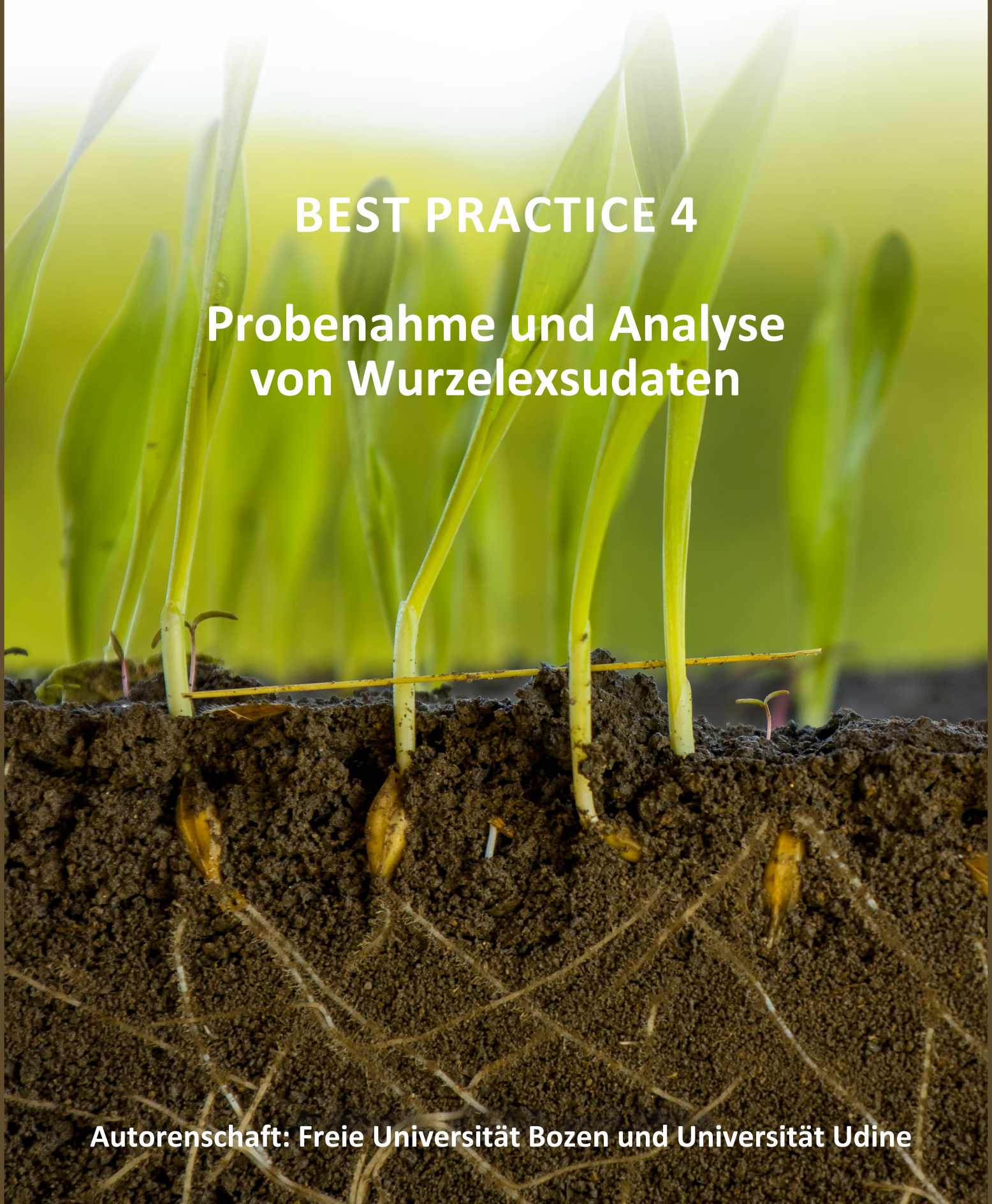
Interreg Italia–Österreich

Co-funded by the European Union

CEDRIC



BEST PRACTICE 4

Probenahme und Analyse von Wurzelexsudaten

Autorenschaft: Freie Universität Bozen und Universität Udine

Wurzelexsudate sind eine komplexe Mischung aus organischen und anorganischen Verbindungen, die von Pflanzenwurzeln aktiv an die Umgebung abgegeben werden. Zu diesen Verbindungen gehören Zucker, Aminosäuren, organische Säuren, Phenole, sekundäre Metaboliten und Signalmoleküle. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Gestaltung der Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen, der Nährstoffmobilisierung und den Stressreaktionen.

Die qualitative und quantitative Zusammensetzung von Wurzelausscheidungen ist sehr dynamisch und hängt von verschiedenen Faktoren ab. Dazu zählen die Pflanzenart, das Entwicklungsstadium, der Ernährungszustand, die Umweltbedingungen sowie das Vorhandensein biotischer Wechselwirkungen. Aus diesem Grund sind für die Entnahme und Analyse von Wurzelausscheidungen sorgfältig standardisierte Methoden erforderlich, um Reproduzierbarkeit und eine aussagekräftige biologische Interpretation zu gewährleisten.

Hydroponiksysteme werden häufig für Studien zu Wurzelexsudaten verwendet, da sie eine hohe Kontrolle über die Wachstumsbedingungen ermöglichen und die Sammlung der Exsudate mit minimaler Beeinträchtigung durch Bodenpartikel erleichtern. Die hydroponische Kultivierung hat jedoch auch bestimmte Nachteile, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

In dieser Best Practice wird ein verfeinertes Protokoll für die Probenahme und Analyse von Wurzelausscheidungen vorgestellt, das auf Experimenten im Rahmen des CEDRIC-Projekts basiert. Das Protokoll soll allgemeine Leitlinien bereitstellen, die sich an verschiedene Pflanzenarten, Versuchsziele und Analyseplattformen anpassen lassen. Gleichzeitig sollen kritische Schritte, potenzielle Variabilitätsquellen und methodische Kompromisse hervorgehoben werden. Im Rahmen des CEDRIC-Projekts wurden Gerstenpflanzen mehrere Wochen lang unter kontrollierten Bedingungen hydroponisch gezüchtet. Die eine Hälfte der Pflanzen wurde mit optimalen Nährstoffmengen versorgt, während der anderen Hälfte das Mikronährstoff Eisen vorenthalten wurde. Jede Woche wurden die Wurzelausscheidungen von eisenarmen und eisenreichen Gerstenpflanzen gesammelt. Es wurde ein Nährstoffmangel herbeigeführt, da dieser eine deutlich größere Freisetzung von Ausscheidungen bewirkte. Die Wurzelausscheidungen wurden nach der Trennung durch Flüssigchromatographie mittels Massenspektrometrie analysiert. Es wurden Experimente durchgeführt, um die Methodik der Sammlung, der chemischen Analyse und der Datenanalyse zu verfeinern. Diese werden im Folgenden für alle Interessierten ausführlich beschrieben.

Obwohl sich das oben beschriebene Protokoll auf Gerstenpflanzen bezieht, die unter eisenreichen und eisenarmen Bedingungen gezüchtet wurden, kann der allgemeine Ansatz auf viele verschiedene Pflanzenarten und Versuchsdesigns übertragen werden. Dabei sollten die Wuchslänge, die Nährstoffzusammensetzung und die Behältergröße entsprechend der Pflanzenmorphologie, der Wachstumsrate und den Versuchszielen angepasst werden.

Nährstoffmangel oder andere kontrollierte Stressfaktoren, wie beispielsweise Stickstoff- oder Phosphorbegrenzung, Salzgehalt oder pH-Schwankungen, können zur Stimulierung der Wurzelexsudation genutzt werden. Dabei muss jedoch sorgfältig zwischen physiologisch relevanten Reaktionen und stressbedingten Artefakten unterschieden werden. Bei Nährstoffmangel wird dringend die Verwendung von deionisiertem Wasser empfohlen, um eine unkontrollierte Zufuhr von Ionen aus Leitungswasser zu vermeiden.

Umweltparameter wie Temperatur, Lichtintensität, Photoperiode und relative Luftfeuchtigkeit sollten möglichst konstant gehalten werden, da Schwankungen den Stoffwechsel und die Ausscheidungsmuster der Pflanzen erheblich beeinflussen können. Können die optimalen Bedingungen nicht aufrechterhalten werden, müssen die Wachstumsdauer der Pflanzen und der Zeitpunkt der Probenahme entsprechend angepasst werden.

1) Pflanzenwachstum

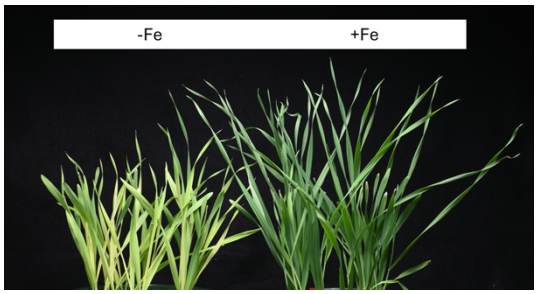
- **Pflanzenmaterial:** Samen geeigneter Sorten/Arten

- **Werkzeuge:** saugfähiges Papier, Kartons (mindestens 300 x 300 x 250 mm), Schwimmflöße für die Hydrokultur (etwas kleiner als die Kartongröße), 1-Liter-Flaschen, Glas- oder Kunststoffbehälter zur Herstellung von Lösungen, Messbecher/-behälter aus Kunststoff, kleine Waage (bei Verwendung von Salzen), pH-Meter, Luftpumpe für Aquarien (mindestens 600 l/h), Gewächshaus (bei Bedarf mit Beleuchtung)

- **Verbrauchsmaterialien:** Salze (oder Flüssigdünger)

Dies ist ein Beispiel für ein detailliertes, optimales Protokoll bei der Verwendung von +Fe/-Fe-Gerstenpflanzen. Die Gerstenkörner (Hordeum vulgare L., cv. Bianca) werden mit Wasser gespült und in das Schwimmfloß gegeben. Die Box wird bis wenige Zentimeter unter den Rand mit belüfteter, Fe-freier Nährlösung gefüllt und die Pflanzen wachsen 21 Tage lang darin. Die Fe-freie Nährlösung enthält die folgenden Nährstoffe: $Ca(NO_3)_2$ 2 mM; $MgSO_4$ 0,5 mM; K_2SO_4 0,7 mM, KCl 0,1 mM, KH_2PO_4 0,1 mM, H_3BO_3 1 µM; $MnSO_4$ 0,5 µM; $CuSO_4$ 0,5 µM; $ZnSO_4$ 0,5 µM; $Na_2MoO_4 \cdot 0{,}01$ µM. Der pH-Wert sollte bei etwa 6,5 liegen. Andernfalls korrigieren Sie ihn mit 0,1 M NaOH oder HCl. Pflanzen mit ausreichendem Fe-Gehalt werden in der oben beschriebenen Nährlösung unter Zugabe von 100 µM Fe-EDTA gezüchtet. Die Nährlösung muss zweimal pro Woche erneuert werden. Die kontrollierten klimatischen Bedingungen sollten wie folgt sein: Tag-/Nacht-Photoperiode 16/8, Lichtintensität 220 µE $m^{-2}s^{-1}$, Temperatur (Tag/Nacht) 25/20 °C, relative Luftfeuchtigkeit 70–80 %.

- Die Größe der Box, die Wachstumszeit sowie der Nährstoffgehalt müssen jeweils an die Bedürfnisse der Pflanzenart angepasst werden.
- Bereiten Sie für jeden Nährstoff eine Stammlösung mit einer 100- bis 1000-fachen Konzentration vor und geben Sie diese unter ständigem Rühren in eine zur Hälfte mit Wasser gefüllte Box. Alternativ können Sie auch flüssige Volldüngerlösungen verwenden und dabei die Anweisungen des Herstellers befolgen (in diesem Fall ist es schwierig bis unmöglich, einen Nährstoffmangel zu induzieren).
- Wenn Lösungen zur Induzierung von Mangelerscheinungen verwendet werden, sollte deionisiertes statt Leitungswasser verwendet werden.
- Am besten ist es, die Pflanze in einer Wachstumskammer zu halten, in der alle Umweltparameter kontrolliert werden. Alternativ kann auch ein kleines Gewächshaus verwendet werden (die Temperatur sollte dabei zwischen 18 °C und 28 °C liegen). Es kann natürliches Licht verwendet werden, sofern es ausreichend ist, oder eine LED-Beleuchtung mit Zeitschaltuhr zur Steuerung der Photoperiode. Wenn die Umgebungsbedingungen nicht optimal sind, muss die Dauer des Pflanzenwachstums entsprechend angepasst werden.



2) Sammeln von Wurzelexsudat

- **Werkzeuge**: mindestens zwei Boxen derselben Größe wie in Punkt 1 verwendet; steriles deionisiertes Wasser; Filtersystem mit 0,2 µm; sterile Beutel oder Behälter (z. B. Röhrchen, Gefrierbeutel); denaturierter Alkohol; Gefrierschrank mit -20 °C zur Lagerung.
- **Beschriftung:** Bereiten Sie haltbare Etiketten, einen Permanentmarker und ein Notizbuch für Notizen vor.
- **Sterilität**: Alle Werkzeuge sollten vor der Probenahme sterilisiert werden (mit 70-prozentigem Ethanol).

Jede Woche werden sterilisierte Boxen teilweise mit sterilem Wasser gefüllt, um die Wurzeln zu spülen. Das Schwimmgestell mit den Pflanzen wird für zwei Minuten hineingestellt. Dabei werden die Wurzeln mehrmals aus dem Wasser genommen und wieder hineingelegt, um das Spülen zu unterstützen. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal wiederholt. Füllen Sie eine sterilisierte Box mit einer minimalen Menge sterilisierten, deionisierten Wassers, gerade genug, um alle Wurzeln einzutauchen. Stellen Sie das Schwimmgestell mit den gespülten Wurzeln für ein bis vier Stunden in die Lösung. Setzen Sie die Schwimmgestelle mit den Pflanzen anschließend wieder in die Box, um das Pflanzenwachstum fortzusetzen. Die Lösung mit den Exsudaten muss bei 0,2 µm gefiltert, in sterile, beschriftete Behälter umgefüllt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert werden.

Die vor der Exsudatsammlung durchgeführten Spülschritte sind unerlässlich, um die Verschleppung von Restnährlösung und locker gebundenen Mikroorganismen zu verringern. Dennoch ist zu beachten, dass eine vollständige Sterilität nicht erreicht werden kann und es während der Sammelphase weiterhin zu mikrobieller Aktivität kommen kann.

Häufig wird steriles deionisiertes Wasser als Sammelmedium verwendet, da es Hintergrundsignale während der chemischen Analyse minimiert. Das Fehlen von Nährstoffen kann jedoch auch kurzfristige Stressreaktionen bei Pflanzen auslösen. Die Dauer der Exsudatsammlung muss daher so gewählt werden, dass einerseits eine maximale Rückgewinnung von Verbindungen erreicht wird und andererseits ein minimaler mikrobieller Abbau oder stressinduzierte Artefakte auftreten.

Der Zeitpunkt der Probenahme sollte sorgfältig auf der Grundlage des Versuchsziels ausgewählt werden. Für zuverlässige Vergleiche ist zudem eine konsistente Probenahme entscheidend.

- Der späte Vormittag/Mittag ist in der Regel die beste Tageszeit für die Entnahme von Wurzelausscheidungen, da diese dann in größerer Menge freigesetzt werden.
- Die Dauer der Entnahme ist jedoch schwer zu bestimmen. Zwar führt eine längere Entnahme zu einer größeren Menge freigesetzter Wurzelausscheidungen, jedoch erhöht sich dadurch auch die Wahrscheinlichkeit einer Zersetzung der Ausscheidungen. Bitte beachten Sie, dass selbst bei sterilisierten Werkzeugen und sorgfältig gespülten Wurzeln immer einige Mikroorganismen vorhanden sind, die möglicherweise die Wurzelausscheidungen verbrauchen. Wenn das Ziel darin besteht, den Einfluss von Mikroorganismen zu minimieren, sollte die Entnahme eine Stunde dauern. Wenn die Menge der gewonnenen Wurzelausscheidungen entscheidend ist, sollte die Entnahme zwei bis vier Stunden dauern.

Box 1. Pflanzenwachstumsbedingungen und ihre Auswirkungen auf die Wurzelausscheidung

Die Wachstumsbedingungen haben einen starken Einfluss auf die Menge und Zusammensetzung der Wurzelausscheidungen. Lichtintensität und Photoperiode beeinflussen die Kohlenstoffassimilation und -verteilung in den Wurzeln, während Temperatur und Luftfeuchtigkeit den Stoffwechsel und die Transpiration regulieren. Die Verfügbarkeit von Nährstoffen verändert nicht nur die Pflanzenphysiologie, sondern beeinflusst auch direkt das qualitative Profil der ausgeschiedenen Verbindungen.

Um die Vergleichbarkeit zwischen den Experimenten zu gewährleisten, sollten die Wachstumsbedingungen einschließlich Photoperiode, Lichtintensität, Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Nährstoffzusammensetzung und Wachstumsdauer sorgfältig dokumentiert werden. Selbst kleine Abweichungen bei diesen Parametern können zu erheblichen Unterschieden in den Exsudatprofilen führen und die biologische Interpretation möglicherweise erschweren.

Werden Experimente außerhalb kontrollierter Wachstumskammern durchgeführt, ist mit zusätzlichen Schwankungen zu rechnen, die bei der Datenanalyse ausdrücklich berücksichtigt werden sollten.

3) Analyse des Wurzelexsudats

Die Analyse von Wurzelausscheidungen erfolgt in der Regel mittels Flüssigchromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie (LC-MS). Dadurch ist der Nachweis einer Vielzahl organischer Verbindungen mit hoher Empfindlichkeit möglich. Je nach analytischem Aufbau können gezielte oder ungezielte Ansätze angewendet werden.

Aufgrund der typischerweise geringen Konzentration der exsudierten Verbindungen ist besondere Aufmerksamkeit auf die Probenkonzentration, die Hintergrundkontamination und die Signalnormalisierung zu richten. Wann immer möglich, sollten interne Standards einbezogen werden, um die analytische Variabilität zu bewerten und die quantitative Zuverlässigkeit zu verbessern. Eine Normalisierung der Daten auf Wurzelbiomasse, Wurzellänge oder Erntezeit wird dringend empfohlen, um aussagekräftige Vergleiche zwischen den Proben zu ermöglichen.

• **Werkzeuge:** Flüssigchromatographiesystem mit Säule und Detektor für organische Moleküle.

Box 2. Problematik der Wurzelausscheidungs-Sammlung: Hydrokultur vs. bodenbewachsene Pflanzen

Die Sammlung von Wurzelexsudaten kann entweder mithilfe von Hydroponiksystemen oder durch im Boden angebaute Pflanzen erfolgen. Jeder Ansatz hat dabei spezifische Vor- und Nachteile. Der hydroponische Anbau ermöglicht ein hohes Maß an experimenteller Kontrolle und erleichtert die direkte Gewinnung exsudierter Verbindungen. Dadurch werden Störungen durch Bodenpartikel und organische Stoffe minimiert. Dies macht die Hydroponik besonders geeignet für qualitative und quantitative chemische Analysen.

Allerdings spiegeln hydroponische Systeme die physikalische, chemische und biologische Komplexität von Bodenumgebungen nicht vollständig wider. Bei im Boden wachsenden Pflanzen kann ein erheblicher Teil der Wurzelausscheidungen schnell von Bodenpartikeln adsorbiert, von Mikroorganismen metabolisiert oder durch abiotische Reaktionen umgewandelt werden. Das erschwert die direkte Sammlung. Gleichzeitig bieten bodenbasierte Systeme eine realistischere Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Pflanzen, Boden und Mikroben.

Die Wahl zwischen hydroponischen und bodenbasierten Ansätzen sollte daher von den spezifischen Zielen der jeweiligen Studie geleitet werden. Hydroponik wird empfohlen, wenn eine genaue chemische Charakterisierung und Reproduzierbarkeit im Vordergrund stehen. Bodenbasierte Systeme sind dagegen besser geeignet, wenn ökologische Relevanz und Interaktionsdynamik im Mittelpunkt stehen.

4) Datenanalyse

Bei der Datenanalyse von Wurzelausflussprofilen ist eine sorgfältige Berücksichtigung der biologischen Variabilität, des analytischen Rauschens und der Normalisierungsstrategien erforderlich. Rohe chromatographische und massenspektrometrische Daten sollten mit einer geeigneten Software zur

Erkennung von Peaks, Ausrichtung und Verbindungskennzeichnung verarbeitet werden.

Um aussagekräftige Vergleiche zwischen den Proben zu ermöglichen, sollten die Ausflusssignale anhand biologisch relevanter Parameter wie dem Frisch- oder Trockengewicht der Wurzeln, der Wurzellänge, der Anzahl der Pflanzen pro Probe oder dem Entnahmezeitpunkt normalisiert werden. Die Einbeziehung von Blindkontrollen (z. B. steriles Wasser, das denselben Entnahme- und Filtrationsverfahren unterzogen wurde) ist unerlässlich, um Hintergrundverunreinigungen und Artefakte zu identifizieren.

Wann immer möglich, sollten biologische gegenüber technischen Replikaten Vorrang haben, da sie die natürliche Variabilität zwischen den Pflanzen erfassen. Die statistischen Analysen sollten entsprechend dem Versuchsaufbau und der Datenverteilung ausgewählt werden. Dabei können multivariate Ansätze besonders nützlich sein, um behandlungsspezifische Exsudationsmuster zu identifizieren.

Box 3. Schwierigkeiten bei der Analyse der Qualität und Quantität organischer Moleküle in einer Lösung

Die Analyse von Wurzelausscheidungen ist aufgrund der geringen Konzentration und der hohen chemischen Vielfalt der freigesetzten Verbindungen technisch sehr herausfordernd. Viele Metaboliten sind nur in Spuren vorhanden und können somit unter die Nachweisgrenze der Analysegeräte fallen. Darüber hinaus sind einige Verbindungen chemisch instabil und können während der Entnahme, Lagerung oder Probenvorbereitung zerfallen.

Matrixeffekte, wie das Vorhandensein von Salzen oder Restverunreinigungen, können die Ionisierungseffizienz während der Massenspektrometrie beeinträchtigen und somit die quantitative Genauigkeit beeinflussen. Die Adsorption von Metaboliten an Kunststoff- oder Glasoberflächen kann die Wiederfindung weiter verringern, insbesondere bei hydrophoben Verbindungen.

Um diese Probleme zu minimieren, werden eine sorgfältige Auswahl der Materialien, eine schnelle Probenverarbeitung, geeignete Lagerbedingungen und die Verwendung interner Standards dringend empfohlen.

Box 4. Auswirkungen von Sammelmethode und Dauer auf die Wurzelausscheidungsprofile

Sowohl die Wahl der Sammelmethode als auch die Dauer der Wurzelausflussprobenahme können die Menge und die Zusammensetzung der gewonnenen Verbindungen erheblich beeinflussen. Um Hintergrundstörungen während chemischer Analysen zu minimieren, wird häufig steriles deionisiertes Wasser verwendet. Eine längere Exposition unter nährstofffreien Bedingungen kann jedoch zu stressbedingten Ausscheidungsreaktionen führen.

Kurze Sammelzeiten (z. B. eine Stunde) verringern die Auswirkungen des mikrobiellen Abbaus und der Stressreaktionen, können jedoch zu einer geringen Metabolitenausbeute führen. Längere Sammelzeiten (zwei bis vier Stunden) erhöhen die Menge des gesammelten Exsudats, bergen aber auch das Risiko, dass Verbindungen abgebaut und von Mikroorganismen verbraucht werden.

Forscher sollten daher die Sammelzeit und die analytischen Anforderungen sorgfältig abwägen, die Konsistenz zwischen den Proben gewährleisten und diese Parameter in den experimentellen Metadaten klar angeben.

Weitere Informationen:

Williams et al. (2021). doi: 10.1016/j.soilbio.2021.108391

Oburger and Jones (2018). Doi: https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.06.004