	9,52	8,90	8,75	7,66	6,28
34			8,01	7,06	6,02
35			8,45	7,53	6,47
36			9,07 Δ pH 0,62	8,63 Δ pH 1,1	6,61
37			8,00	7,06	6,03
38			8,44	7,4	6,32
39			8,87	7,65	6,44
40			8,96	8,52	6,69
41			8,02	6,99	6,09
42			9,03	8,31	6,37
43			9,00	8,85	6,36

(Ms: *Myriophyllum spicatum*. Ma: *M. aquaticum*)

Tabelle 14: CO₂-Konzentrationen (mg/l) bei *M. spicatum*

Tag	Ms 3 CO ₂ Konz.	Ms 4 CO ₂ Konz.	Ms 5 CO ₂ Konz.
1			
2	61,2	105	248,4
3			
4			
5			
6			
7			
8	90,6	98,8	130,6
9			
10			
11			
12	-	116,6	144,8
13			
14			
15	74,8	75,8	152
16			
17			
18	96,4	120	192,4
19			
20			
21			
22	81,6	85,0	176
23			
24			
25	74,0	129	159,6
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32	100,6	124,0	-
33			
34			
35	120	141,2	191,6
36			
37	83,8	99,4	168
38			
39			
40	86,2	134,8	181,6
41			
42			
43	44,2	41,8	155

Tabelle 15: Lineare Dichte der Goldpartikel in Epidermiszellen v. *Myriophyllum spicatum* [GK/ μm PM-H+-ATPase]

Zellen	Außenseite	rechte Seite	Innenseite	linke Seite
1	1,07	5,58	4,16	3,32
2	4,32	3,41	4,90	3,99
3	4,36	3,92	6,62	5,05
4	4,64	7,10	5,14	2,14
5	5,63	4,71	5,67	5,59
6	5,14	4,46	5,83	7,78
7	4,26	5,24	5,10	3,79
8	3,47	4,88	5,08	3,88
9	5,86	5,04	7,11	6,65
10	3,66	7,95	5,36	2,63
MW	4,01	5,41	5,61	4,19
STD	1,475	1,3	1,128	1,69

(GK: Goldkörner, MW: Mittelwert, STD: Standardabweichung)

Tabelle 16: Lineare Dichte der Goldpartikel in d. unteren Epidermis v. *E. canadensis* [GK/ μm PM]

Zellen	Außenseite	Rechte Seite	Innenseite	Linke Seite
1	9,29		1,81	4,38
2	5,22	1,99	1,79	3,45
3	2,09	3,6	0,89	3,61
4	5,55	7,31	1,21	4,31
5	2,61	3,87	2,02	3,36
6	2,57	7,74	1,68	2,02
MW	4,56	4,90	1,54	3,52
Std	2,32	2,05	0,36	0,72

(GK: Goldkörner, MW: Mittelwert, STD: Standardabweichung)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-G. Heumann für die Überlassung des Themas und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Leist danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Michalke (Freiburg) danke ich für die Überlassung des monoklonalen Antikörpers und die freundliche und hilfreiche Einführung in die Arbeit mit biochemischen Methoden.

Frau Dr. C. Boxler und Frau Dr. Siefermann-Harms danke ich herzlich für die stets anregenden Diskussionen.

Herrn Dr. M. Seyfried danke ich für seine tatkräftige Unterstützung in Sachen Computer und für seine Bereitschaft stets zu helfen wenn es „brennt“.

Frau Purper gilt mein besonderer Dank für ihre technische Unterstützung, für die vielen anregenden Diskussionen und die gemeinsamen entspannenden Kaffeepausen.

Dem Personal des Botanischen Gartens und besonders Herrn Dill danke ich für die Unterstützung bei der Pflege der Aquarien.

Frau A. Klein danke ich für die Bereitschaft die Korrektur zu übernehmen.

Ferner möchte ich mit bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Botanischen Instituts I für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Einen ganz besonderen Dank möchte ich Frau Müller aussprechen, die mit ihrer Arbeit in der Spülküche uns das tägliche Arbeiten wesentlich erleichtert hat.

Meinem Lebensgefährten Herrn Ch. Keipert möchte ich für die viele Geduld mit mir, die aufbauenden Worte und die zahllosen Korrekturen bedanken, vor allem aber für sein großes Verständnis und seine Rücksichtnahme.