

## Wurzelexsudate – Gewinnung und Analyse

In der Literatur werden zahlreiche Varianten der Wurzelexsudatgewinnung beschrieben.:

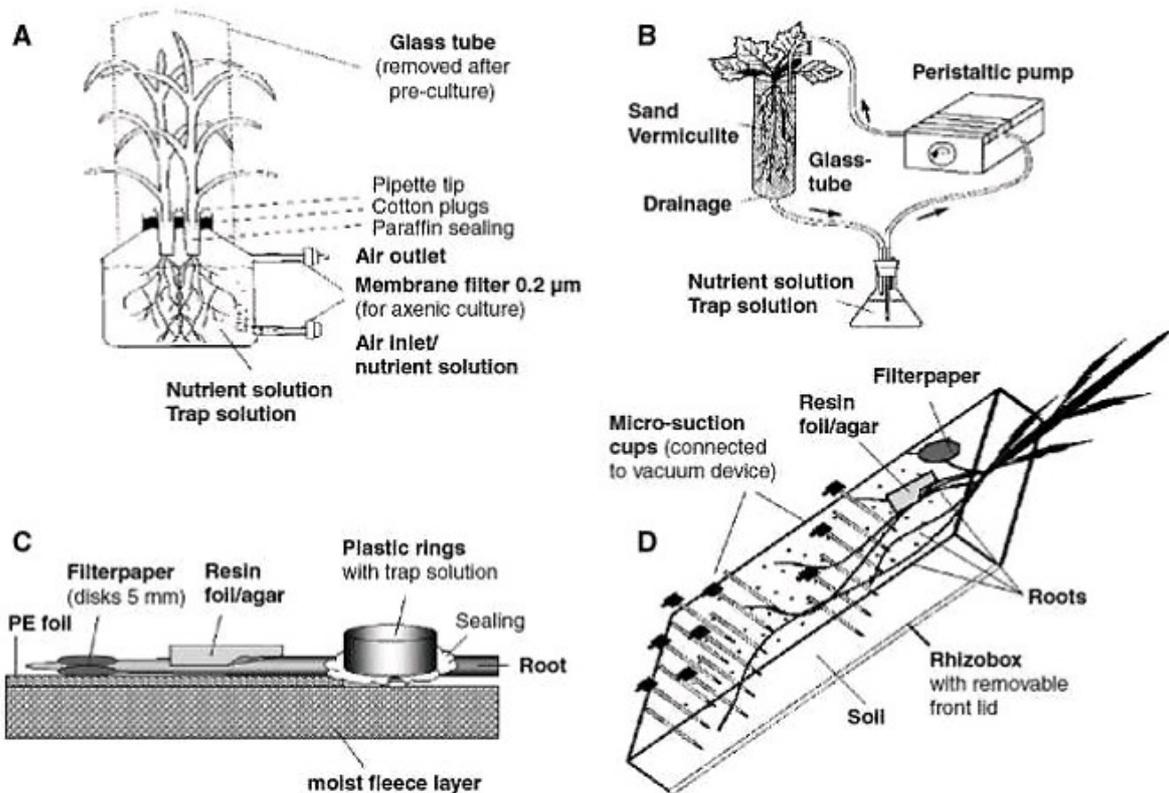


Abb. A zeigt ein sogenanntes **hydroponisches System**, in dem die Pflanzen in einer Nährlösung kultiviert werden, wobei auf eine gute Durchlüftung zur Ermöglichung der Wurzelatmung geachtet werden muß. Abb. B illustriert ein **dynamisches Sammelsystem**, in dem die Pflanzen in Vermiculit, einem seltenen Silikatmineral, kultiviert werden. Mittels einer Pumpe wird die Nährlösung im System zirkuliert. In beiden Fällen können die Wurzelexsudatkomponenten aus der Nährlösung erhalten werden. Abb. C zeigt ein kompliziertes System, in dem die Wurzelexsudate durch direkte Diffusion in ein lokales Auffanggefäß gewonnen werden. In Abb. D sieht man dann eine **Rhizoboxsystem**, welches die Gewinnung der Wurzelexsudate mittels Mikrosaugkerzentechnik ermöglicht.

Alle diese Techniken gehen von der Annahme aus, dass Pflanzenwurzelexsudate kontinuierlich abgegeben werden und unverändert gewonnen werden können. Allerdings wird dabei nicht bedacht, dass Wurzeln, auch die Feinwurzeln, von einer Schleimschicht, der sogenannten **Mucilage**, bedeckt sind und diese ein beachtliches Adsorptionspotential für die exsudierten Metabolite besitzen. Deshalb erachten wir eine **Waschung der Wurzeloberfläche** als die zweckmäßigere Methode, um einen realistischen Überblick der Wurzelexsudationsprozesse in der Rhizosphäre zu erhalten. Allen Methoden ist gemeinsam, dass eine Unterscheidung von aktiv exsudierendem Wurzelspitzen- und älterem Gewebe nicht möglich ist.

Je nach Größe werden 3-5 Pflanzen sorgfältig von der Erde befreit und die Wurzeln gründlich mit Leitungswasser gewaschen. Das Wurzelmaterial wird dann für ca. **4 Stunden mit Aqua dest.** Möglichst unversehrt in einem Glasgefäß extrahiert. Die Exudatlösung wird dann filtriert und bis zur weiteren Aufarbeitung ggf. tiefgefroren.

Die Analytik der Wurzelexsudatwaschung bedingt eine Fraktionierung in eine **lipophile** und **hydrophile Fraktion**. Dazu werden die erhaltenen Flüssigkeitsmengen auf ca. 100 ml am

Rotationsverdampfer eingeengt und dann mit ca. dem gleichen Volumen **Ethylacetat** 2x im Scheidetrichter extrahiert. Um eine möglichst vollständige Phasentrennung zu erhalten, empfiehlt es sich, ca 30 min zu warten. Die Ethylacetatphase kann dann mit **HPLC-UV**, Flüssigchromatographie mit einem UV-Diodenarraydetektor, analysiert werden (dies gibt insbesondere Aufschluss über das Vorhandensein phenolischer Verbindungen im Wurzelexsudat), die Wasserphase kann dann mit **GC-MS**, Gaschromatographie mit massenselektiver Detektion, analysiert werden.

**Probenvorbereitung HPLC-UV:**

Die Ethylacetatphase wird am Rotavapor eingeengt und in Autosampler Vials transferiert. Diese werden am SpeedVac getrocknet und adäquat (10 mg/mL) in Methanol:Wasser:Essigsäure (1:1:0,01, v/v/v) gelöst.

**Probenvorbereitung GC-MS:**

Die Wasserphase wird am Rotavapor eingeengt und in Autosampler Vials transferiert und gewogen. Davon werden 10 mg Wasserphase werden in ein weiteres Autosampler Vials transferiert (in Methanol gelöst und am Speedvac getrocknet). Die getrockneten Proben werden mit 50 µl Hydroxylaminlösung überschichtet und 1 h bei 70°C temperiert. Dann wird mit 50 µL MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid) in Trimethylsilylester bei Raumtemperatur derivatisiert. Die dabei erhaltenen 100 µL werden in spezielle Mikroeinsätze für Autosamplervials transferiert.

