



UNIVERSITÄT HOHENHEIM

Fakultät Agrarwissenschaften

Institut für Tropische Agrarwissenschaften

(Hans-Ruthenberg-Institut)

Einfluss von Salzstress auf die physiologische Aktivität von Blättern unterschiedlichen Alters bei der Süßkartoffel

Bachelorarbeit

Susanne Burgert

Studiengang Agrarbiologie

Matrikelnummer: 671219

Eingereicht: 18.10.19

Prüfer: Prof. Dr. Folkard Asch

I. Zusammenfassung

Da sich das Anbauggebiet der Süßkartoffel (*Ipomoea batatas* L.) auf die vermehrt von Salzbelastung betroffene subtropische Zone konzentriert, ist es wichtig Auswirkungen von Salzstress auf Süßkartoffeln zu untersuchen, um Toleranzmechanismen zu verstehen und nutzbar zu machen.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von Salzstress auf die physiologische Aktivität von Blättern unterschiedlichen Alters der Süßkartoffel zu untersuchen. Für den hydroponischen Versuch wurden eine salztolerante (BARI SP8) und eine salzempfindliche Sorte (BARI SP4) einer 100 mmol NaCl-Konzentration ausgesetzt. Zu verschiedenen Probezeitpunkten wurden die Natrium-, Chlorid- und Kaliumkonzentrationen sowie die Aktivität ausgewählter anti-oxidativer Enzyme einzelner Blätter gemessen.

Bei der Auswertung der Ionenkonzentrationsmessungen zeigten sich sortenspezifische Muster. BARI SP4 scheint über einen Mechanismus der Natrium-Regulation und BARI SP8 über einen Mechanismus der Chlorid-Regulation zu verfügen. Dabei ist nicht eindeutig ob es sich um Abschirmungs- oder Verlagerungsmechanismen handelt. Die Chlorid-Aufnahme bei BARI SP4 und die Natrium-Aufnahme bei BARI SP8 erfolgten unkontrolliert und es zeigte sich eine Abhängigkeit der Ionenakkumulation zur jeweiligen blattspezifischen Transpirationsdauer. Die Kaliumaufnahme beider Sorten wurde negativ von Salzstress beeinflusst. Dies war auch in einer Abnahme des Kalium-Natrium-Verhältnisses sichtbar.

Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Aktivitäten der Glutathion-Reduktase und Katalase Teil der Reaktion auf durch Salzstress bedingten oxidativen Stress sind. Ein Anstieg der Glutathion-Reduktase-Aktivität trägt vermutlich zur erhöhten Salztoleranz von BARI SP8 bei. Die Enzymregulation scheint dabei in Abhängigkeit des lokalen Stresslevels der einzelnen Blätter zu erfolgen und nicht über die Blattebenen hinaus zu reichen. Die Stickstoffassimilation wurde in beiden Sorten nicht von Salzstress beeinträchtigt und in den Chloroplasten zeigte sich kein Abbau von Chlorophyll.

Auf Grundlage dieser Resultate ist es möglich weiterführende Versuche anzusetzen, die dem genaueren Verständnis von Stressreaktionen und Toleranzmechanismen gewidmet sind.

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Reaktionswege infolge von Elektronentransferreaktionen am PS I in Chloroplasten.	4
Abb. 2: Aufbau der Hydroponikanlage.	7
Abb. 3: Übersicht über den Versuchsaufbau.	8
Abb. 4: Verlauf der Temperatur und der relativen Luftfeuchte im Gewächshaus während des Versuchzeitraums.	9
Abb. 5: Auswirkungen von Salzstress auf die Natrium-Konzentration in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP4 zu verschiedenen Probezeitpunkten.	14
Abb. 6: Auswirkungen von Salzstress auf die Natrium-Konzentration in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP8 zu verschiedenen Probezeitpunkten.	15
Abb. 7: Auswirkungen von Salzstress auf die Chlorid-Konzentration in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP4 zu verschiedenen Probezeitpunkten.	16
Abb. 8: Auswirkungen von Salzstress auf die Chlorid-Konzentration in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP8 zu verschiedenen Probezeitpunkten.	17
Abb. 9: Auswirkungen von Salzstress auf die Kalium-Konzentration in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP4 zu verschiedenen Probezeitpunkten.	18
Abb. 10: Auswirkungen von Salzstress auf die Kalium-Konzentration in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP8 zu verschiedenen Probezeitpunkten.	19
Abb. 11: Logarithmierte Darstellung der Auswirkungen von Salzstress auf das Kalium-Natrium-Verhältnis in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP4 zu verschiedenen Probezeitpunkten.	20
Abb. 12: Logarithmierte Darstellung der Auswirkungen von Salzstress auf das Kalium-Natrium-Verhältnis in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP8 zu verschiedenen Probezeitpunkten.	21

Abb. 13: Auswirkungen von Salzstress auf die GR-Aktivität in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP4 zu verschiedenen Probezeitpunkten.....	22
Abb. 14: Auswirkungen von Salzstress auf die GR-Aktivität in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP8 zu verschiedenen Probezeitpunkten.....	23
Abb. 15: Auswirkungen von Salzstress auf die CAT-Aktivität in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP4 zu verschiedenen Probezeitpunkten.....	24
Abb. 16: Auswirkungen von Salzstress auf die CAT-Aktivität in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP8 zu verschiedenen Probezeitpunkten.....	25
Abb. 17: Auswirkungen von Salzstress auf die POX-, APX- und SOD-Aktivität in Blättern verschiedenen Alters der Sorten BARI SP4 und BARI SP8 zu verschiedenen Probezeitpunkten.....	26
Abb. 18: Auswirkungen von Salzstress auf die SPAD-Werte in Blättern verschiedenen Alters der Sorten BARI SP4 und BARI SP8 zu verschiedenen Probezeitpunkten.....	27

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Liste der verwendeten Geräte.....	5
Tab. 2: Zusammensetzung der Yoshida-EDTA-Nährlösung (pH 6).	7
Tab. 3: Messmethoden der Enzymaktivitäten und des Proteingehalts.	11

IV. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
APX	Ascorbat-Peroxidase
CAT	Katalase
cm	Zentimeter
FG	Frischgewicht
GR	Glutathion-Reduktase
h	Stunden
l	Liter
min	Minuten
mmol	Millimolar
Ø	Durchmesser
POX	Peroxidase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunden
SE	Standardfehler
SOD	Superoxid-Dismutase
SPAD	Single Photon Avalanche Diode
TG	Trockengewicht
Umin ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
μ	Mikro

V. Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung	I
II.	Abbildungsverzeichnis	II
III.	Tabellenverzeichnis	IV
IV.	Abkürzungsverzeichnis	V
V.	Inhaltsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Kenntnisstand	2
2	Material und Methoden	5
2.1	Material	5
2.2	Methoden	5
2.2.1	Versuchsaufbau	5
2.2.2	Versuchsdurchführung	7
2.2.3	Klimadaten	9
2.3	Datenerhebungen	9
2.3.1	SPAD	9
2.3.2	Frisch- und Trockengewicht	10
2.3.3	Ionenkonzentrationen	10
2.3.4	Enzymaktivitäten und Proteinkonzentration	10
2.4	Statistische Auswertungen	12
3	Resultate	13
3.1	Ionenkonzentrationen/-verhältnis	13
3.2	Aktivität anti-oxidativer Enzyme	22
3.3	SPAD	27
4	Diskussion	28
4.1	Ionenkonzentrationen/-verhältnis	28
4.2	Aktivität anti-oxidativer Enzyme	30
4.3	SPAD	31
4.4	Mögliche Fehlerquellen	32
4.5	Fazit und Ausblick	33
VI.	Literaturverzeichnis	VII
VII.	Danksagung	IX
VIII.	Eidesstattliche Erklärung	X

1 Einleitung

Salzbelastete Böden gehören zu den wichtigsten abiotischen, einschränkenden Faktoren der Pflanzenproduktion (Mahajan & Tuteja, 2005). Vor allem in ariden und semiariden Klimazonen ist der Anbau von Kulturen stark betroffen. Da die Evapotranspiration in diesen Regionen den Wassereintrag überschreitet, akkumulieren sich die im Wasser gelösten Salze im Boden. Dieser Effekt wird durch unsachgemäße Bewässerung verstärkt (Zaman et al., 2018). Auch in Folge des Klimawandels wird mit der Zunahme salzbelasteter Böden gerechnet. Dies ist durch die verstärkte Evapotranspiration aufgrund von steigenden Temperaturen und den Anstieg des Meeresspiegels bedingt. (Zaman et al., 2018).

Der Großteil der Weltproduktion der Süßkartoffel (*Ipomoea batatas* L.) erfolgt in asiatischen Ländern, darunter auch Bangladesch (FAOSTAT, 2017). Dort ist besonders die Küstenzone, welche über 30% der landwirtschaftlich genutzten Fläche einschließt, von Salinität betroffen (Haque, 2006).

Da die Süßkartoffel in Bezug auf Salzstress als moderat sensitiv eingestuft wird (Hanson et al., 2006), muss aufgrund von Salzstress mit Ertragseinbußen gerechnet werden. Folglich ist es von Interesse, die Auswirkungen von Salzstress auf Süßkartoffeln intensiver zu untersuchen, um Toleranzmechanismen besser zu verstehen und nutzbar zu machen. Ziel dieser Arbeit ist es, die Reaktionen der Süßkartoffel auf Salzstress auf Blattebene zu untersuchen. Hierfür sollen die Auswirkungen von erhöhten NaCl-Konzentrationen im Wurzelraum auf Ionenkonzentrationen- und gleichgewichte in Blättern verschiedenen Alters untersucht werden. Zusätzlich wird der mögliche Einfluss ausgewählter anti-oxidativer Enzyme auf die Salztoleranz bestimmt. Durch die Betrachtung der einzelnen Blattebenen ist es möglich festzustellen, ob die Enzymregulation in Abhängigkeit des lokalen Stresslevels erfolgt oder ob die Regulation von weiteren Faktoren wie beispielsweise dem Blattalter beeinflusst wird.

1.1 Kenntnisstand

Erhöhte NaCl-Konzentrationen im Wurzelraum können in Pflanzen zwei verschiedene Arten von Stress bedingen, Wassermangel- und ionischen Stress. Aufgrund der erhöhten Salzkonzentration verringert sich das osmotische Wasserpotential der Bodenlösung, wodurch sich die Differenz der Wasserpotentiale zwischen Wurzel und Boden reduziert. Dieser Potentialunterschied führt zu einer verminderten Wasseraufnahme in die Wurzel. Zum anderen verfügen Glykophyten nicht über effektive Mechanismen der Salzabschirmung. Daher führen erhöhte NaCl-Konzentrationen im Wurzelraum zu einer vermehrten und unkontrollierten Aufnahme dieser Ionen, was in der Pflanze ionischen Stress auslöst (Munns & Tester, 2008).

Die Auswirkungen der unkontrollierten Akkumulation sind dabei primär auf osmotische Störungen zurückzuführen (Lechno et al., 1997). Erst nach langandauerndem Salzstress ist auch mit ionen-toxizitätsbedingten Symptomen zu rechnen (Munns & Tester, 2008; Teakle & Tyerman, 2010).

Der Ionentransport erfolgt passiv durch den Transpirationsstrom. Am Ende des Transportweges akkumulieren sich die Ionen in den Blättern. Demzufolge sind in den Blättern, sofern keine Verlagerungsmechanismen vorhanden sind, Natrium- und Chlorid-Konzentrationen in Abhängigkeit der blattspezifischen Transpirationsdauer zu erwarten. Diese ist hinsichtlich kurzer Zeitperioden primär durch das Blattalter, also den Zeitpunkt der Blattbildung bestimmt, wird aber auch von weiteren Faktoren wie der Blattfläche beeinflusst.

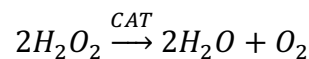
Durch die erhöhte Natriumaufnahme wird der Kaliumhaushalt negativ beeinflusst. Da Kalium und Natrium in direkter Konkurrenz um Ionenkanäle stehen (Schulze et al., 2002) bringt die Erhöhung der Natriumkonzentration somit eine reduzierte Kaliumaufnahme mit sich. Dies bedingt zusätzlich mit erhöhten Natrium-Konzentrationen eine Reduktion des Kalium-Natrium-Verhältnisses (Lechno et al., 1997; Zhu et al., 2008).

Ausgelöst durch den osmotisch bedingten Wassermangelstress und Störungen durch Ionenakkumulationen entstehen unter Salzstress erhöhte Mengen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) (Chan, 2015; Das & Roychoudhury, 2014), welche den Abbau von DNA, Proteinen, Lipidmembranen und auch den Zelltod hervorrufen können. Diese Schäden sind unter Salzstress

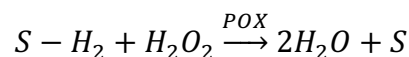
einer der wichtigsten einschränkenden Faktoren des Pflanzenwachstums (Munns & Tester, 2008). Der Großteil der ROS-Bildung unter Salzstress ist auf zwei Prozesse zurückzuführen. Zum einen führen Störungen der Elektronentransportketten in den Chloroplasten zur Bildung von ROS (Abb.1). Zum anderen werden aufgrund der verminderten internen CO₂-Konzentrationen infolge verminderter stomatärer Leitfähigkeiten höhere Photorespirationsraten erreicht, bei der H₂O₂ in den Peroxisomen gebildet wird. (Abogadallah, 2010; Noctor, 2002)

Als Schutz gegen oxidativen Stress, besitzen Pflanzen enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien, die dem Abbau von ROS dienen.

Katalase (CAT) ist überwiegend in den Peroxisomen lokalisiert und katalysiert den Abbau von H₂O₂. Zwar weist CAT eine hohe Umsetzungsrate auf, jedoch ist die Substrataffinität zu H₂O₂ sehr gering.



Peroxidasen (POX) katalysieren die Oxidation verschiedener Substrate (S), wobei H₂O₂ zu H₂O umgewandelt wird.



Mit dem Wasser-Wasser-Zyklus und der damit verknüpften Ascorbat-Glutathion-Redoxkette (Abb. 1), verfügen Pflanzen über einen effektiven Mechanismus, die in Chloroplasten gebildeten ROS unschädlich zu machen (Asada, 1999). Dabei wird schrittweise reaktives H₂O₂ zu H₂O reduziert.

Teil dieser Reaktionskette sind die Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD), Ascorbat-Peroxidase (APX) und Glutathion-Reduktase (GR). Entweichen Elektronen der Transportkette der Thylakoidmembran, reagieren diese in der Mehler-Reaktion mit O₂ zu O₂[•] (Mehler, 1951). SOD fungiert dabei als Radikalfänger und wandelt dieses in H₂O₂ um.

In einem weiteren Schritt wird H₂O₂ durch APX zu H₂O reduziert (Asada, 1992). GR katalysiert den letzten Schritt der Ascorbat-Glutathion-Redoxkette. Bei der Regeneration von oxidiertem Glutathion wird NADPH zu NADP⁺ oxidiert (Foyer & Halliwell, 1976).

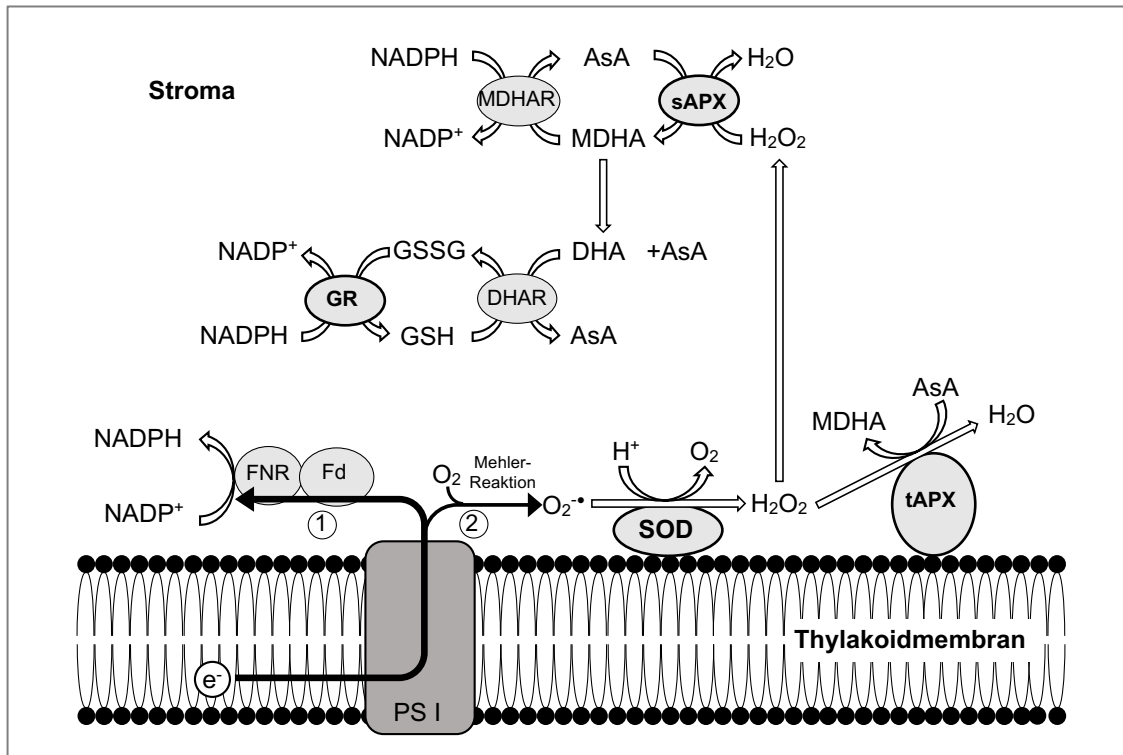


Abb. 1: Reaktionswege infolge von Elektronentransferreaktionen am PS I in Chloroplasten. Der Elektronentransferkette zu FNR führt zur NADPH-Produktion (1). Die alternative Mehler-Reaktion (2) resultiert in der Produktion von $O_2^{\bullet-}$, welches enzymatisch im Wasser-Wasser-Zyklus und der Ascorbat-Glutathion-Redoxkette schrittweise unschädlich gemacht wird (adaptiert nach Asada, 1999). AsA: Ascorbat; DHA: Dehydroascorbat; DHAR: Dehydroascorbat-Reduktase; Fd: Ferredoxin; FNR: Ferredoxin-NADP(H)-Oxidoreduktase; GR: Glutathion-Reduktase; GSH: Glutathion; GSSG: Glutathion-disulfid; MDA: Monodehydroascorbat; MDAR: Monodehydroascorbat-Reduktase; NADP: Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat; PS I: Photosystem I; sAPX: stromär-gebundene Ascorbat-Peroxidase; SOD: Superoxid-Dismutase; tAPX: thylakoid-gebundene Ascorbat-Peroxidase.

Bei *Cucurbita spp.* und *Cucumis sativus*, welche eine ähnliche Wuchsform wie *Ipomoea batatas* aufweisen, konnten bereits enzymatische Salztoleranzmechanismen nachgewiesen werden. In *Cucurbita spp.* wurden erhöhte Aktivitäten von APX, GR, CAT, SOD und POX festgestellt (Sevengor et al., 2011; Zhu et al., 2008), wobei APX und GR dabei als Feinregulatoren beschrieben wurden, die bei geringen ROS-Konzentrationen erhöhte Aktivitäten erreichten. CAT wies im Gegensatz dazu, aufgrund der geringen H_2O_2 -Affinität, erst bei hohen ROS-Konzentrationen größere Aktivitäten auf (Asada, 1992; Mittler, 2002; Willekens, 1997). Bei *Cucumis sativus* L. konnten erhöhte GR- und CAT-Aktivitäten beobachtet werden, SOD-Aktivitäten zeigten jedoch keine Reaktion (Lechno et al., 1997). Die Reaktionen einzelner anti-oxidativer Enzyme auf Salzstress sind art- und sortenspezifisch und es kann keine Prognose über die Reaktionen einzelner Enzyme von *Ipomoea batatas* getroffen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die für den Versuch verwendeten Chemikalien stammten von Sigma-Aldrich Chemie (Deutschland). Alle Laborverbrauchsmittel stammten von Carl Roth (Deutschland) und Sarstedt AG (Deutschland). Die verwendeten Geräte sind Tab. 1 zu entnehmen.

Tab. 1: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Typ	Herstellersitz
AutoAnalyzer	Technicon	AutoAnalyzer II	Deutschland
Autoklav	Wolf	Sanoklav MMCS	Deutschland
Feinwaage	Precisa	XB 220A	Schweiz
Flammenphotometer	Jenway	PFP 7	UK
Homogenisierer	MP Biomedicals	FastPrep 24	Deutschland
Klima-Datenlogger	Gemini Data	TGP-4500	UK
Lampe SOD-	spLED		Deutschland
Luftpumpe	KNF Neuberger	N022AN.18	Deutschland
Millipore Maschine	Merck Milipore	Simplicity	Deutschland
Pflanzen-Beleuchtung	Philips	SON-T Agro 400W	Niederlande
Photometer	Tecan	Infinite M200 Pro	Österreich
Schüttler	IKA	MS2 Minishaker	Deutschland
SPAD-Meter	Konica minolta	502 plus	Japan
Trockenschrank	Memmert	ULM 400	Deutschland
Waage	Sartorius	Entris	Deutschland
Zentrifuge	Heraeus	Biofuge fresco	Deutschland
Zentrifuge	Beckman-Coulter	Centrifuge Allegra X15R	USA

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsaufbau

Pflanzenanzucht

Für den Versuch wurden zwei Sorten gewählt, die in einem vorhergestellten Sortenversuch unterschiedlich starke Reaktionen auf Salzstress aufwiesen. Die Sorte BARI SP4 reagierte auf Salzstress mit reduziertem Wachstum, wohingegen BARI SP8 weniger beeinträchtigt wurde. Beide Sorten entstammen dem Bangladesh Agricultural Research Institute (BARI). Die Versuchspflanzen wurden durch Stecklingsvermehrung gewonnen. Es wurden sowohl Stecklinge aus Sprossabschnitten (Pflanzensatz A) als auch von Triebspitzen (Pflanzensatz B) verwendet. Die Stecklinge wurden mit einer Rasierklinge, welche zuvor mit

NaClO desinfiziert wurde, von den Mutterpflanzen abgetrennt. Anschließend wurden die Stecklinge unter fließendem Wasser abgespült und für 5s in ein Biozid (Neudorff Spruzit Schädlingsfrei) getaucht, um mögliche Schädlingsbefälle einzudämmen. Nach dem Abwaschen in deionisiertem Wasser erfolgte das Einsetzen der Pflanzen in die Hydroponikanlage (11.06.2019).

Hydroponiksystem

Die Versuchstöpfe fassten ca. 1,2 l. Das Einwickeln der Töpfe in Aluminiumfolie diente sowohl der Isolation als auch der Abdunkelung der Nährlösung, um Algenwuchs weitgehend zu verhindern. Zur Fixierung wurden die Pflanzen in einem Schaumstoffpropfen in eine Öffnung im Topfdeckel geklemmt (Abb. 2).

Um eine ausreichende Sauerstoffverfügbarkeit zu gewähren, wurde der Nährlösung über Schläuche 15 min^{-1} Luft zugeführt. Dabei waren jeweils 28 Töpfe in Parallelschaltung an einer Pumpe angeschlossen.

Die beiden Beleuchtungsreihen bestanden aus jeweils sieben Lampen. Jeweils zwei Pflanzenreihen wurden unter einer Belichtungsreihe angeordnet. Zwischen den Pflanzen innerhalb einer Beleuchtungsreihe betrug der Topfabstand ca. 15 cm. Die Leuchten wurden drei Tage nach der Inbetriebnahme der Hydroponikanlage eingeschaltet und hatten eine tägliche Beleuchtungsdauer von 12 h (8.00-20.00 Uhr). Nach dreizehn Tagen wurden die Leuchten aufgrund von sehr hohen Tagestemperaturen im Gewächshaus ($>35^\circ\text{C}$) abgeschaltet, um eine zu hohe Erwärmung der Nährlösungen zu verhindern. Beim Einsatz der Stecklinge in das Hydrokultursystem wurde 50%-Yoshida- EDTA Nährlösung (Yoshida et al., 1976) verwendet (Tab. 2). Nachdem nach vierzehn Tagen alle Versuchspflanzen bereits einige Blätter gebildet hatten, erfolgte die Umstellung auf 100% EDTA-Yoshida-Nährlösung. Die Nährlösungen wurden nach siebzehn Tagen, am Tag der ersten Probenahme, erneuert. Ab diesem Zeitpunkt enthielten die Nährlösungen der Hälfte der Pflanzen 100 mmol NaCl. Während der Versuchsdauer wurde täglich das Wasserlevel kontrolliert und gegebenenfalls mit de-ionisiertem Wasser auf ca. 1 l aufgefüllt. An Tagen mit Maximaltemperaturen $>35^\circ\text{C}$ wurden den Nährlösungen Eis zugegeben.



Abb. 2: Aufbau der Hydroponikanlage.

Tab. 2: Zusammensetzung der Yoshida-EDTA-Nährlösung (pH 6).

Chemisches Element	Chemisches Reagenz	100% Nährlösung [mg l ⁻¹]	50% Nährlösung [mg l ⁻¹]
N	NH ₄ NO ₃	114,29	57,145
P	NaH ₂ PO ₄ * 2H ₂ O	50,37	25,185
K	K ₂ SO ₄	89,14	44,57
Ca	CaCl ₂ * 2H ₂ O	146,73	77,365
Mg	MgSO ₄ * 7H ₂ O	405,64	202,82
Fe	FeNa - EDTA	15,08	7,54
Mn	MnCl ₂ * 4H ₂ O	1,875	0,9375
Zn	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0,044	0,022
Cu	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,0393	0,01965
Mo	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4H ₂ O	0,092	0,046
B	H ₃ BO ₃	1,1675	0,58375

2.2.2 Versuchsdurchführung

Der Versuch fand im Gewächshaus des Instituts für Tropische Agrarwissenschaften (Hans-Ruthenberg-Institut) statt. Nach der siebzehntägigen Anzucht der Versuchspflanzen wurden bei der ersten Probenahme an allen Pflanzen die vier jüngsten vollentwickelten Blätter markiert (Abb. 3). Dabei

wurde das jüngste vollentwickelte Blatt als das zweite Blatt vor der Triebspitze festgelegt. Die Nummerierung der Blätter erfolgte aufsteigend in Richtung Triebspitze. Diese vier Blätter wurden bei der ersten Probenahme beprobt. Von den restlichen Pflanzen wurde die Hälfte mit NaCl versetzt, sodass die Konzentration in den Nährlösungen 100 mmol NaCl betrug. Die andere Hälfte diente der Kontrolle. Die weiteren Probenahmen wurden zeitlich so angesetzt, dass sich zwischen den Probenahmen immer mindestens ein zusätzliches neues Blatt voll entwickelt hatte. Pflanzensatz A wurde zur Messung der Enzymaktivität verwendet, an Pflanzensatz B fanden die Datenerhebungen von SPAD, Frisch- und Trockenmasse sowie Na-, K- und Cl-Konzentrationen statt. Der Versuch wurde mit zwei Sorten und in dreifacher Wiederholung durchgeführt. Insgesamt wurden folglich 84 Pflanzen beprobt. Das Versuchsdesign entsprach einer vollständig randomisierten Blockanlage. Der Einteilung in Blöcke lag dabei der Anschluss der Versuchstöpfe an drei unterschiedliche Luftpumpen zugrunde, wobei die drei Wiederholungen auf die Blöcke verteilt wurden.

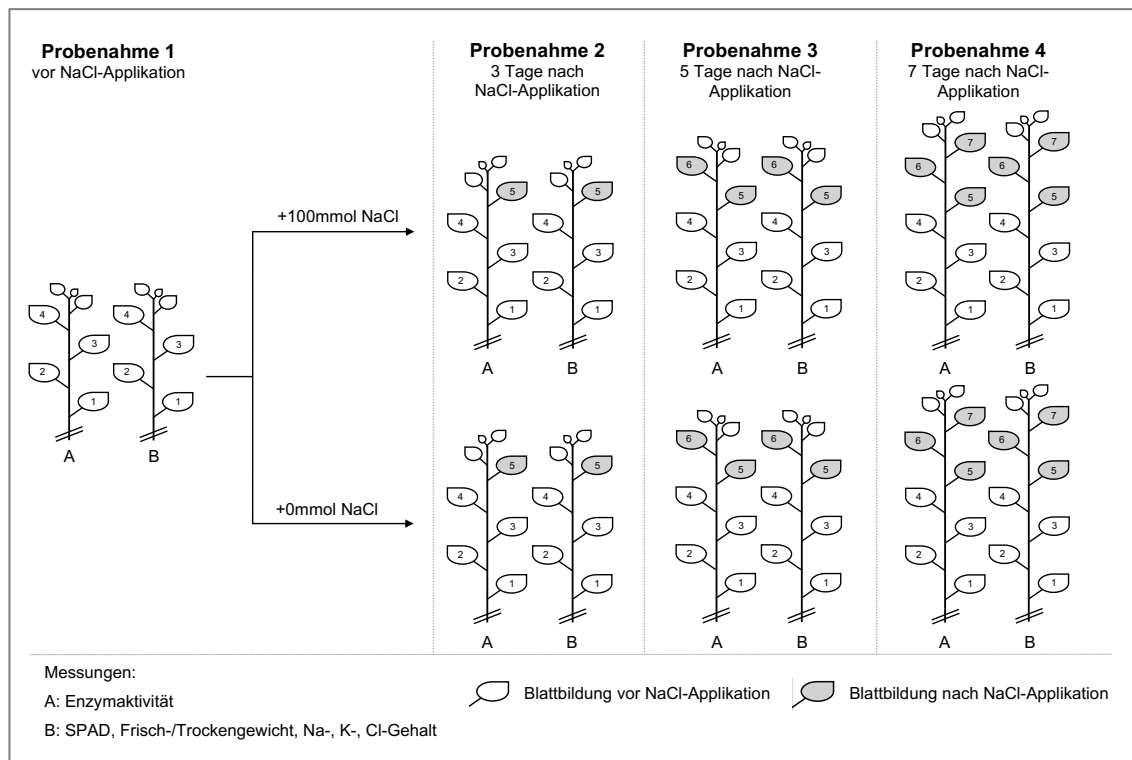


Abb. 3: Übersicht über den Versuchsablauf.

2.2.3 Klimadaten

Während des Versuchszeitraums wurden die Klimadaten im Gewächshaus aufgezeichnet. Die Messungen der Temperatur und der relativen Luftfeuchte erfolgten alle 30min.

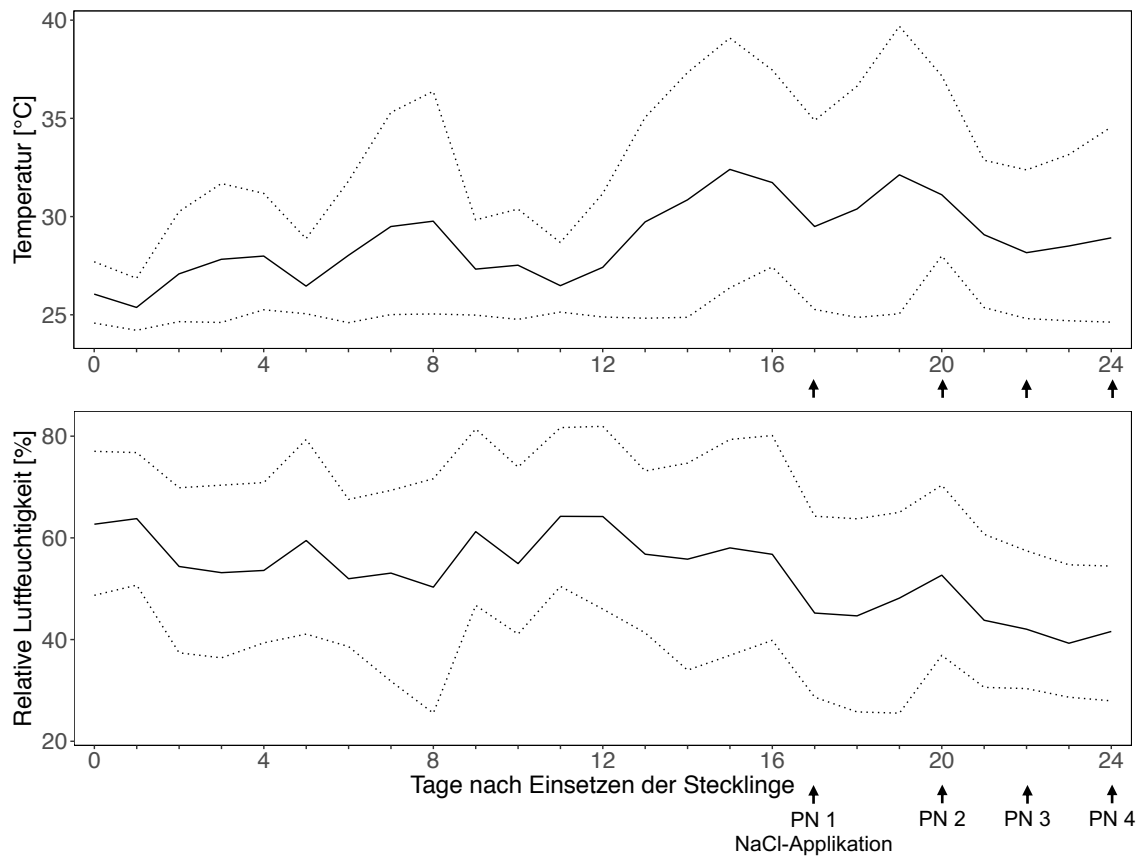


Abb. 4: Verlauf der Temperatur und der relativen Luftfeuchte im Gewächshaus während des Versuchszeitraums. Dargestellt sind die jeweiligen Tagesmittel, Maximal- und Minimalwerte sowie die Zeitpunkte der Probenahmen (PN).

2.3 Datenerhebungen

2.3.1 SPAD

Die Messungen der SPAD-Werte wurden unmittelbar vor der Ernte durchgeführt. Es wurden jeweils drei Messwiederholungen durchgeführt, der erhobene Mittelwert wurde für die weitere Datenauswertung verwendet. SPAD-Werte weisen eine Proportionalität zu Chlorophyllgehalten auf und werden daher als Schätzwerte von Chlorophyllgehalten verwendet.

2.3.2 Frisch- und Trockengewicht

Die Frischgewichte der jeweils relevanten Blätter wurden als Bezugswert für die Enzymaktivitäten erhoben. Zusätzlich wurden die Frischgewichte der restlichen Blätter sowie des restlichen Pflanzenmaterials (Wurzel und Stängel) bestimmt. Die Proben wurden für mindestens 48 h bei 60 °C getrocknet, um anschließend die Trockengewichte zu ermitteln. Diese lieferten einen Bezugswert für die Ionenkonzentrationen.

2.3.3 Ionenkonzentrationen

Den getrockneten Proben wurden jeweils eine Ø 5 mm und vier Ø 3 mm Edelstahlmahlkugel (für Retsch Mühlen, VWR, Deutschland) zugegeben. Nach dem 10-minütigen Mahlgang wurden je nach verfügbarer Probenmenge ca. 0,005-0,09 g des Probenmaterials eingewogen und 10 mL de-ionisiertes H₂O hinzugefügt. Zur Mischung wurden die Gefäße bis zur vollständigen Homogenisierung geschüttelt. Für den Hitzeaufschluss wurden die Proben für 60 min bei 120 °C autoklaviert und im Anschluss für 5 min bei 4000 Umin⁻¹ zentrifugiert. Dem Überstand wurden 9 mL entnommen und anschließend 9:25 mit de-ionisiertem Wasser verdünnt.

Die Natrium- und Kalium-Konzentrationen der Probelösungen wurden mittels Flammenphotometer bestimmt. Die Messung der Chlorid-Konzentrationen erfolgte mit einem AutoAnalyzer. Bei Messwerten außerhalb der Standardreihen wurden die Lösungen verdünnt.

2.3.4 Enzymaktivitäten und Proteinkonzentration

Für die Extraktion wurden ca. 0,02 g Frischmaterial aus leitbündelfreien Bereichen der Blattmitte eingewogen. Den Proben wurde als Extraktionspuffer 1mL 50mM Phosphatpuffer (pH 7) mit 1% PVP40 und 0,2 mM EDTA zugegeben. Der Extraktionspuffer für die APX-Messung beinhaltete zusätzlich 5mM Ascorbat. Bis zum Probenaufschluss wurden die Probengefäße auf Eis gekühlt. Für den Aufschluss, der für 60 s bei 6 ms⁻¹ auf dem Homogenisierer erfolgte, wurden sechs Ø 2,8 mm und ca. 0,2 g Ø 1,4 mm Keramik Kügelchen (Preqlab, VWR, Deutschland) mit zugegeben. Die Proben wurden anschließend 5min bei 13000 Umin⁻¹ und 4 °C zentrifugiert. Die für die jeweilige Messung notwendige

Menge an Probenlösung wurde dem Überstand entnommen. Bei allen Arbeitsschritten wurde Millipore-Reinstwasser verwendet.

Die Messungen der Enzymaktivitäten und des Proteingehalts wurden photometrisch mittels der in Tab. 3 dargestellten Methoden durchgeführt.

Tab. 3: Messmethoden der Enzymaktivitäten und des Proteingehalts.

Parameter	Methode	Wellenlänge	Messdauer
APX	Nakano & Asada (1981)	290 nm	180s
CAT	Chance und Maehly (1955)	240 nm	180s
SOD	Beauchamp und Fridovich (1971) modifiziert von Giannopolitis und Ries (1977)	560 nm	
POX	Chance und Maehly (1955)	470 nm	180s
GR	Foyer und Halliwell (1976)	340 nm	180s
Protein	Bradford (1976)	595 nm	

Für die APX-Aktivitäts-Messung wurden 10 µL Probelösung zu 190 µL Reaktionsmischung zugegeben. Diese enthielt 50 mM Phosphatpuffer (pH 7), 0,2 mM Ascorbat und 0,2 mM H₂O₂.

Für die CAT-Aktivitäts-Messung wurden 20 µL Probelösung zu 190 µL Reaktionsmischung zugegeben. Diese enthielt 100 mM Phosphatpuffer (pH 7) und 5 mM H₂O₂.

Für die POX-Aktivitäts-Messung wurden 20 µL Probelösung zu 180 µL Reaktionsmischung zugegeben. Diese enthielt 50 mM Phosphatpuffer (pH 7), 10 mM Guaiacol und 12,5 mM H₂O₂.

Für die GR-Aktivitäts-Messung wurden 20 µL Probelösung zu 170 µL Reaktionsmischung zugegeben. Diese enthielt 30 mM Phosphatpuffer (pH 7), 0,2% BSA, 5 mM EDTA, 2,4 mM Glutathiondisulfid und 0,19 mM NADPH.

Für die SOD-Aktivitäts-Messung wurden 20 µL Probelösung zu 180 µL Reaktionsmischung in einer Mikrotiterplatte gemischt. Die Reaktionsmischung enthielt 13 mM Methionin, 0,5 mM Na₂CO₃, 21 µL Nitroblautetrazoliumchlorid und 1,3 µL Riboflavin. Die erste Messung der Enzymaktivität erfolgte nachdem die Mikrotiterplatte für 1 min im Abstand von 15 cm einer starken Lichtquelle ausgesetzt war. Nach weiteren 5 min unter der Lichtquelle erfolgte die nächste Messung. Zur Berechnung der SOD-Aktivität wurde eine Standardreihe angesetzt.

Für die Messung der Proteinkonzentration wurden 10 µL Probelösung zu 200 µL Bradfordreagent zugegeben. Dieses enthielt 0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% C₂H₅OH und 8,5% H₃PO₄. Für die Standardreihe wurden BSA-Lösungen verwendet.

Die linearen Abschnitte der Steigungen der Messergebnisse von APX, CAT, GR und POX wurden mithilfe von R (Version 3.4.4 GUI 1.70 El Capitan build; R-package kmeans) extrahiert und für die Berechnungen der Enzymaktivitäten verwendet.

2.4 Statistische Auswertungen

Alle Varianzanalysen (ANOVA) wurden zum Signifikanzniveau $\alpha=5\%$ und unter Berücksichtigung der Blockung im Versuchsdesign durch Hinzufügen der Blöcke als Einflussfaktoren mithilfe von R (Version 3.4.4 GUI 1.70 El Capitan build) durchgeführt. Alle Grafiken wurden mit dem Programm RStudio (R-package ggplot2; Version 2.2.1) erstellt.

3 Resultate

Alle Messungen wurden auf eine Stichprobenmenge von $n=3$ angesetzt. Jedoch konnte dies nicht für alle Messungen gewährleistet werden, da sich einige Messungen als ungültig erwiesen.

Um die Auswirkungen von Salzstress auf die verschiedenen Parameter genauer zu beschreiben wird in der Auswertung Bezug auf die Einflussfaktoren Blattalter und Zeitpunkt der Blattentwicklung genommen. Der Faktor Blattalter bezieht sich dabei auf Unterschiede zwischen den Blättern 1-4. Diese waren schon vor der NaCl-Applikation entwickelt und unterlagen somit in Bezug auf die Salzexposition den gleichen Bedingungen. Der Unterschied zwischen den Blättern besteht im Blattalter.

Die Blätter 1-4 und 5-7 werden getrennt voneinander ausgewertet, da infolge der Entwicklung der Blätter der Blätter 1-4 vor Salzapplikation und der Entwicklung der Blätter 5-7 unter Salzstress mit unterschiedlichen Reaktionen gerechnet werden muss. Zudem können so eventuelle Interaktionen mit dem Faktor Blattalter ausgeschlossen werden.

3.1 Ionenkonzentrationen/-verhältnis

Bei BARI SP4 erwiesen sich die Ionen-Messungen an einer Versuchspflanze aufgrund extrem hoher Werte als unbrauchbar. Zudem hatte eine weitere Versuchspflanze der Sorte BARI SP4 bei der letzten Probenahme (sieben Tage nach NaCl-Applikation) nur fünf Blätter ausgebildet. Es war daher an dieser Stelle aufgrund der geringen Probenanzahl ($n \leq 2$) keine umfassende statistische Auswertung möglich.

Natrium-Konzentration

Bei BARI SP4 bedingte die Salzbehandlung im Vergleich zur Kontrolle einen Anstieg der Na-Konzentrationen in allen Blättern (Abb. 5). Dies war bereits nach drei Tagen Salzexposition zu beobachten. Mit zunehmender Länge des Salzstresses stiegen die Na-Konzentrationen nach fünf Tagen zunächst weiter an. Im Vergleich dazu war nach zwei weiteren Tagen (Tag 7) eine Reduktion zu erkennen. Dabei fielen die Veränderungen in Blättern, die schon vor Salzapplikation entwickelt waren (Blätter 1-4), deutlich höher aus als in Blättern, deren Bildung unter Salzstress erfolgte (Blätter 5-7) aus. Dies betraf sowohl den initialen Anstieg als auch die darauffolgende Reduktion. Das Blattalter nahm keinen Einfluss auf die Na-Konzentration. In unter Salzstress gebildeten Blättern waren die salzstressbedingten Erhöhungen im Vergleich zur Kontrollbehandlung höher, je später das Blatt gebildet wurde.

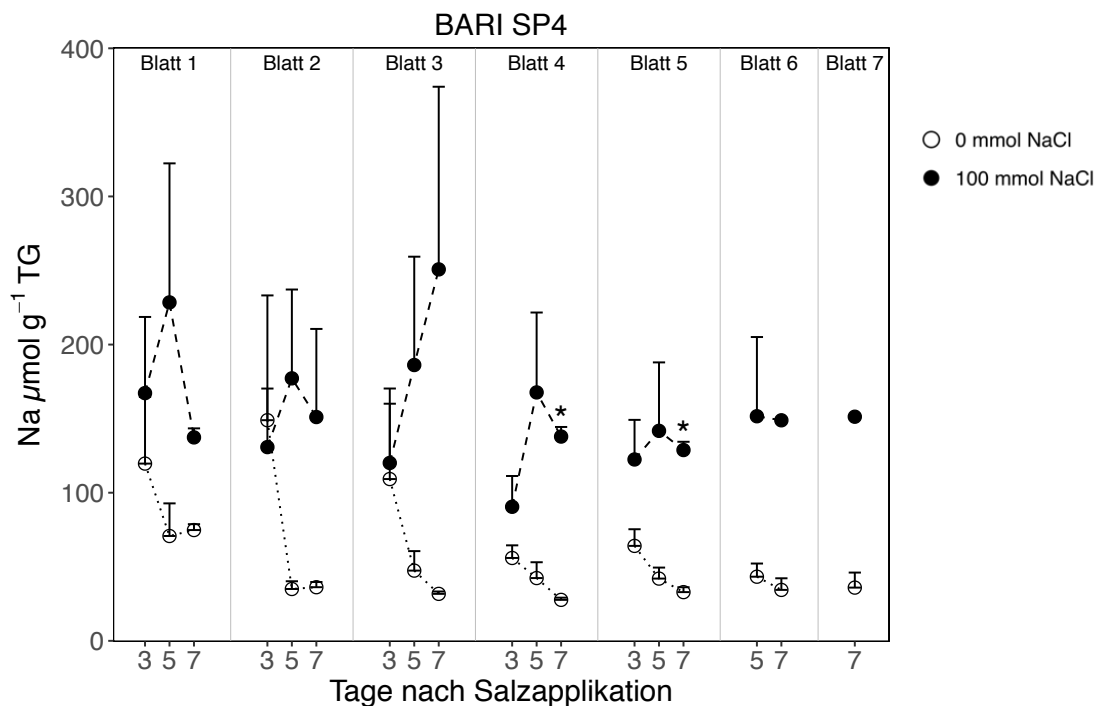


Abb. 5: Auswirkungen von Salzstress auf die Natrium-Konzentration in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP4 zu verschiedenen Probezeitpunkten. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten + SE. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen ($p \leq 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Auch bei BARI SP8 bedingte Salzstress einen Anstieg der Na-Konzentration gegenüber der Kontrollbehandlung in allen Blättern (Abb. 6). Mit zunehmend langer Salzexposition stiegen die Na-Konzentrationen zunehmend an. Dabei war im Zeitraum einer fünf- bis sieben-tägigen Salzexposition der stärkste Anstieg zu beobachten. Mit abnehmendem Blattalter wurde im Vergleich der Blätter 1-4 zu allen Probezeitpunkten die Tendenz zu geringeren salzstressbedingten Anstiegen der Na-Konzentrationen beobachtet. Dies konnte statistisch jedoch nicht bestätigt werden (PN1: $p=0,879$; PN2: $p=0,091$; PN3: $p=0,679$). Bei der Betrachtung der Blätter 5-7 wies das jüngste Blatt (Blatt 7) eine höhere Na-Konzentration auf als die früher gebildeten Blätter.

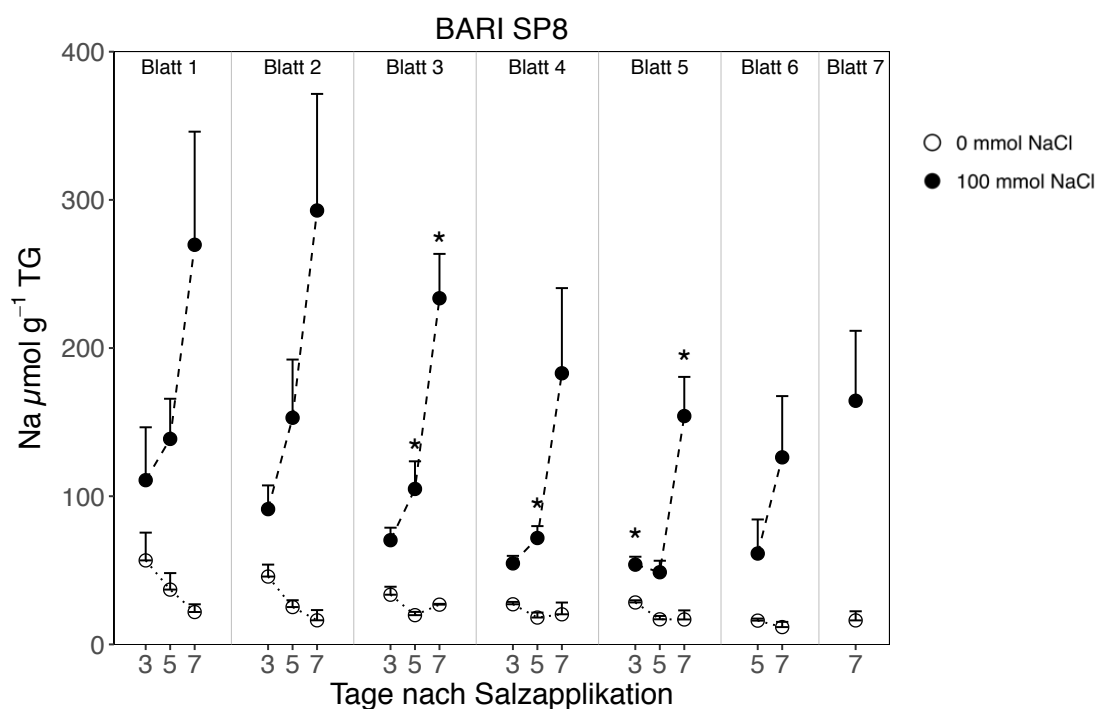


Abb. 6: Auswirkungen von Salzstress auf die Natrium-Konzentration in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP8 zu verschiedenen Probezeitpunkten. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten + SE. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen ($p \leq 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Chlorid-Konzentration

Salzstress löste bei BARI SP4 in allen Blättern eine Zunahme der Cl-Konzentration aus (Abb. 7). Dabei zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen der Dauer der Salzexposition und der Cl-Konzentrationen. Die Blätter 1-4 wiesen ähnliche Akkumulationsmuster auf. Im Vergleich der Blätter 5-7 bedingte eine spätere Blattentwicklung eine geringere Cl-Konzentration. Dabei waren die Konzentrationen in den Blättern 5-7 zu jedem Probenzeitpunkt geringer als die der Blätter 1-4 bei der jeweiligen Probenahme.

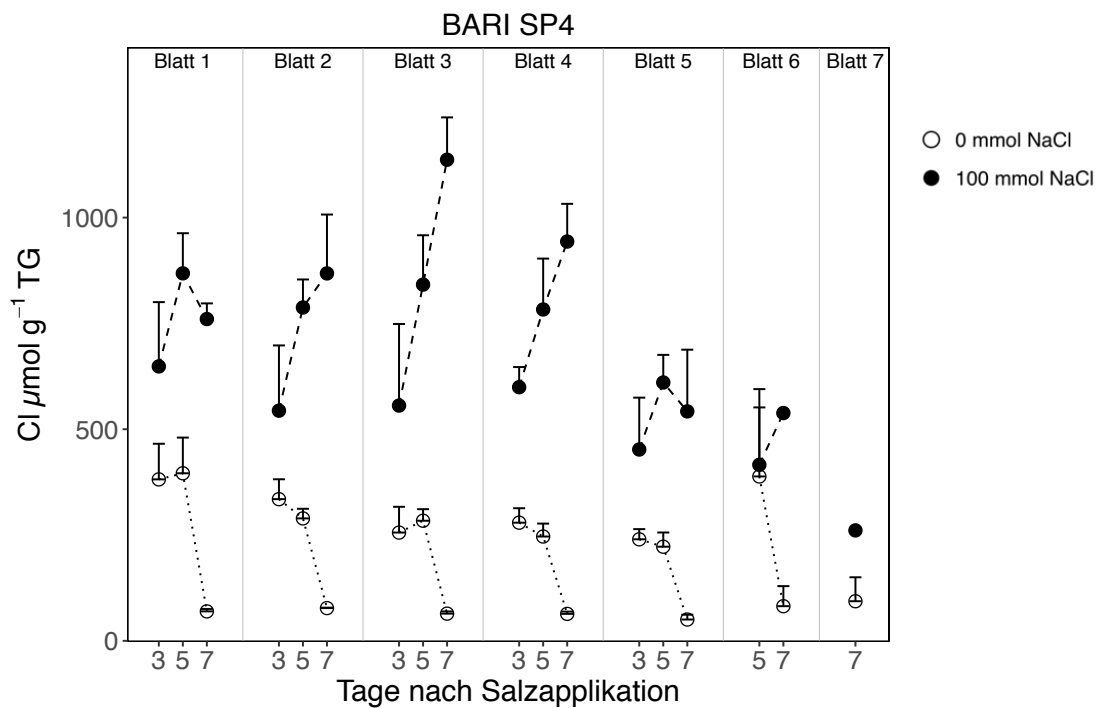


Abb. 7: Auswirkungen von Salzstress auf die Chlorid-Konzentration in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP4 zu verschiedenen Probenzeitpunkten. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten + SE. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen ($p \leq 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Bei BARI SP8 stieg die Chlorid-Konzentration drei Tage nach NaCl-Applikation zunächst über die Kontrolle an (Abb. 8). Nach zwei weiteren Tagen (Tag 5) reduzierten sich die Konzentrationen in allen Blättern unter Salzstress. Dabei näherten sich die Cl-Konzentrationen der Blätter 2 und 4 stark an die Kontrollbehandlung an und die Cl-Konzentrationen der Blätter 5 und 6 fielen unter die Vergleichswerte der Kontrolle. Nach 7 Tagen stiegen die Werte aller Blätter wieder an. Im Vergleich der Blätter 5-7 bedingte eine spätere Blattentwicklung zu diesem Zeitpunkt (Tag 7) eine geringere Cl-Konzentration.

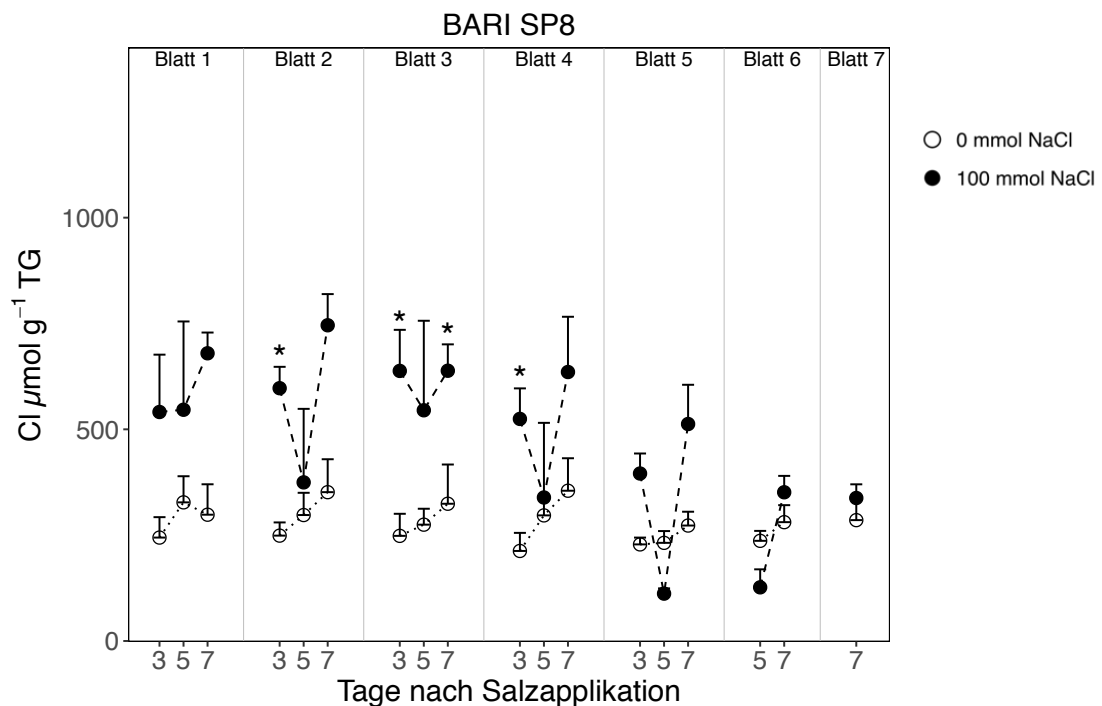


Abb. 8: Auswirkungen von Salzstress auf die Chlorid-Konzentration in Blättern verschiedener Alters der Sorte BARI SP8 zu verschiedenen Probezeitpunkten. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten + SE. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen ($p \leq 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Kalium-Konzentration

Bei BARI SP4 hatte der Zeitpunkt der Blattentwicklung einen deutlichen Einfluss auf die Veränderungen der K-Konzentration unter Salzstress (Abb. 9). Die K-Konzentrationen der Blätter 1-4 stiegen durch Salzstress nach drei Tagen an (ausgenommen Blatt 3). Bei den weiteren Probenahmen waren keine Behandlungsunterschiede zu erkennen. Demgegenüber zeigte sich in Blatt 5 eine Verminderung der K-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle nach sieben Tagen. In Blättern 6 und 7 verminderte sich die K-Konzentration zu allen Probezeitpunkten durch Salzstress. Im Vergleich der Blätter 5-7 bedingt eine spätere Blattentwicklung eine größere Abnahme K-Konzentration durch Salzstress.

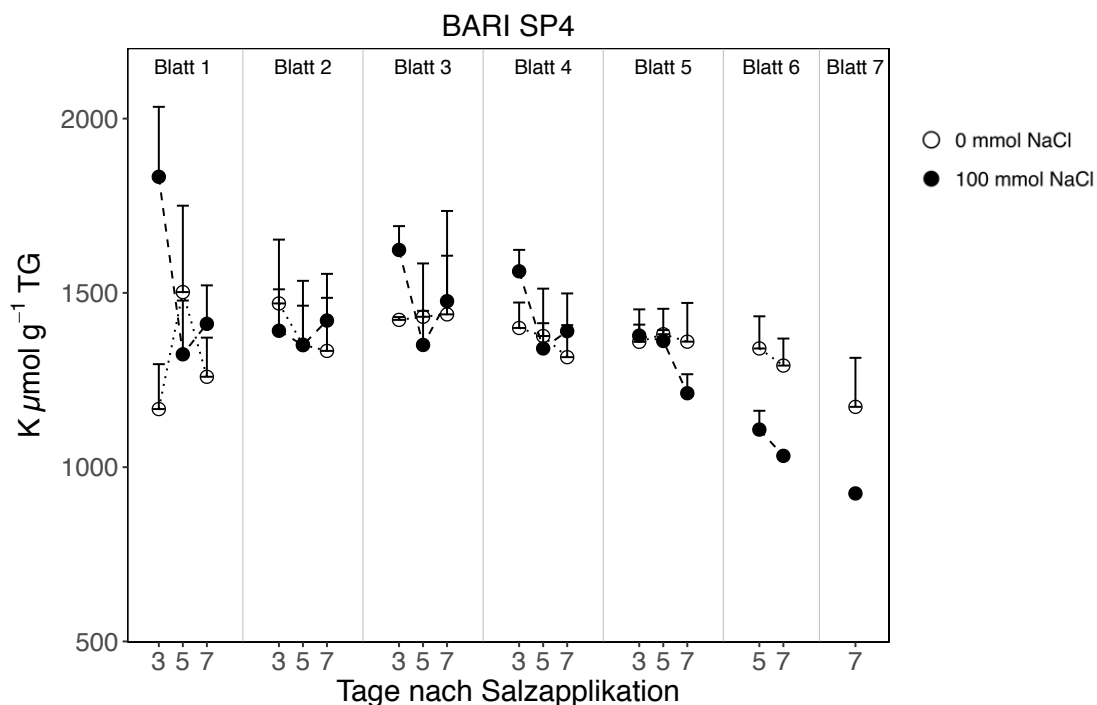


Abb. 9: Auswirkungen von Salzstress auf die Kalium-Konzentration in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP4 zu verschiedenen Probezeitpunkten. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten + SE. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen ($p \leq 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Auch bei BARI SP8 war die Auswirkung von Salzstress auf die Kalium-Konzentration abhängig vom Zeitpunkt der Blattentwicklung (Abb. 10). In den Blättern 1-4 beeinflusste Salzstress die Kalium-Konzentrationen nicht. Auch in Blatt fünf wurden keine Veränderungen beobachtet, in Blättern 6 und 7 bedingte Salzstress jedoch eine Reduktion der K-Konzentration. Dabei bedingte ein späterer Zeitpunkt der Blattentwicklung eine stärkere Verminderung.

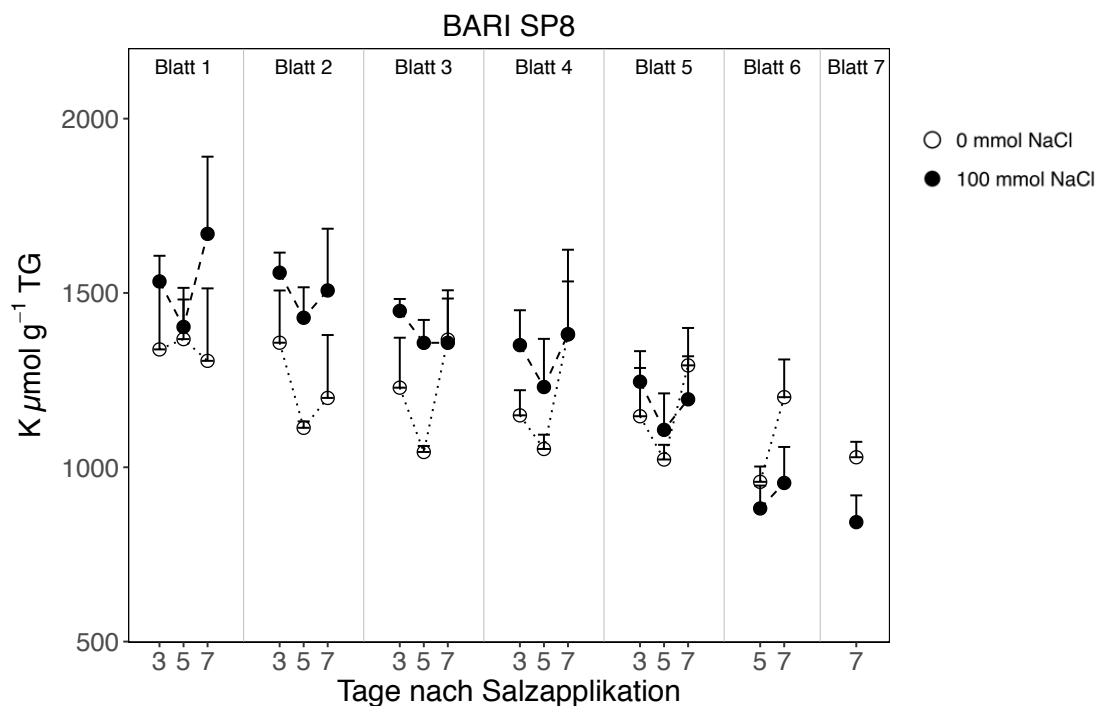


Abb. 10: Auswirkungen von Salzstress auf die Kalium-Konzentration in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP8 zu verschiedenen Probezeitpunkten. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten + SE. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen ($p \leq 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Kalium-Natrium-Verhältnis

Bei BARI SP4 bedingte Salzstress eine Reduktion des K-Na-Verhältnisses in allen Blättern (Abb. 11). In vor Salzapplikation gebildeten Blättern (Blätter 1-4) blieben die Werte im Zeitraum einer Salzexposition von fünf bis sieben Tagen weitgehend konstant. In unter Salzstress gebildeten Blättern (Blätter 5-7) fielen die salzstressbedingten Verminderungen höher aus, je später die Blattbildung stattfand.

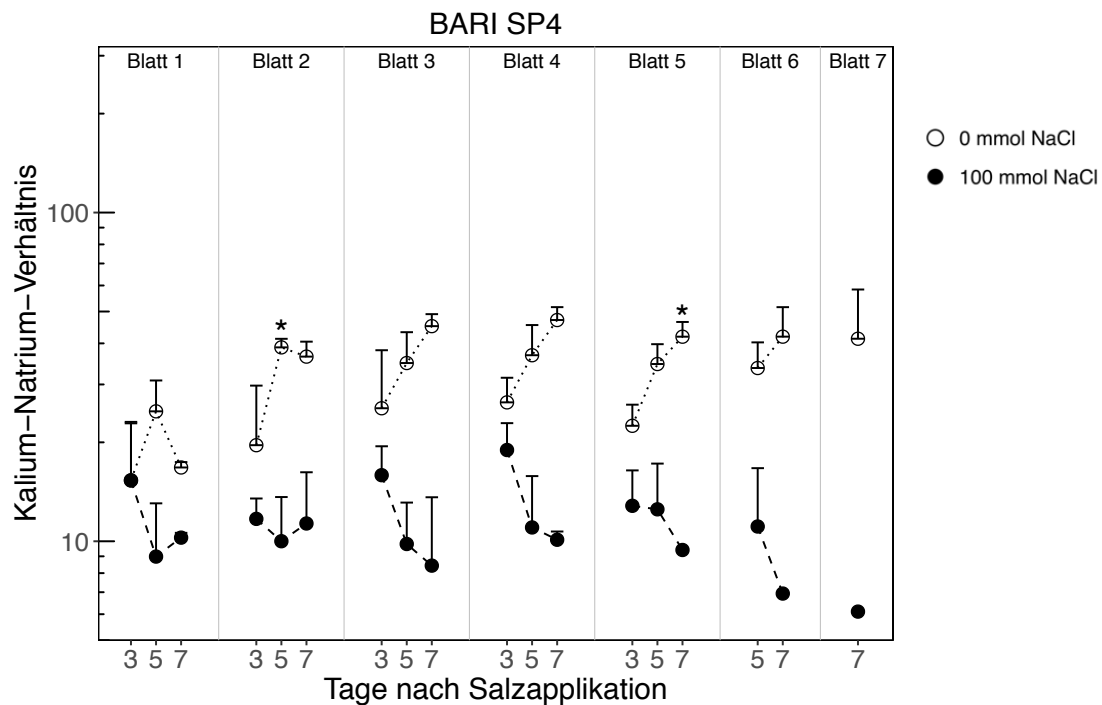


Abb. 11: Logarithmierte Darstellung der Auswirkungen von Salzstress auf das Kalium-Natrium-Verhältnis in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP4 zu verschiedenen Probezeitpunkten. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten + SE. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen ($p \leq 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Die K-Na-Verhältnisse reduzierten sich bei BARI SP8 in allen Blättern durch Salzstress (Abb. 12). Mit zunehmend langer Salzexposition verminderten sich die Verhältnisse. Im Vergleich der Blätter 1-4 waren keine Unterschiede zu beobachten. Bei der Betrachtung der Blätter 5-7 bedingte ein späterer Zeitpunkt der Blattentwicklung eine stärkere Reduktion des K-Na-Verhältnisses.

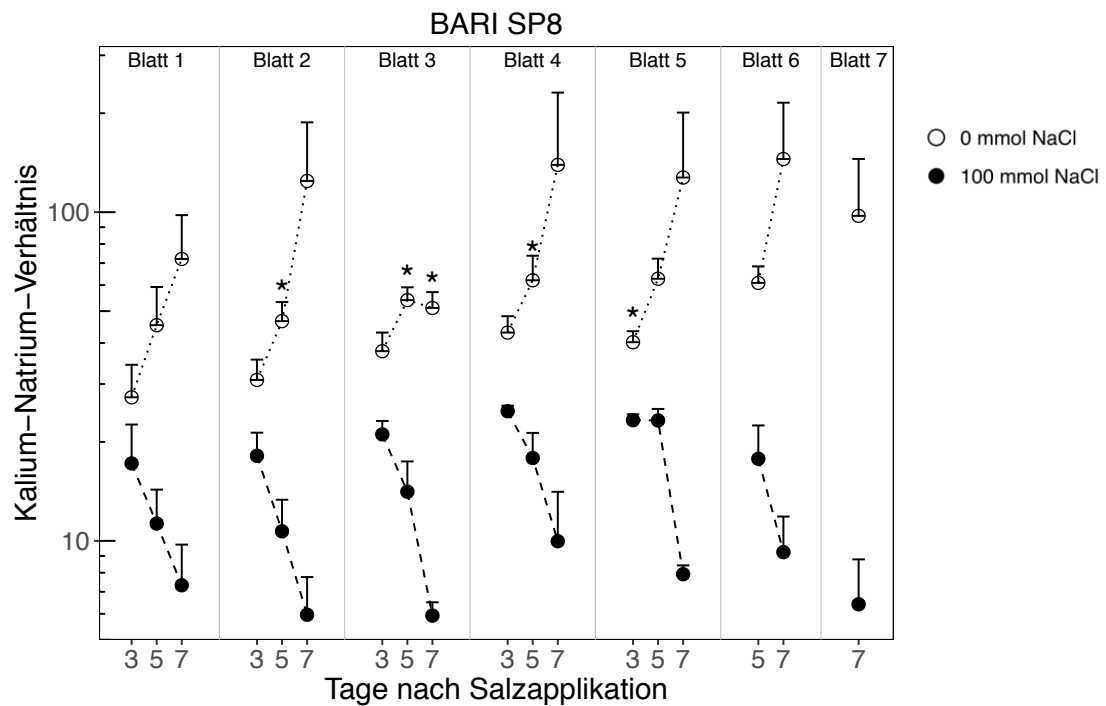


Abb. 12: Logarithmierte Darstellung der Auswirkungen von Salzstress auf das Kalium-Natrium-Verhältnis in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP8 zu verschiedenen Probezeitpunkten. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten + SE. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen ($p \leq 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

3.2 Aktivität anti-oxidativer Enzyme

Bei den Messungen der Enzymaktivitäten zeigte BARI SP8 im Gegensatz zu BARI SP4 eine deutlichere Reaktion auf Salzstress. Bei BARI SP8 konnten Behandlungsunterschiede bei den Aktivitäten von GR und CAT festgestellt werden (Abb. 14, 16). Bei BARI SP4 wurde lediglich die CAT-Aktivität (Abb. 15) von Salzstress beeinflusst. APX-, POX-, und SOD-Aktivitäten zeigten bei beiden Sorten keine Behandlungsunterschiede (Abb. 17).

Bei BARI SP4 wurden keine Behandlungsunterschiede der GR-Aktivität festgestellt (Abb. 13).

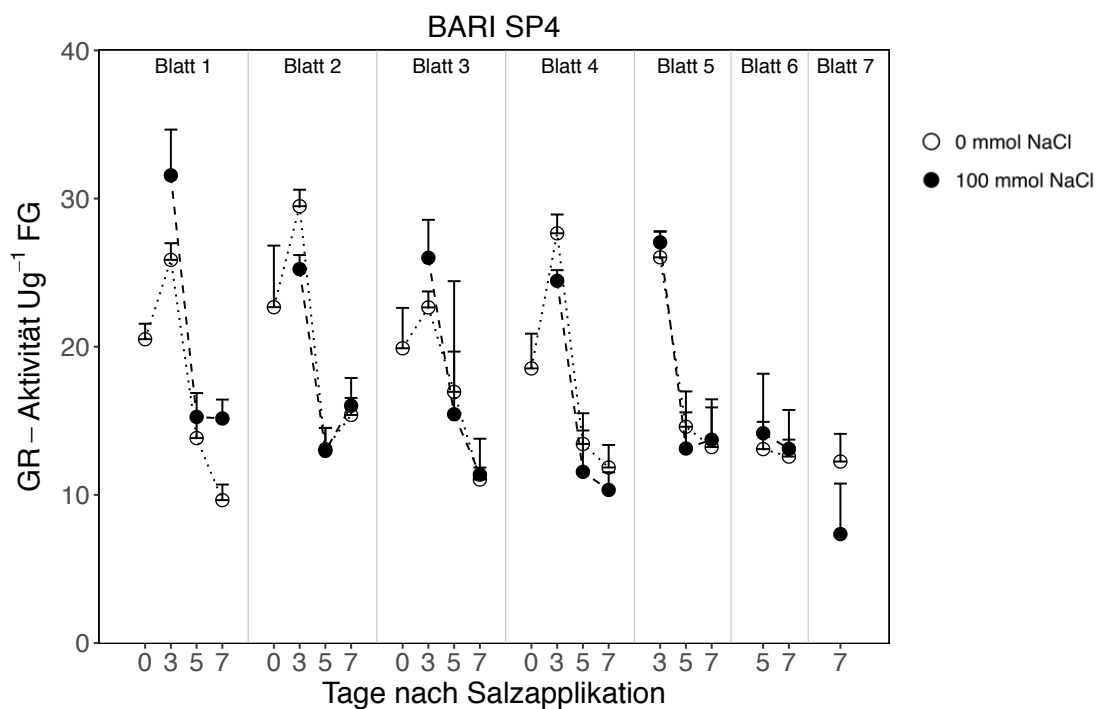


Abb. 13: Auswirkungen von Salzstress auf die GR-Aktivität in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP4 zu verschiedenen Probezeitpunkten. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten + SE. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen ($p \leq 0,05$) sind mit * gekennzeichnet

Bei BARI SP8 bedingte Salzstress einen deutlichen Anstieg der GR-Aktivität (Abb. 14). In allen Blättern lagen die Werte der Salzbehandlung zu jedem Messzeitpunkt höher als die der Kontrolle. Dabei nahmen die Länge der Salzexposition und auch das Blattalter keinen Einfluss auf die GR-Aktivität. Blätter 6 und 7 wiesen unter Salzstress geringere Anstiege der GR-Aktivität als die restlichen Blätter auf.

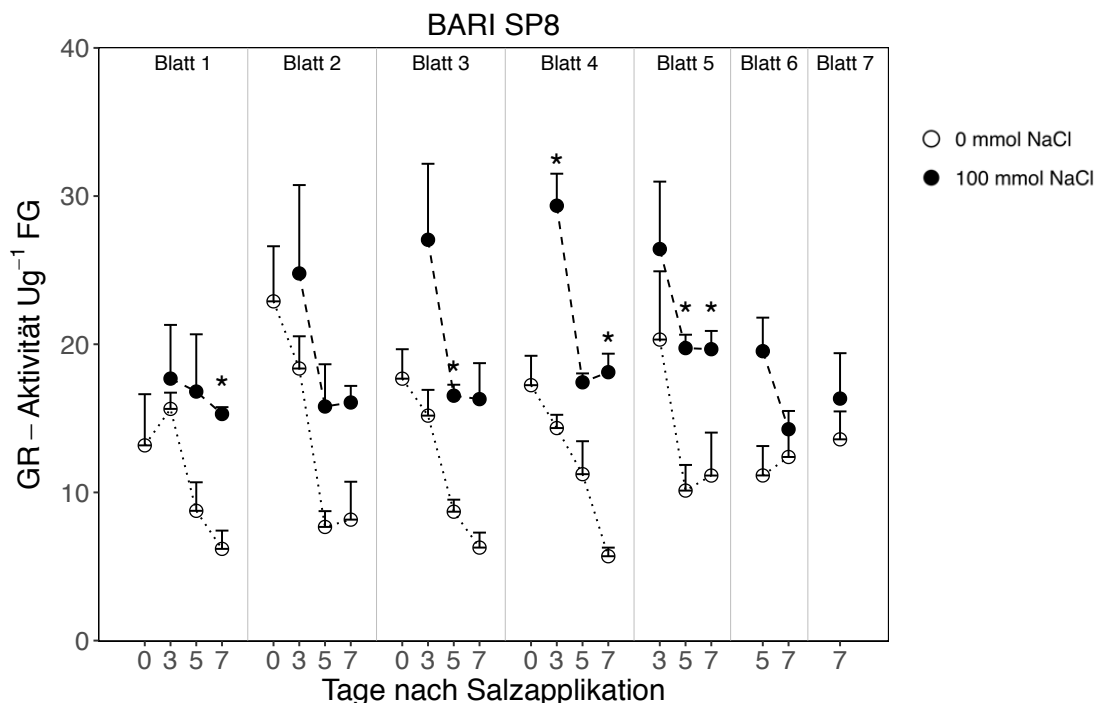


Abb. 14: Auswirkungen von Salzstress auf die GR-Aktivität in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP8 zu verschiedenen Probezeitpunkten. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten + SE. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen ($p \leq 0,05$) sind mit * gekennzeichnet

Ab einer Salzexposition von fünf Tagen zeigten die Blätter 1-5 von BARI SP4 einen Anstieg der CAT-Aktivität gegenüber der Kontrolle (Abb. 15). Im Vergleich dieser Blätter untereinander wurden dabei keine Unterschiede festgestellt. In den Blättern 6 und 7 wurden keine eindeutigen Behandlungsunterschiede beobachtet. In den Blättern 1 und 2 steigt die CAT-Aktivität mit zunehmender Länge der Salzexposition an.

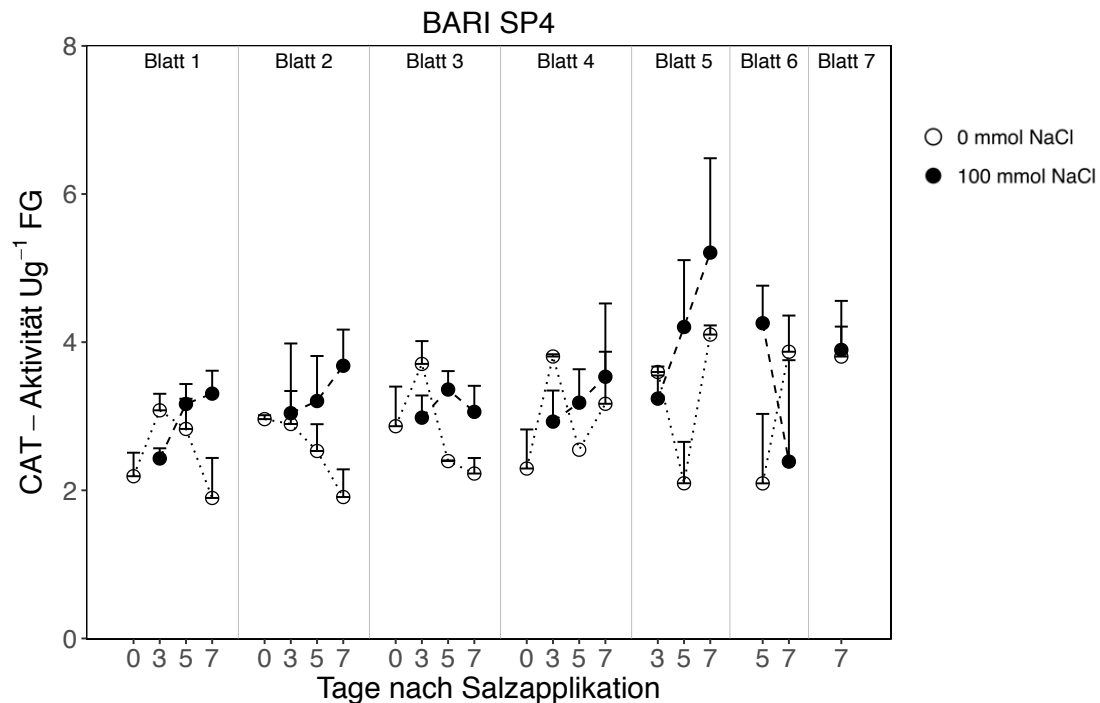


Abb. 15: Auswirkungen von Salzstress auf die CAT-Aktivität in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP4 zu verschiedenen Probezeitpunkten. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten + SE. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen ($p \leq 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Bei BARI SP8 wies die CAT-Aktivität ebenfalls höhere Werte unter Salzstress auf (Abb. 16). Ab einer Salzexposition von fünf Tagen konnte in allen Blättern ein Anstieg der CAT-Aktivität gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Die Anstiege in Blättern 6 und 7 fielen dabei deutlich geringer aus als in den restlichen Blättern. Bei Betrachtung der Blätter 1-4 war eine Tendenz zu erkennen, dass das Blattalter nach sieben tägigem Salzstress einen negativen Einfluss auf die CAT-Aktivität ausübt. Statistisch konnte dies jedoch nicht belegt werden ($p=0,382$). Die CAT-Aktivität stieg mit zunehmender Länge der Salzexposition an.

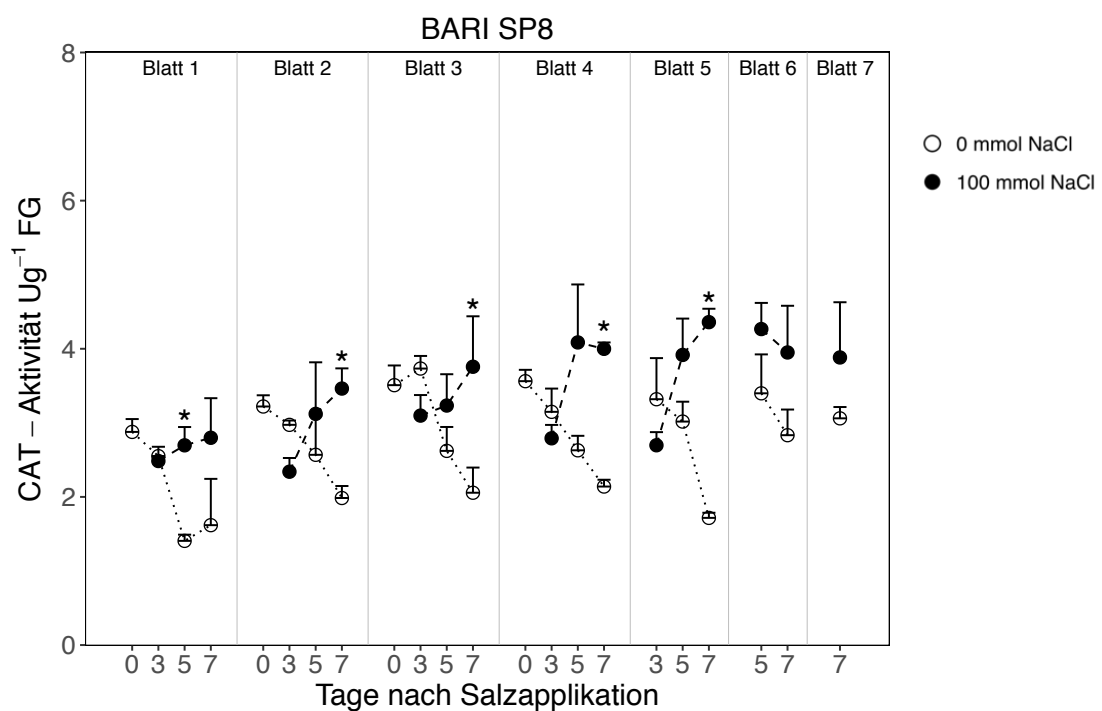


Abb. 16: Auswirkungen von Salzstress auf die CAT-Aktivität in Blättern verschiedenen Alters der Sorte BARI SP8 zu verschiedenen Probezeitpunkten. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten + SE. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen ($p \leq 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

APX-, POX- und SOD-Aktivitäten zeigten bei beiden Sorten keine eindeutigen Behandlungsunterschiede (Abb. 17).

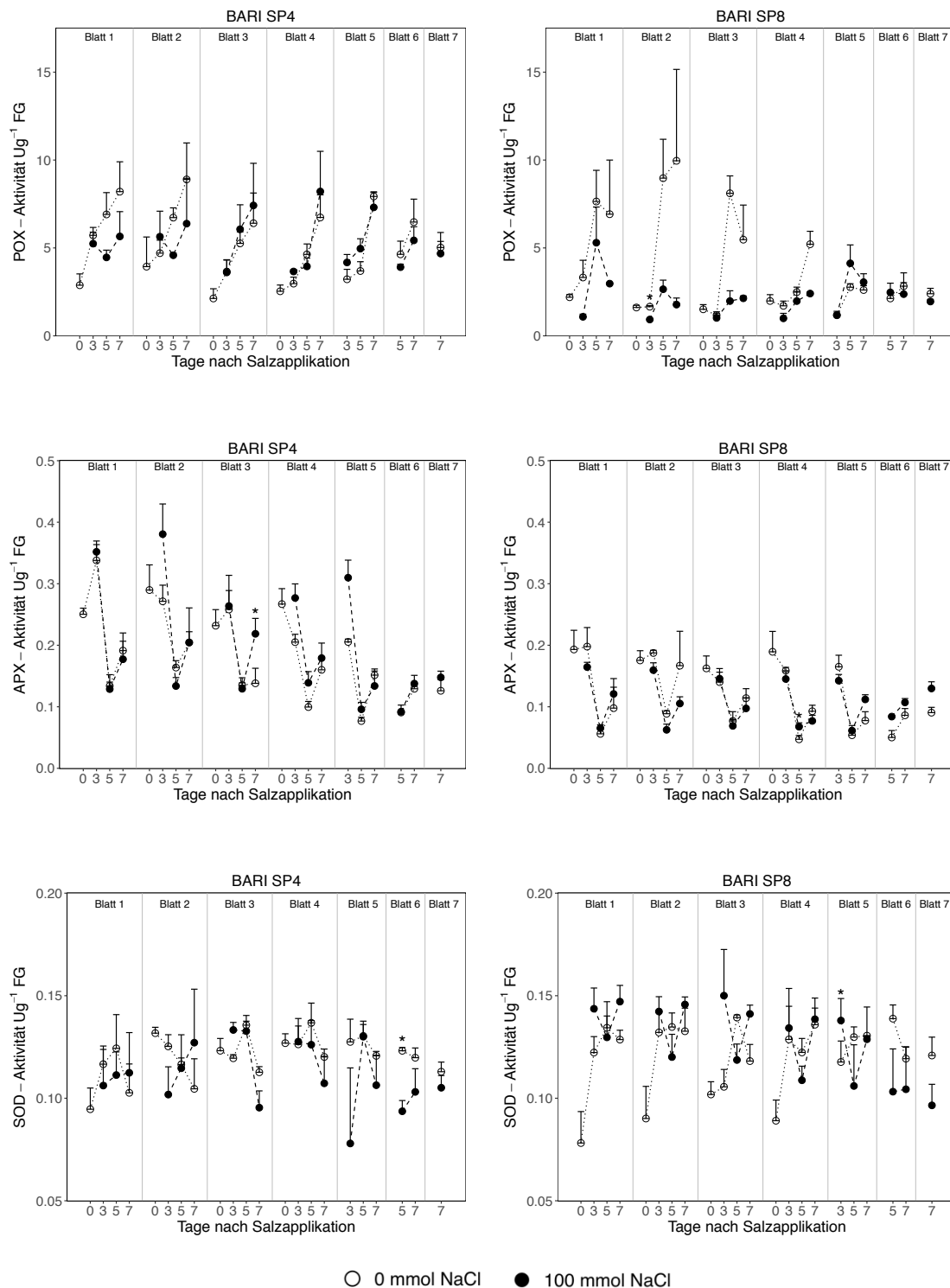


Abb. 17: Auswirkungen von Salzstress auf die POX-, APX- und SOD-Aktivität in Blättern verschiedenen Alters der Sorten BARI SP4 und BARI SP8 zu verschiedenen Probezeitpunkten. Dargestellt sind die Mittelwerte + SE. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den Behandlungen sind mit * gekennzeichnet.

3.3 SPAD

Bei BARI SP4 bedingte Salzstress einen Anstieg der SPAD-Werte in den Blättern, welche bereits vor Salzapplikation entwickelt waren (Abb. 18). Auch im ersten Blatt, welches unter Salzstress gebildet wurde (Blatt 5), zeigte sich dies. In Blatt 6 bedingte Salzstress den größten Anstieg des SPAD-Wertes bei der ersten Messung nach Blattbildung (fünf Tage nach Salzapplikation). Die Ergebnisse der Blätter 6 und 7 bei der Messung sieben Tage nach Salzapplikation erlaubten aufgrund sehr hoher Standardfehler keine Auswertung.

Bei BARI SP8 zeigte sich unter Salzstress ein Anstieg der SPAD-Werte in allen Blättern (Abb. 18). Dabei waren die Anstiege in Blättern, deren Bildung unter Salzstress stattfand deutlich höher als in den Blättern, welche schon vor Salzstress entwickelt waren. Mit zunehmender Länge der Salzexposition stiegen die SPAD-Werte in allen Blättern (ausgenommen Blatt 1) an.

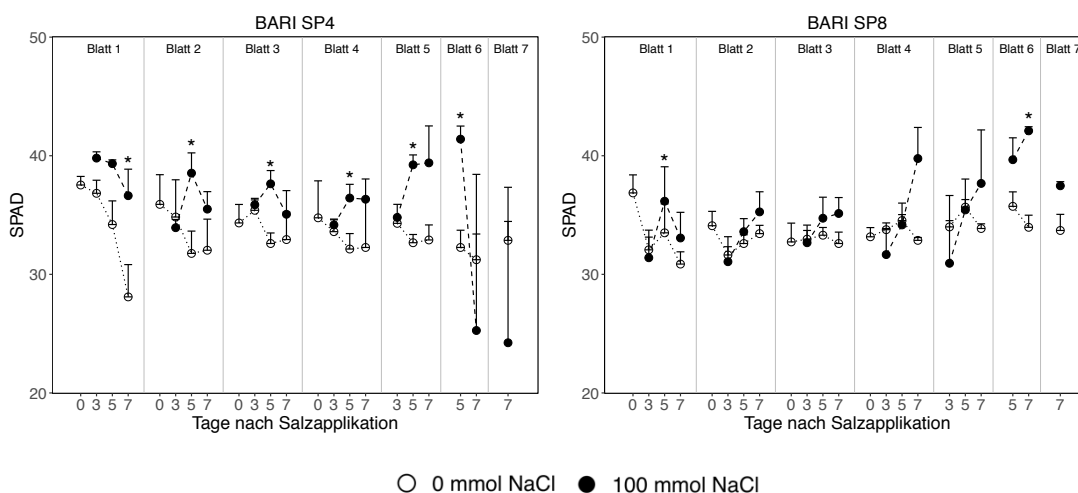


Abb. 18: Auswirkungen von Salzstress auf die SPAD-Werte in Blättern verschiedenen Alters der Sorten BARI SP4 und BARI SP8 zu verschiedenen Probezeitpunkten. Dargestellt sind die Mittelwerte + SE. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den Behandlungen sind mit * gekennzeichnet.

4 Diskussion

4.1 Ionenkonzentrationen/-verhältnis

Die Ergebnisse der Ionenkonzentrationsmessungen zeigten unter Salzstress in beiden Sorten eine Akkumulation von Na und Cl in allen Blättern (Abb. 5-8). Daraus lässt sich schließen, dass keine der beiden Sorten über einen Mechanismus verfügt, der eine vollständige NaCl-Abschirmung ermöglicht.

Die Reduktion der Na-Konzentrationen bei BARI SP4 nach sieben Tagen und der Cl-Konzentrationen bei BARI SP8 nach fünf Tagen weisen jedoch auf Regulationsmechanismen hin. Da sich die Konzentrationen verringerten und sich nicht nur die Anstiege verminderten, fand womöglich eine nachträgliche Ionen-Verlagerung statt. Die erhobenen Daten lieferten jedoch keinen Aufschluss über die Ziele der Verlagerungen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass nicht alle Blätter der Versuchspflanzen beprobt wurden und eine Ionenverlagerung in die unbeprobten ältesten Blätter nicht ausgeschlossen werden kann.

Aufgrund hoher Varianz der Messergebnisse kann jedoch nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass sich die Ionenkonzentrationen tatsächlich nachträglich verringerten. Es ist auch möglich, dass diese relativ konstant blieben und die sichtbaren Reduktionen auf individuelle Unterschiede zwischen den Versuchspflanzen zurückzuführen sind. Dies würde auf Abschirmungsmechanismen hinweisen. Das diese erst nach fünf bzw. sieben Tage effektiv funktionierten könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich die Versuchspflanzen zunächst in einer initialen Alarmphase befanden, welche durch die akute Salzapplikation hervorgerufen wurde. Erst nach einigen Tagen erfolgte der Übergang in die Anpassungsphase in der sich die Stressreaktion zeigte (Larcher, 2001).

Im Rahmen weiterer Versuche könnten höhere Probenanzahlen zur Differenzierung zwischen potentiellen Verlagerungs- oder Abschirmungsmechanismen beitragen. Darüber hinaus könnten zusätzliche Messungen der Ionengehalte aller Pflanzenorgane Aufschluss über die Lokalisation möglicher Ionenverlagerungen geben.

In Blättern, die schon vor Salzapplikation gebildet wurden, stiegen die Na-Konzentrationen bei BARI SP8 und die Cl-Konzentrationen bei BARI SP4 mit zunehmender Länge der Salzapplikation an. Die Akkumulation hängt demnach von der blattspezifischen Transpirationsdauer ab. Auch in Blättern, die unter Salzstress gebildet wurden, zeigte sich dieser Zusammenhang bei Betrachtung der Chlorid-Konzentrationen bei BARI SP8.

Bei beiden Sorten zeigte sich in Blättern, deren Bildung unter Salzstress erfolgte, jedoch die Tendenz einer Zunahme der Na-Konzentration, je später die Blattentwicklung stattfand. Aufgrund der stetig abnehmenden Verfügbarkeit von Kalium ist es möglich, dass die Pflanzen während der Blattentwicklung auf alternative osmotisch aktive Moleküle angewiesen sind. In verschiedenen Glykophyten konnte bereits festgestellt werden, dass Natrium diese Funktion übernehmen kann (Wakeel et al., 2011). Dabei ist jedoch zu beachten, dass bei BARI SP4 sowohl die Stichprobenmenge ($n \leq 2$) als auch die Unterschiede zwischen den Blättern sehr gering ausfielen. Bei BARI SP8 wies zudem nur das jüngste Blatt diese Tendenz auf. Aufgrund dessen erlaubt die statistische Aussagekraft dieser Daten keine definitive Interpretation auf biologisch-physiologischer Grundlage.

Bei beiden Sorten verminderte Salzstress die Kalium-Konzentrationen in unter Salzstress gebildeten Blättern. Dies ist vermutlich auf eine verminderte Kaliumaufnahme zurückzuführen, da Natrium und Kalium in direkter Konkurrenz um Ionenkanäle stehen (Schulze et al., 2002). Durch die erhöhte Verfügbarkeit von Na-Ionen verringert sich somit die Konkurrenzfähigkeit der K-Ionen. Mit zunehmender Länge der Salzexposition ist aufgrund der verminderten Kaliumaufnahme mit zunehmend stark einschränkenden physiologischen Auswirkungen in Folge von Kaliummangel zu rechnen.

In bereits vor Salzapplikation gebildeten Blättern sind die Verminderungen des K-Na-Verhältnisses auf den Anstieg der Na-Konzentrationen zurückzuführen. In Blättern, deren Bildung unter Salzstress stattfand, wird dieser Effekt zusätzlich durch die Abnahme der Kalium-Konzentrationen verstärkt. Bei BARI SP4 bedingten die Reduktionen der Na-Konzentrationen nach fünf- bis siebentägiger Salzexposition keine weitere Reduktion der K-Na-Verhältnisse. Da BARI SP4 in

Bezug auf Salzstress als empfindlicher als BARI SP8 eingestuft wurde, ist davon auszugehen, dass dieser Mechanismus nicht ausreicht, um die Einschränkungen der physiologischen Aktivitäten unter Salzstress weitreichend einzudämmen.

4.2 Aktivität anti-oxidativer Enzyme

Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen zeigten sortenspezifische Reaktionen auf Salzstress. Während BARI SP4 erhöhte Aktivitäten von Katalase aufwies, bedingte Salzstress bei BARI SP8 zusätzlich zu erhöhten Katalase-Aktivitäten auch einen Anstieg der Glutathion-Reduktase-Aktivitäten. Bei beiden Sorten wurden keine Veränderungen in den Aktivitäten von Ascorbat-Peroxidase, Peroxidase und Superoxid-Dismutase festgestellt.

Da sich die Sorten in ihrer Toleranz gegenüber Salzstress unterscheiden, ist anzunehmen, dass erhöhte Aktivität der Glutathion-Reduktase zur erhöhten Salztoleranz von BARI SP8 beiträgt. Ein Anstieg der GR-Aktivität resultiert in einer erhöhten Verfügbarkeit von NADP^+ als Elektronenakzeptor in der Elektronentransportkette (Abb. 1). Entweichende Elektronen werden vermehrt von NADP^+ aufgefangen und reagieren weniger mit O_2 , wodurch an dieser Stelle potentiell die Formation von $\text{O}_2^{\bullet}$ verringert werden kann.

Bei BARI SP8 waren die GR-Aktivitäten bereits nach kurzer Salzexposition (drei Tage) erhöht. Die Bildung von vergleichsweise geringen Mengen von reaktiven Sauerstoffspezies reicht folglich aus, um eine Hochregulierung von GR auszulösen. Die CAT-Aktivität beider Sorten stieg im Gegensatz dazu erst ab einer Salzexposition von fünf Tagen an. Dies kann auf die geringe Substratspezifität gegenüber H_2O_2 zurückgeführt werden, wobei eine Hochregulierung von CAT umso effektiver wirkt, je mehr H_2O_2 zur Verfügung steht.

Im Vergleich der Blätter, die schon vor Salzapplikation entwickelt waren, hat das Blattalter keinen Einfluss auf die Enzymaktivitäten. Eine Blattentwicklung nach Salzapplikation bedingte geringere Anstiege der Enzymaktivitäten von GR bei BARI SP4. Es ist davon auszugehen, dass die Menge der ROS mit zunehmender Länge der Salzexposition ansteigt. Je später die Blattbildung stattfindet, desto

niedriger sind folglich die ROS-Konzentrationen in den jeweiligen Blättern. Bei BARI SP8 veränderten sich die CAT-Aktivitäten in diesen Blättern durch Salzstress nicht. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die CAT-Aktivität erst bei höheren ROS-Konzentrationen ansteigt. Die Enzymregulation findet demnach auf Blattebene in Abhängigkeit des lokalen Stresslevels statt.

Bei BARI SP8 wurden jedoch auch in unter Salzstress gebildeten Blättern erhöhte CAT-Aktivitäten festgestellt. Dies deutet auf eine Enzymregulation hin, die auch durch weitere Faktoren gesteuert wird. Eine mögliche Erklärung wäre eine präventive Hochregulation der Enzymaktivität in den jüngsten Blättern zum Schutz vor oxidativen Schäden. Die genauen Zeitpunkte der Entwicklung neuer Blätter wurden jedoch nicht notiert. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die ROS-Konzentrationen bereits soweit angestiegen waren, dass eine lokale Anpassung der CAT-Aktivitäten stattfand. Zur Aufklärung der Enzymregulationsebene könnten zusätzliche Messungen der tatsächlichen ROS-Konzentrationen hilfreich sein.

4.3 SPAD

Die Ergebnisse der SPAD-Werte zeigten in beiden Sorten ein ähnliches Bild. Insgesamt wurden die SPAD-Werte nicht negativ von Salzstress beeinflusst. Dies weist darauf hin, dass unter Salzstress keine Beeinträchtigung der Stickstoffassimilation auftritt, sondern diese weiterhin uneingeschränkt erfolgt. Außerdem deutet dies darauf hin, dass in Chloroplasten kein bis wenig durch ROS hervorgerufener Abbau von Chlorophyll stattfand.

Der Anstieg der SPAD-Werte in Blättern, deren Bildung unter Salzstress stattfand ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Menge an Chlorophyll der Blätter konstant bleiben, aber das Wachstum der Blätter unter Salzstress reduziert ausfällt. Dadurch erhöhen sich die Chlorophyll-Konzentrationen.

4.4 Mögliche Fehlerquellen

Durch die Verwendung von Stecklingen, hatten die Versuchspflanzen verschiedene Wachstumsvoraussetzungen. Diese wurde zudem durch die Verwendung verschiedener Stecklinge verstärkt, da Stecklinge aus Triebspitzen und aus Sprossabschnitten gewonnen wurden. Während des Versuchs zeigte sich, dass Stecklinge aus Sprossabschnitten eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit aufwiesen als Stecklinge aus Triebspitzen.

Während der Pflanzenanzucht konnte der Befall einiger Versuchspflanzen mit Thripsen nicht vermieden werden, wodurch auf diese Pflanzen zusätzlicher biotischer Stress wirkte.

Während des Versuchzeitraums wurden im Gewächshaus sehr hohe Temperaturen ($>35\text{ °C}$) erreicht (Abb. 4). Da auch Hitzestress die Bildung von ROS auslöst, konnten Wechselwirkungen zwischen Salz- und Hitzestress nicht ausgeschlossen werden.

Durch die Erhebung der SPAD-Werte war eine Einschätzung der physiologischen Aktivität der Versuchspflanzen möglich. In weiteren Versuchen könnten Messungen von Photosynthese-Parametern genauere Informationen über den Einfluss von Salzstress auf die physiologische Aktivität liefern.

Außerdem sind zusätzliche Messungen der Blattflächen nötig, um Transpirationsraten zu berechnen und somit die Abhängigkeit der Ionenakkumulation von den blattspezifischen Transpirationsdauern genauer zu beschreiben. Direkte Messungen der Transpirationsraten der einzelnen Blätter könnten noch genauere darüber Informationen liefern, erfordern jedoch auch einen höheren Arbeitsaufwand.

Aufgrund des Versuchsaufbaus mit einer maximalen Probenanzahl von $n=3$ ist eine umfassende statistische Untersuchung nicht möglich gewesen. Um die statistische Aussagekraft weiterer Versuche zu erhöhen wäre eine Berechnung der Stichprobenmenge aufgrund von hier aufgeführten Tendenzen zu empfehlen.

4.5 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Salzstress auf die physiologische Aktivität von Blättern verschiedenen Alters von *Ipomoea batatas* untersucht. Dabei unterschieden sich die Sorten BARI SP4 und BARI SP8 im Hinblick auf Ionenverteilungen und in der Stressantwort von anti-oxidativen Enzymen.

Es wurden sortenspezifische Regulationsmechanismen von Natrium bzw. Chlorid aufgewiesen. Sofern jedoch keine Regulationsmechanismen vorlagen, erfolgte die Ionenakkumulation in Abhängigkeit der blattspezifischen Transpirationsdauer. Salzstress bedingte zudem eine Beeinträchtigung der Kaliumaufnahme und das Kalium-Natrium-Verhältnis verschob sich zugunsten des Natriums.

Es konnte gezeigt werden, dass Glutathion-Reduktase und Katalase Teil der Reaktion auf durch Salzstress bedingten oxidativen Stress sind, wobei eine Anpassung der Glutathion-Reduktase-Aktivität vermutlich zur erhöhten Salztoleranz von BARI SP8 beiträgt. Die Enzymregulation scheint dabei in Abhängigkeit der lokalen Stresslevel der einzelnen Blätter zu erfolgen und nicht über die Blattebene hinauszureichen.

Die Stickstoffassimilation wurde in beiden Sorten nicht von Salzstress beeinträchtigt und in den Chloroplasten zeigte sich kein Abbau von Chlorophyll.

In weiterführenden Versuchen wird es auf Grundlage der erhobenen Daten möglich sein, präzisere Fragestellungen zu bearbeiten, um somit ein besseres Verständnis der Stressreaktionen und Toleranzmechanismen zu erlangen. Dies ist für den zukünftigen Aufrechterhalt der Produktion von Süßkartoffeln auf salzbelasteten Böden essentiell.

VI. Literaturverzeichnis

- Abogadallah, G. M. (2010). Insights into the significance of antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling & Behavior*, 5(4), 369–374.
- Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.*, 85, 235–241.
- Asada, K. (1999). The Water-Water-Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 601–639.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276–287.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Chan, Z. (2015). ROS Regulation During Abiotic Stress Responses in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 15.
- Chance, B., & Maehly, A. C. (1955). Assay of Catalases and Peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2, 764–775.
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2.
- FAOSTAT. (2017). *Production Year Book. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy*.
- Foyer, C. H., & Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1), 21–25.
- Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiology*, 59(2), 309–314.
- Hanson, B. R., Grattan, S. R., & Fulton, A. (2006). *Agricultural Salinity and Drainage*. Davis: University of California, Department of Land, Air and Water Resources.
- Haque, S. A. (2006). Salinity problems and crop production in coastal regions of Bangladesh. *Pak. J. Bot.*, 38(5), 1359–1365.
- Larcher, W. (2001). *Ökophysiologie der Pflanzen: Leben, Leistung und Stressbewältigung der Pflanzen in ihrer Umwelt* (6. Aufl.). Stuttgart: Ulmer.
- Lechno, S., Zamski, E., & Tel-Or, E. (1997). Salt stress-induced responses in cucumber plants. *Journal of Plant Physiology*, 150, 206–211.

- Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2), 139–158.
- Mehler, A. H. (1951). Studies on Reactions of Illuminated Chloroplasts. I. Mechanism of the Reduction of Oxygen and Other Hill Reagents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 34, 339–351.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405–410.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, (59), 651–81.
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbat-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Phys.*, (22), 867–880.
- Noctor, G. (2002). Drought and Oxidative Load in the Leaves of C3 Plants: A Predominant Role for Photorespiration? *Annals of Botany*, 89(7), 841–850.
- Schulze, E. D., Beck, E., & Müller-Hohenstein, K. (2002). *Pflanzenökologie*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Sevengor, S., Yasar, F., Kusvuran, S., & Ellialtioglu, S. (2011). The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidative enzymes of pumpkin seedling. *African Journal of Agricultural Research*, 6(21), 4920–4924.
- Teakle, N. L., & Tyerman, S. D. (2010). Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance. *Plant, Cell and Environment*, 33, 566–589.
- Waakel, A., Farooq, M., Qadir, M., Schubert, S. (2011). Potassium Substitution by Sodium in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30(4), 401–413.
- Willekens, H. (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO Journal*, 16(16), 4806–4816.
- Yoshida, Shou., Forno, D. A., Cock, J. H., & Gomez, K. A. (1976). *Laboratory Manual For Physiological Studies Of Rice*.
- Zaman, M., Shahid, S. A., & Heng, L. (2018). *Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques*. Cham: Springer International Publishing.
- Zhu, J., Bie, Z., & Li, Y. (2008). Physiological and growth responses of two different salt-sensitive cucumber cultivars to NaCl stress. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(3), 400–407.

VII. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. Folkard Asch für die Ermöglichung und Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Bei Frau Dipl.-Agr.Biol. Julia Hartmann möchte ich mich für die intensive Unterstützung im Labor und die Beantwortung jeglicher Fragen bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Shimul Mondal und Ebna Habib Md Shofiur Rahaman für die Mitarbeit bei der Ernte und im Labor bedanken.

Zuletzt möchte ich mich meiner Familie, insbesondere meiner Schwester, für die Unterstützung während meines Studiums danken.