

# **Metall-Detoxifizierung durch Silizium in *Silene* und *Arabidopsis***

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Fachbereich Biochemie / Biotechnologie)

von Frau Susan Wassersleben  
geb. am 10.06.1974 in Salzwedel

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauß
2. Prof. Dr. Wilfried Ernst

2. November 2005

**urn:nbn:de:gbv:3-000009442**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009442>]

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Kompartimentierung und Mechanismen der Schwermetalltoleranz	2
1.2	Das “ <i>beneficial element</i> ” Silizium	7
1.2.1	Schwermetall-Toxizität und Silizium	10
1.3	Germanium das Analogon von Silizium	11
1.4	Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Material	14
2.1.1	Chemikalien	14
2.1.2	Medien	14
2.2	Kultivierung und Behandlung der Pflanzen	15
2.2.1	Pflanzenmaterial	15
2.2.2	Anzucht und Vermehrung	15
	Suspensionskulturen	15
	Pflanzenanzucht	15
	Hydroponische Kulturen	16
	Oberflächensterilisation von Samen	16
	Wurzel-Wachstums-Assays	16
2.2.3	Behandlung der Pflanzen	16
2.2.4	Aufarbeitung des Versuchsmaterials	17
2.3	Allgemeine Methoden	18
2.3.1	Chlorophyllbestimmung	18
2.3.2	Mikrowellenaufschluss	18
2.3.3	Bestimmung von wasserlöslichem Silizium	19
	Bestimmung der Kieselsäurekonzentration im Probenmaterial	20
2.3.4	Bestimmung der Gesamtkonzentration von Schwermetallen mittels Atom-	
	Absorptions-Spektrometrie (AAS)	20
	Flammen-AAS	20
	Elektrothermische Atomisierung	21
2.3.5	Ermittlung der Germaniumkonzentration mittels ICP-MS	21
2.4	Biochemische Methoden und Analytik	22
2.4.1	Extraktion löslicher phenolischer Verbindungen	22
2.4.2	Extraktion organischer Säuren	22

2.4.3	Analyse von phenolischen Verbindungen mittels HPLC	22
2.4.4	Gaschromatographie/ Massenspektrometrie	23
2.4.5	Analyse von Thiolen mittels Derivatisierung mit Monobrombiman	24
2.5	Elektronenmikroskopische Methoden	25
2.5.1	Fixierung	25
2.5.2	Kontrastierung der Präparate	26
2.5.3	Probenpräparation zur Elementanalyse	26
2.5.3.1	Gefrierfixierung	26
2.5.3.2	Gefriersubstitution	26
2.5.4	EDX-Messungen	27
2.5.5	ESI-Messungen und EEL-Spektroskopie	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1	Einfluss von Kupfer und Zink auf das Wachstum von <i>Silene</i> -Spezies	29
3.2	Einfluss von Silizium auf die Toxizität von Kupfer und Zink	30
3.3	Aufnahme von Kupfer und Zink in <i>Silene</i> -Spezies	31
3.4	Zelluläre Lokalisation von Kupfer, Zink und Silizium	32
3.4.1	Ultrastrukturelle Untersuchungen	33
3.4.2	EDX- Messungen	33
3.4.3	Speicherung und Verteilung von Zink und Silizium in der Zelle	38
3.4.4	Speicherung und Verteilung von Kupfer und Silizium in der Zelle	42
3.5	Vorkommen von Phytochelatinen und Glutathion in <i>Silene</i> -Spezies	43
3.6	Organische Säuren und Aminosäuren in <i>Silene</i> -Spezies	45
3.7	Zelluläre Lokalisation von Kupfer, Zink und Silizium in <i>Arabidopsis</i> -Spezies	47
3.7.1	Speicherung und Verteilung von Zink und Silizium in den Blättern	48
3.7.2	Speicherung und Verteilung von Kupfer und Silizium in den Blättern	48
3.8	Schwermetall-Aufnahme in <i>Arabidopsis</i> -Spezies	54
3.9	Einfluss von Kupfer auf die Kieselsäure-Aufnahme	56
3.10	Aufnahme von Kieselsäure und Zink in <i>Arabidopsis</i> -Spezies	57
3.11	Einfluss von Germanium auf die Aufnahme von Kieselsäure und Zink	59
3.11.1	Einfluss von Germanium auf die Aufnahme von Kieselsäure	61
3.11.2	Einfluss von Germanium auf die Aufnahme von Zink	63
3.11.3	Aufnahme und Transport Germanium	66
3.12	Wurzel-Wachstums-Assays	67
3.12.1	Einfluss von Zink auf das Wurzellängen-Wachstum	68
3.12.2	Einfluss von Germanium auf das Wurzellängen-Wachstum	68
3.12.2.1	Chlorophyllbestimmung	69

3.12.3 Einfluss von Kieselsäure auf das Wurzelwachstum nach Zink- und Germanium-Behandlung	69
3.13 Hemmung der Aufnahme von Kieselsäure und Zink in <i>Arabidopsis</i> -Spezies	71
3.13.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
3.13.2 <i>Arabidopsis halleri</i>	74
3.14 Speicherung von Zink in <i>A. thaliana</i> Ökotyp Ler-1 WT und der Mutante tt4	76
3.14.1 Aufnahme von Zink in <i>A. thaliana</i> Ökotyp Ler-1 WT und der Mutante tt4	78
3.14.2 Einfluss von Zink auf das Wurzellängen-Wachstum von <i>A. thaliana</i> Ler-1 WT und deren Mutante tt4	81
3.14.2.1 Chlorophyllbestimmung	82
3.14.3 Vorkommen und Akkumulation phenolischer Verbindungen nach Zink-Stress	82
<b>4 Diskussion</b>	<b>86</b>
4.1 Einfluss von Silizium auf die Toleranz von <i>Silene</i> -Spezies gegenüber Zink oder Kupfer	87
Phytochelatine in <i>Silene</i> -Spezies	89
Organische Säuren und Aminosäuren in <i>Silene</i> -Spezies	91
4.2 Aufnahme von Silizium und deren Einfluss auf die SM-Toleranz in <i>Arabidopsis</i>	93
4.2.1 Mechanismen der Siliziumaufnahme	93
4.2.2 Einfluss von Silizium auf die Toleranz gegenüber Kupfer und Zink	95
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>102</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>106</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>124</b>

### Abkürzungen

μA	Mikroampere
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
°C	Grad Celsius
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bidest.	doppelt destilliert (Reinstwasser)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Col-0	Columbia-0, Ökotyp von <i>Arabidopsis thaliana</i>
cps	counts per second
d	Tage
DFT	Dichte-Funktions-Theorie
d. h.	das heißt
E	Mikrowellenleistung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	Energy Dispersive X-ray microanalysis
EELS	Electron Energy Loss Spectroscopy
EM	Elektronenmikroskop
ERL	Epoxy Resin Low Viscosity
ESI	Electron Spectroscopic Imaging
et al.	und andere
eV	Elektronenvolt
Fe-HBED	Eisen-N,N'-Bis-(2-Hydroxybenzoyl)-Ethylendiamin-N,N'-diacetat
FG	Frischgewicht
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GCT	Gaschromatographie mit <i>Time-of-flight</i> -Analysator-MS
GSH	reduziertes Glutathion
h	Stunden

## Abkürzungsverzeichnis

HEPPS	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HSP	Hitzeschockprotein
ICP	induktiv gekoppeltes Plasma
ICP-MS	induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie
K	Kelvin
Kap.	Kapitel
keV	Kiloelektronenvolt
l	Liter
Ler-1	Landsberg erecta, Ökotyp von <i>Arabidopsis thaliana</i>
LS	Linsmaier & Skoog
M	Molarität
MBrB	Monobrombiman (3,7-Dimethyl-4-brommethyl-6-methyl-1,5-diazabicyclo-[3.3.0]-octa-3,6-dien-2,8-dion)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometrie
MSA	Methansulfonsäure
MT	Metallothionein (-e)
m/z	Masse/Ladungsquotient
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PC	Phytochelatin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PTFE	Polytetrafluorethylen
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
RV	Referenzvolumen
SE	Standardfehler
T	Temperatur
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TG	Trockengewicht

## Abkürzungsverzeichnis

TFA	Trifluoressigsäure
TOF	<i>Time-of-flight</i>
u.a.	unter anderem
UV/Vis	ultravioletter bis sichtbarer Lichtwellenbereich
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
$\lambda$	Wellenlänge

### 1 Einleitung

Die auf der Erde vorkommenden Metalle sind oft das Ergebnis natürlicher Mineralisierung durch die Anwesenheit von Erzkörpern nahe der Erdoberfläche. Vor allem aber haben anthropogene Einflüsse, wie der Abbau von Kupfer und Zinn während der Bronzezeit, das Schmelzen von Eisen während der Eisenzeit, der Abbau von Blei und Silber, die Abwasserverrieselung bzw. Klärschlammasbringung und die Verbrennung fossiler Brennstoffe zur Anreicherung von Metallen im Boden geführt. Die Entwicklung der Eisen- und Stahlindustrie vor 150 Jahren führte aufgrund von Erzurückständen und Metallstaub zu einer weiteren Anreicherung von Metallen im Boden (Ernst, 1990).

Die Einteilung der Metalle erfolgt aufgrund ihrer Dichte. Metalle mit einer Dichte über  $4,5 \text{ g/cm}^3$  werden als Schwermetalle (SM) bezeichnet. Eine Reihe von Schwermetallen sind für Höhere Pflanzen essentiell, sie gehören zu den Mineralelementen der Pflanzen. Die Einteilung der Mineralelemente erfolgt aufgrund ihrer relativen Konzentration im Pflanzengewebe. Zu den Makronährstoffen zählen: Stickstoff, Phosphor, Schwefel, Kalium, Magnesium und Kalzium und zu den Mikronährstoffen: Eisen, Mangan, Zink, Kupfer, Bor, Molybdän, Chlor und Nickel (Marschner, 1995). Jedes dieser Elemente erfüllt drei wesentliche Kriterien: Erstens, eine Pflanze ist durch das Fehlen dieses Elementes nicht fähig ihren kompletten Lebenszyklus zu durchlaufen. Zweitens, die Funktion des Elements ist nicht durch ein anderes Mineralelement austauschbar und Drittens, das Element ist direkt in den Stoffwechsel der Pflanze eingebunden (z. B. als Cofaktor) (Arnon & Stout, 1939).

Essentielle Metalle wie auch alle anderen lebensnotwendigen Mineralelemente führen in zu niedrigen Konzentrationen zu Mangelercheinungen im Organismus. Gelangen allerdings zu hohe Konzentrationen dieser Mineralelemente in den Organismus treten toxische Effekte auf.

Neben den essentiellen Mineralstoffen gibt es eine Reihe von Elementen, die u.a. das Wachstum fördern oder nur für bestimmte Pflanzen essentiell sind. Sie werden unter dem Begriff „*beneficial elements*“ zusammengefasst. Zu ihnen gehören die Elemente: Natrium, Silizium, Selen und Cobalt (Marschner, 1995, Epstein, 1999, Reeves & Baker, 2000).

Schwermetalle, wie Cadmium, Quecksilber, Blei oder Nickel besitzen keine Funktion im Zellstoffwechsel der Pflanzen und wirken bereits in geringsten Konzentrationen toxisch (Marschner, 1995).

Essentielle Metalle sind aufgrund der hohen Bindungsaffinität zu Bodenkolloiden nicht immer in den erforderlichen Konzentrationen für die Pflanze verfügbar. Es gibt in einigen Pflanzen Mechanismen, die auch diese Mikronährstoffe nutzbar machen können. Durch die Synthese von Phytosiderophoren (organische Komplexbildner mit AS-Struktur, die Metalle binden) können Elemente wie Eisen, Kupfer, Zink und Mangan in der Rhizosphäre mobilisiert und über spezifische Transporter durch die Plasmamembran transportiert werden (Römheld, 1991; Von Wiren et al., 1996; Cakmak et al., 1998; Rengel et al., 1998). Die Ansäuerung der Rhizosphäre durch die Ausscheidung von Protonen oder organischen Säuren ist eine weitere mögliche Strategie zur Mobilisierung notwendiger Metalle (Crowley et al., 1991). Metallionen, die von den Wurzeln aufgenommen werden, werden entweder dort gespeichert oder in den Spross exportiert. Der Transport von Metallionen erfolgt über das Xylem. Die Bewegung innerhalb des Xylems scheint überwiegend vom Transpirationsstrom abhängig zu sein. Zudem wird angenommen, dass spezifische Membrantransport-Prozesse den Transport von Metall-Ionen ins Xylem fördern (Salt et al., 1995). Substanzen werden ausschließlich durch den apoplastischen Teil des Xylems transportiert. Hauptsächlich die negativ geladenen Bestandteile der Zellwände (vor allem Polygalakturonsäuren) adsorbieren die Stoffe. Die Substanzen gelangen durch seitliches Entweichen in Interzelluläre Räume, von wo aus sie dann in metabolische Kompartimente der Zellen aufgenommen werden. Der Transport von Ionen durch das Xylem scheint vor allem durch die Anwesenheit bestimmter Komplexatoren, wie z.B. Citrat, Histidin oder Nicotianamin gesteuert zu werden (Senden et al., 1992; Pich & Scholz, 1996; Kerkeb & Krämer, 2003).

### 1.1 Kompartimentierung und Mechanismen der Schwermetall-Toleranz

Schwermetalle wie Kupfer oder Zink sind für ein normales Wachstum der Pflanzen essentiell. Sie werden für eine Reihe physiologischer Stoffwechselprozesse benötigt. Zink dient u.a. als Cofaktor für viele Enzyme und eine große Anzahl von Proteinsequenzen besitzen Zn-bindende Domänen (Clarke & Berg, 1998). Kupfer ist Bestandteil von Proteinen wie Superoxid-Dismutase, Cytochrom c und Plastocyanin. Alle drei Enzyme sind beteiligt am Elektronentransfer. Die Aufnahme solcher essentieller Metalle in phytotoxischen Konzentrationen kann trotz ihrer Notwendigkeit für das Überleben von Pflanzen schädlich sein, genauso wie nicht-essentielle Schwermetalle in niedrigen Konzentrationen zu Wachstumshemmungen und toxischen Symptomen führen können. Toxische Effekte können unter anderem auf die Bindung der Schwermetalle (z.B. Cd, Pb, Hg) an Sulfhydrylgruppen von Proteinen zurückzuführen sein, die ihrerseits dann funktionell inaktiv oder strukturell zerstört sind (Van Assche & Clijsters, 1990). Außerdem kann die Aufnahme supraoptimaler

Cu-Ionen in der Pflanze die Bildung freier Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies stimulieren (Dietz et al., 1999). Um die ständige Versorgung mit essentiellen Schwermetallen in physiologischen Konzentrationen zu gewährleisten und gleichzeitig die Aufnahme nichtessentieller, toxisch wirkender Schwermetalle zu minimieren, haben Pflanzen ein komplexes homöostatisches Netzwerk entwickelt. Dieses Netzwerk kontrolliert die Aufnahme, den Transport und die Detoxifizierung von Schwermetallen auf zellulärer Ebene und im gesamten Organismus. Dabei spielen u.a. Barrieren wie die Zellwand und die Plasmamembran, die Ausscheidung von Wurzelexudaten, die Bindung von Schwermetallen an Peptide im Cytoplasma (z.B. Phytochelatine) und insbesondere die Kompartimentierung von Metallen in der Vakuole eine wesentliche Rolle. Auf extrazellulärer Ebene können auch Mykorrhizen, insbesondere Ektomykorrhizen, die Aufnahme von Schwermetallen in die Pflanze reduzieren, indem sie einen Teil dieser Ionen zurückhalten (Marschner, 1995). Dies kann ähnlich wie in Höheren Pflanzen z.B. durch Bindung an Zellwände oder durch Ablagerung in den Vakuolen erfolgen (Hall, 2002). Pflanzen mit der Fähigkeit auf schwermetall-belasteten Böden zu überleben und zu wachsen werden als tolerant bezeichnet (Macnair et al., 2000). Solche Pflanzen sind häufig in der Lage erstaunliche Mengen an Schwermetallen zu speichern. Diese besondere Eigenschaft der Hyperakkumulation wird auf dem Gebiet der Phytoremediation genutzt und könnte in Zukunft von großer ökonomischer Bedeutung für die Reinigung kontaminierter Böden sein (Chaney et al., 1997).

Es gibt eine Reihe von Strukturen in pflanzlichen Zellen, die direkt oder indirekt an der Aufnahme, dem Transport oder der Speicherung von Metallen beteiligt sind.

Die Zellwände der Wurzeln werden direkt mit den Metallen im Boden konfrontiert. Die meisten Zellwand-gebundenen Schwermetalle sind an Polygalakturonsäuren gebunden. Dabei nimmt die Affinität der einzelnen Schwermetalle in der Reihenfolge  $Pb > Cr > Cu > Ca > Zn$  ab (De Vos et al., 1991; Ernst et al., 1992).

Die Untersuchung von Wurzel-Homogenaten sensitiver und toleranter *Agrostis tenuis* Klone ergab, dass die höchsten Zn-Konzentrationen in den Zellwand-Fractionen liegen. Dabei können die Zellwand-Fractionen der toleranteren Klone deutlich mehr  $^{65}Zn$  akkumulieren, als die sensitiven Klone. Das Entfernen der Zellwand-Fractionen führt zum Anstieg der  $^{65}Zn$ -Konzentrationen in den anderen Fractionen. Turner und Marshall (1971) nahmen an, dass die Zn-Toleranz in *Agrostis tenuis* zum Teil von der Beschaffenheit der Zellwände abhängig ist. Bringezu et al. (1999) zeigten, dass die Zellwände von Epidermiszellen der schwermetall-toleranten *Silene vulgaris* Schwermetalle (wie Fe, Ni, Cu, Al, Sn und Zn) über Proteine oder Silikate binden. Aufgrund der begrenzten Bindungskapazität der Zellwände ist aber nur von einem beschränkten Einfluss dieser auf die SM-Toleranz auszugehen.

Einige Pflanzen besitzen nicht nur die Fähigkeit Phytosiderophore oder Protonen zur leichteren Aufnahme essentieller Metalle zu exkretieren, sondern auch Verbindungen wie Citrat, Malat oder Histidin ausscheiden, um SM-Ionen außerhalb der Pflanze zu komplexieren und somit die Konzentration dieser Metalle innerhalb des Organismus so gering wie möglich zu halten (Salt et al., 2000; Ma et al., 2001c).

Die Plasmamembran ist die erste „lebende“ Struktur der Zelle und stellt somit eine wichtige Barriere für die Aufnahme von Schwermetall-Ionen in die Zelle dar. Erhöhte Mengen an Schwermetallen wie  $\text{Cu}^{2+}$  führen zu einem erhöhten Ausstrom von Ionen aus der Zelle.  $\text{Cu}^{2+}$ -induzierte  $\text{K}^+$ -Ausströme wurden in den Wurzeln von *Agrostis capillaris*, *Silene vulgaris* und *Mimulus guttatus* beobachtet (Ernst et al., 1992). Die Zerstörung der Plasmamembran durch Oxidation, Hemmung von Schlüsselproteinen oder strukturelle Veränderung von Membranlipiden wird als Primäreffekt toxischer Kupfer-Ionen angesehen (De Vos et al., 1989). Neben Kupfer beeinflusst auch Cadmium die Membranpermeabilität durch strukturelle Veränderung der Lipide. Zudem konnte gezeigt werden, dass Cadmium die ATPase-Aktivität der Plasmamembran in Wurzeln von *Helianthus annuus* und *Triticum aestivum* reduziert (Fodor et al., 1995). Die Fähigkeit zum Schutz der Plasmamembran bzw. der Funktion membranständiger Proteine vor einer Zerstörung durch SM-Ionen könnte daher zur Erhöhung der Toleranz beitragen (De Vos et al., 1991; Meharg, 1993). Das Verhindern des Eindringens toxischer Ionen in die Zelle oder ein erhöhter Ausstrom solcher Ionen aus den Zellen wären weitere mögliche Funktionen der Plasmamembran bei der Toleranz (Meharg, 1993).

Phytochelatine werden von einer Reihe von Elementen, u.a. einigen Schwermetallen induziert (Grill et al., 1987; Zenk, 1996; Rauser, 1999; Cobbett, 2000; Goldsbrough, 2000). Sie bilden Komplexe mit den sie induzierenden Metall-Ionen (Rauser, 1995). Phytochelatine sind Peptide mit der allgemeinen Struktur  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  ( $n= 2-11$ ) (Grill et al., 1985). Die Synthese von Phytochelatinen erfolgt nicht-translational aus reduziertem Glutathion (GSH) durch die PC-Synthase (Grill et al., 1989; Rauser, 1995). Die PC-Synthase wird in Gegenwart von Metallionen aktiviert (Cobbett, 2000). Die Gene für die PC-Synthase wurden mittlerweile in Hefe, *Arabidopsis* und in *Caenorhabditis elegans* identifiziert (Clemens et al., 1999, 2001; Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999, 2001). Die Analyse von Mutanten gibt den besten Beleg, dass Phytochelatine eine zentrale Rolle bei der Detoxifizierung von Schwermetallen spielen. *Arabidopsis*-Mutanten, die keine Phytochelatine bilden (*cad1*), können im Gegensatz zu den Wildtypen, bereits bei einer Konzentration von  $0,6 \mu\text{M Cd}^{2+}$  nicht mehr wachsen (Howden et al., 1995). Pflanzen, die auf schwermetall-belasteten Böden wachsen, reagieren ebenfalls mit einer PC-Produktion (Grill et al., 1988a). Andererseits scheint der Unterschied in der Metall-Toleranz verschiedener Ökotypen von *Silene vulgaris*

und *Arabidopsis thaliana* nicht auf unterschiedlich starke PC-Bildung zurückzuführen sein, sondern von anderen Faktoren abzuhängen (Schat & Kalff, 1992; Harmens et al., 1993; Murphy & Taiz, 1995).

Diskutiert wird auch die Funktion von Phytochelatinen in der Homöostase von essentiellen Schwermetallen. Phytochelatine werden als Reaktion auf  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  gebildet und stellen einen zellulären Zwischenspeicher für diese Ionen dar (Grill et al., 1988b). Wenig untersucht ist die Wechselwirkung mit der PC-Vorstufe Glutathion (GSH). GSH liegt in Pflanzen in relativ hohen Konzentrationen vor. Es ist ein wichtiges Antioxidans und spielt eine Rolle bei der Detoxifizierung von Xenobiotika. Die Produktion von Phytochelatinen führt zur Abnahme von GSH (Grill et al., 1987) und zu oxidativem Stress (De Vos et al., 1992).

Neben den Phytochelatinen gibt es eine weitere Gruppe cysteinreicher metallbindender Peptide in Pflanzen, die Metallothioneine (MT). Metallothioneine binden Metallionen als Metall-Thiolat-Kluster (Hamer, 1986). Generell werden sie in zwei Gruppen unterteilt. MT-I haben eine hohe Homologie zu Säugetier-Metallothioneinen. MT-II besitzen ähnlich wie MT-I viele Cysteine, aber ihre Verteilung ist nicht homolog zueinander oder zu MT-I (Prasad, 1999). Das erste Metallothionein, welches aus Pflanzen isoliert wurde, ist das  $E_c$ -Protein aus Weizen (Lane et al., 1987). Mittlerweile gibt es mehr als 50 metallothionein-ähnliche Sequenzen, die in verschiedenen Pflanzen gefunden wurden (Rauser, 1999). In *Arabidopsis* wurden allerdings neben den Metallothioneine der Klasse 1 und 2 noch weitere Typen (MT3, MT4) gefunden (Goldsbrough, 2000). Neben einer Induktion von Metallothioneine nach Behandlung mit Hormonen, Kälte, osmotischem Stress oder hohen Temperaturen, erfolgt auch nach Metall-Exposition eine Erhöhung der MT-Konzentration (Rauser, 1999). Allerdings ist die genaue Bedeutung von Metallothioneinen für die SM-Detoxifikation in Pflanzen noch weitgehend unklar (Zenk, et al., 1996; Schat et al., 2000; Cobbett & Goldsbrough, 2002).

Organische Säuren insbesondere Citrat, Malat oder Oxalat sind in verschiedenen SM-Toleranz-Mechanismen involviert, da sie die Fähigkeit besitzen, toxische SM-Ionen zu komplexieren (Rauser, 1999; Clemens, 2001). Die Bindung von Metall-Ionen durch organische Säuren unterstützt den Transport der Ionen durch das Xylem oder in die Vakuole (Clemens, 2001).

Organischen Säuren tragen wesentlich zur Detoxifizierung von  $\text{Al}^{3+}$  bei. So scheiden u.a. *Triticum aestivum* Malat, *Zea mays* Citrat und *Fagopyrum esculentum* Oxalat in Gegenwart von  $\text{Al}^{3+}$  aus. Anhand von Deletionsmutanten Al-toleranter Weizenlinien (*Triticum aestivum*) konnten Papernik und Mitarbeiter (2001) zeigen, dass drei genetische Loci für die Al-Toleranz verantwortlich sind. Diese führen gleichzeitig zu einer deletionsabhängigen Reduktion des Malat-Ausstroms. Unter Anwendung der Patch-Clamp-Technik konnte gezeigt werden, dass der Transport organischer Säuren durch die Plasmamembran über Anionen-Kanäle erfolgt (Ryan et al., 1997). Zhang und Mitarbeiter (2001) fanden Malat-

permeable Kanäle, die durch Aluminium induziert werden. In Weizen wurden Al-induzierte Kanäle gefunden, durch die Malat passieren kann. Ähnliche Kanäle wurden in der Plasmamembran apikaler Wurzelzellen von Al-toleranten Mais-Pflanzen gefunden (Pineros & Kochian, 2001; Kollmeier et al., 2001). Einige Pflanzen-Spezies besitzen auch die Fähigkeit beträchtliche Mengen an Aluminium in ihren Sprossen und Wurzeln zu akkumulieren. Mit Hilfe der  $^{27}\text{Al}$ -NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass in *Melastoma malabathricum* und *Fagopyrum esculentum* Aluminium durch Oxalat komplexiert wird (Watanabe et al., 1998; Ma et al., 1998). In den Blättern von *Arabidopsis halleri* wird Zink vorwiegend durch Malat komplexiert (Sarret et al., 2002). In den Wurzeln fanden Sarret und Mitarbeiter vor allem Zn-Phosphat-Bindungen aber auch Zn-Malat- und Zn-Citrat-Komplexe. In den Blättern von *Thlaspi caerulescens* liegen vermutlich ca. 40 % des vorkommenden Zinks als Zn-Citrat vor (Salt et al., 1999). Zudem zeigten Salt und Mitarbeiter, dass in den Wurzeln von *Thlaspi caerulescens* weniger organische Säuren an der Bindung freier  $\text{Zn}^{2+}$  beteiligt sind, sondern vielmehr Zn-Histidin-Verbindungen gebildet werden. Besonders häufig wird die Aminosäure Histidin in Verbindung mit der Akkumulation von Nickel gebracht. Untersuchungen an der Ni-hyperakkumulierenden Brassicaceae *Alyssum lesbiacum* zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen Beladung von Nickel im Xylem und der Verfügbarkeit von freiem Histidin in den Wurzeln bestehen muss (Krämer et al., 1996; Kerkeb & Krämer, 2003). Organische Säuren sind ebenfalls an der Komplexierung von Nickel beteiligt. In den Blättern der Ni-hyperakkumulierenden Spezies *Thlaspi goesingense* wurden neben zellwandgebundenen Nickel und Ni-Histidin-Verbindungen auch Ni-Citrat-Komplexe bestimmt (Krämer et al., 2000). Andere Aminosäuren wie z.B. Nicotianamin (NA) sind auch am Metall-Transport in der Pflanze beteiligt. Physiologische Untersuchungen unterstützen die Annahme, dass NA für die Umverteilung von Eisen, Zink und Mangan über das Phloem notwendig ist (Stephan et al., 1994). Zudem scheint NA für den Transport von Kupfer im Xylem erforderlich zu sein (Pich & Scholz, 1996). Anhand von Microarray-Analysen konnte gezeigt werden, dass NA vermutlich an der Zn-Homöostase und NAS (Nicotianamin-Synthase) an der Hyperakkumulation von Zink in *A. halleri* beteiligt sind (Becher et al., 2004; Weber et al., 2004).

Neben den Phytochelatinen, den Metallothioneinen und den organischen Säuren gibt es eine Gruppe von Proteinen, die Hitzeschockproteine (HSP), die unter supraoptimalen Temperaturbedingungen des jeweiligen Organismus induziert oder in höheren Konzentrationen exprimiert werden. HSP sind ubiquitär verbreitet und werden entsprechend ihrer molekularen Größe in verschiedene Gruppen unterteilt (Vierling, 1991; Lewis et al., 1999). Mehrere Untersuchungen zeigten, dass HSP auch unter SM-Exposition z.B. in *Armeria maritima*, *Silene vulgaris* und *Lycopersicon peruvianum* synthetisiert werden (Neumann et al., 1994, 1995; Wollgiehn & Neumann, 1999).

Die im Cytoplasma komplexierten oder gebundenen Metallionen, können in bestimmte Kompartimente wie z.B. Chloroplasten oder Mitochondrien transportiert werden, wo sie u.a. als Cofaktoren benötigt werden. Die größte Anzahl der Ionen wird aber in die Vakuole exkretiert und dort akkumuliert.

Pflanzen, die im Gegensatz zu tierischen Organismen nur im begrenzten Maß zur Ausscheidung von Stoffen in die Umgebung fähig sind, besitzen die Möglichkeit der inneren Exkretion. Die vakuoläre Speicherung toxischer Metall-Ionen aus dem Cytosol stellt eine der wichtigsten Entgiftungsreaktionen in Pflanzen dar (Vögeli-Lange & Wagner, 1990). Für Cadmium ist eine Akkumulation als Cd-Sulfid in der Vakuole nach der Bildung von Cd-PC-Komplexen im Cytoplasma und ein anschließender Transport über ABC-Transporter und  $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$  Antiporter nachgewiesen worden (Salt & Rauser, 1995; Rea et al., 1998). Der Austausch von SM-Ionen gegen Protonen durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ - und  $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ - Antiporter konnte auch in Haferpflanzen gezeigt werden (Brune et al., 1995; Gries & Wagner, 1998). In verschiedenen Arbeiten wurde die Bedeutung der Kompartimentierung von Schwermetallen in der Vakuole für die Cd- und Zn-Toleranz herausgestellt. Aufnahmeuntersuchungen zur Lokalisation von  $\text{Zn}^{65}$  in den Blättern von Gerste führten zu einer schnellen Kompartimentierung des Elements in die Vakuole (Brune et al., 1994). In *Arabidopsis halleri*, einem Zn-Hyperakkumulator, werden die höchsten Zn-Konzentrationen in den Vakuolen des Palisadenparenchyms gefunden (Küpper et al., 2000; Zhao et al., 2000). Vergleichende Untersuchungen an *Silene vulgaris* zeigten, dass das Transportsystem im Tonoplasten toleranter Zelllinien sich von dem sensitiver Linien unterscheidet und für eine höhere Akkumulation von Zink verantwortlich ist (Chardonens et al., 1999).

Die Komplexierung in den Vakuolen erfolgt durch Bindung an organische Säuren oder phenolische Verbindungen (Wang et al., 1992; Van Steveninck et al., 1990, 1994; Neumann et al., 1995).

### 1.2. Das “*beneficial element*” Silizium

Silizium (Si) ist mit etwa 20 % nach Sauerstoff das am häufigsten vorkommende Element in der Erdkruste. Der größte Teil liegt aber als feste, unlösliche Mineralsubstanz vor und ist für die Pflanze nicht zugänglich. Die Verfügbarkeit von Silizium ist von der chemischen Struktur der Si-Verbindung und der Konzentration in der Bodenlösung abhängig. In der Bodenlösung liegt Silizium oft als Kieselsäure  $\text{Si}(\text{OH})_4$  vor und kann in dieser Form die pflanzlichen Membranen passieren. Der Transport in die Blätter erfolgt hauptsächlich über das Xylem mit

dem Transpirationsstrom (Raven, 2001). In der Pflanze wird der größte Teil der aufgenommenen Kieselsäure als amorphes Silizium (Phytolithe, Pflanzensteine) in den Zellwänden und Interzellularräumen abgelagert (Epstein, 1999). Besonders am Ende des Xylems, in den Blattepidermiszellen werden häufig Si-Niederschläge gefunden (Sangster & Hodson, 1986). Die Menge des aufgenommenen Siliziums variiert in Pflanzen unter gleichen Bedingungen beträchtlich (Jones & Handreck, 1967). Aufgrund unterschiedlicher Si-Konzentrationen in den Blättern von Kulturpflanzen erfolgt eine Einteilung in drei Gruppen. Zur ersten Kategorie gehören Pflanzen aus der Familie der Gramineae (z.B. Reis), die auf Feuchtböden wachsen und in den Blättern zwischen 10-15 % des Trockengewichtes an Silizium enthalten. In den Blättern dieser Pflanzen ist die Si-Konzentration oft höher als in der Bodenlösung. Pflanzen, welche in diese Kategorie fallen, besitzen möglicherweise aktive Mechanismen zur Aufnahme von Silizium. Zur zweiten Gruppe gehören Gramineae (z.B. Hafer, Roggen) die auf Trockengebieten vorkommen. Die Blätter dieser Pflanzen enthalten zwischen 1-3 % Silizium im Trockengewicht. Gramineae dieser Gruppe scheinen Silizium passiv aufzunehmen. In die dritte Gruppe fallen vor allem dikotyle Pflanzen mit weniger als 1% Silizium im Trockengewicht. Es wird angenommen, dass diese Pflanzen die Aufnahme von Silizium verhindern (Jones & Handreck, 1967; Hodson & Evans, 1995). Aus welchem Grund es zu solchen enormen Differenzen in der Si-Aufnahme vor allem zwischen den monokotylen und den dikotylen Pflanzen kommt, ist nicht bekannt.

In der allgemein gültigen Einteilung der Elemente in Bezug auf ihre Notwendigkeit für die Pflanzen, zählt Silizium nicht zu den essentiellen Mineralelementen (Marschner, 1995). Verschiedene Untersuchungen belegen aber, dass Silizium zumindest für einige Pflanzen (z.B. Equisitaceae) lebensnotwendig ist und bei vielen Pflanzen wachstumsfördernd wirkt (Werner, 1967a; Miyake & Takahashi, 1983; Sangster & Hodson, 1986; Takahashi et al., 1990; Epstein, 1999; Ma, 2004). In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Silizium entscheidend zur Zellwand-Stabilisierung beiträgt und die Resistenz gegenüber Pilzen und Insekten erhöht.

Pflanzen, die unter Si-armen hydroponischen Bedingungen angezogen werden, zeigen phänotypische „experimentelle Artefakte“, die durch Zugabe von Silizium aufgehoben werden können (Epstein, 1994). Es gibt Arbeiten, in denen gezeigt wird, dass Silizium die Ausbreitung von Mehltau verhindert, der durch die Infektion mit *Sphaerotheca fuliginea* in einer Reihe von Pflanzenspezies verursacht wird. Die Applikation von Silizium zum Medium führt in *Cucumis sativis* nicht nur zu einer erhöhten Si-Konzentration in den Sprossen, sondern gleichzeitig zu einer reduzierten Ausbreitung der Mehltaus (Miyake & Takahashi, 1983). Samuels et al. (1991) zeigten in *Cucumis sativis* Pflanzen ebenfalls eine erhöhte Resistenz gegenüber *Sphaerotheca fuliginea*. Die Erhöhung der Si-Konzentration in der

Nähe der Penetrationsstelle führte zur Abgrenzung des betroffenen Gewebes und damit zur Verhinderung der Ausbreitung des Pathogens. Die Verfügbarkeit von Silizium zum Zeitpunkt des Penetrationsversuches spielt dabei eine entscheidende Rolle. Bereits abgelagertes Silizium ist für die Pflanze in den meisten Fällen nicht mehr remobilisierbar. Die Lignifizierung der Zellen von *Cucumis sativus* Pflanzen unter Pathogenbefall kann durch eine stetige Präsenz von Silizium im Medium erhöht werden (Hammerschmidt & Kuc, 1982). Auch in Erdbeeren kann die Ausbreitung der Mehltau-Krankheit in Abhängigkeit von der Si-Konzentration in den Blättern und demzufolge der Verfügbarkeit von Silizium in der Nährlösung eingeschränkt werden (Kanto, 2002). Ein Si-Mangel in Gerste und Weizen führt zu spärlichem Wuchs und zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber *Blumeria graminis*, einem weiteren Mehltau-Pilz (Zeyen, 2002).

Neben der Mehltau-Krankheit kann auch die Ausbreitung von anderen Krankheiten durch die Gegenwart von Silizium verringert werden. Reiskulturen die resistent gegen die Trockenfäule (*Xanthomonas oryzae*) sind, enthalten unter gleichen Kulturbedingungen mehr Silizium in Blättern, als sensitive Kulturen (Chang et al., 2002). Kauss et al. (2003) berichteten, dass während der Induktion von SAR (*systemic acquired resistance*) in *Cucumis sativus* die Expression eines Prolin-reichen Proteins erhöht war. Dieses Protein besitzt C-terminale repetitive Sequenzen mit ungewöhnlich vielen Lysin- und Argeninresten. Ein synthetisches Protein, welches von der repetitiven Sequenz abgeleitet wurde, polymerisiert Kieselsäure zu unlöslichem Kieselgel, welches sich in Zellwände zur Stabilisierung einlagern kann. Eine Verstärkung von Zellwänden in Wirtszellen, die vom Pathogen attackiert werden, könnte das Eindringen und demzufolge die Ausbreitung des Pathogens beeinträchtigen.

Neben dem Einfluss von Silizium auf biotische Stressinduktoren, gibt es zudem eine Reihe von Untersuchungen zur Wirkung dieses Elementes unter abiotischen Stresssituationen. Die Transpiration der Blätter erfolgt hauptsächlich über die Stomata, zum Teil aber auch über die Kutikula. Die Ablagerung von Silizium unterhalb der Kutikula könnte unter Wassermangel zu einer Reduktion der Transpiration führen. In Reisrispen erfolgt die Transpiration ausschließlich über die Kutikula. Ma et al. (2001a) stellten eine Reduktion der Transpirationsrate in Reisrispen um ca. 30 % fest, wenn diese mit Silizium behandelt wurden. Phosphor-Mangel in Böden ist eine weltweites Problem. In vielen Pflanzen (z.B. Reis, Gerste) wurden „*beneficial effects*“ des Siliziums unter Phosphatmangel beobachtet. Die Blätter von Reis-Pflanzen, welche unter niedrigen P-Konzentrationen wachsen, weisen in Gegenwart von Silizium deutlich höhere Trockengewichte auf (Ma & Takahashi, 1990a). Hohe N<sub>2</sub>-Konzentrationen in Pflanzen führen zum Umlegen der Halme oder zu erhöhter Krankheitsanfälligkeit. Die Einlagerung von Silizium in die Zellwände von Halmen und Blattspreiten unterstützt deren Stabilität (Ma, 2004). Die Verdickung der Halmwände schützt zudem vor Windumbrüchen. „*Beneficial effects*“ von Silizium wurden auch unter Salzstress

beobachtet. In Gerste erhöht Silizium die Aktivität der Superoxid-Dismutase in Blättern und unterdrückt gleichzeitig die Lipidperoxidation. Zudem stimuliert Silizium die H<sup>+</sup>-ATPase in den Wurzeln. Silizium unterstützt somit die Struktur, Integrität und Funktion der Plasmamembran als Antwort auf die durch Stress verursachten Peroxidation von Membranlipiden (Liang et al., 2002).

Die Gegenwart trivalenter Al-Ionen in der Nährlösung kann in Al-sensitiven Pflanzen-Spezies zu deutlichen toxischen Reaktionen führen. Die Ausscheidung über Ionenkanäle und/oder die interne Detoxifizierung durch organische Säuren tragen wesentlich zur Toleranz gegenüber diesem Metall bei (Watanabe et al., 1998; Ryan et al., 2001; Ma et al., 1998; 2001c). Auch pH-Wert-Erhöhungen unmittelbar an der Wurzelspitze (Dengenhardt et al., 1998), Phosphat-Ausscheidungen (Pellet et al., 1996) oder die Expression bestimmter Gene z.B. das Gen aus Weizen *TaPSS1* welches ein Enzym codiert, dass für die Biosynthese von Phospholipiden verantwortlich ist (Delhaize et al., 1999), werden zur Detoxifizierung von Al<sup>3+</sup> diskutiert. Neben diesen Toleranz-Mechanismen werden auch Al/Si-Interaktionen beobachtet, die im Zusammenhang mit einer erhöhten Al-Toleranz stehen (Barceló et al., 1993; Baylis et al., 1994). Ma et al. (1997) unterstützen die Annahme, dass Silizium durch die Bildung von Al/Si-Komplexen in der Nährlösung auf die Toxizität von Al<sup>3+</sup> mildernd wirkt. Andere Wissenschaftler beobachteten interne Einflüsse des Siliziums in Gegenwart von Al<sup>3+</sup> (Hammond et al., 1995; Corrales et al., 1997; Hodson & Sangster, 1998; Kidd et al., 2001). Kidd et al. (2001) sind der Meinung, dass eine Si-induzierte Ausscheidung von phenolischen Verbindungen in *Zea mays* zu einer Erhöhung der Al-Toleranz führt. Andere *in planta* Effekte des Silizium in *Zea mays* wurden von Wang und Mitarbeitern (2004) beschrieben. Sie beobachteten eine erhöhte Akkumulation von Silizium aus dem Cytoplasma in die Zellwand in Gegenwart von Aluminium und nahmen an, dass der Effekt des Silizium auf die Bildung von Hydroxyaluminiumsilikaten im apoplastischen Raum zurückzuführen ist.

### 1.2.1 Schwermetall-Toxizität und Silizium

Pflanzen, die in der Lage sind auf schwermetallhaltigen Böden zu wachsen, enthalten ungewöhnlich hohe Mengen an Silizium (Neumann et al., 1997a; Bringezu et al., 1999). Einige Befunde sprechen dafür, dass Silizium auch eine Funktion bei der Metall-Entgiftung hat. So wird SM-Stress von einigen Kulturpflanzen besser bewältigt, wenn die Pflanzen zusätzlich mit Silizium versorgt werden.

Die Zugabe von Silizium zum Medium reduziert in Reis die Aufnahme von Mn<sup>2+</sup> (Horiguchi, 1988). In *Vigna unguiculata* bewirkt Silizium eine Reduktion der apoplastischen Mn<sup>2+</sup>-Konzentration (Horst et al., 1999). Neumann et al. (1997b) zeigten in den epidermalen

Zellwänden von Blättern Zn-toleranter *Minuartia verna* Zn-Silikat Ablagerungen. Zudem fanden Neumann et al. (1997a) in Zellwänden, Vakuolen und zwischen Zellwand und Plasmamembran des Blattparenchyms einiger schwermetall-toleranter dikotyle Pflanzen (*Silene cucubalus*, *Thlaspi caerulescens* und *Viola calaminaria*) auffällige kristalline Einschlüsse von SiO<sub>2</sub>. Während SiO<sub>2</sub> vorwiegend im Inneren der Kristalle nachzuweisen war, wurden Kalzium-Silikate und in einigen Pflanzen auch Zinn-Silikate im peripheren Teil des Kristalls detektiert. In schwermetall-toleranten *Arabidopsis halleri* Pflanzen, die auf Zn- und Cd-belasteten Böden wachsen, wurden Colokalisationen von Zink und Silizium im Cytoplasma gefunden (Neumann & zur Nieden, 2001). Neumann und zur Nieden nahmen an, dass Zn-Silikate als vorübergehende Depots für Zink und andere Metalle dienen. Solche Silikate sind instabil, sie wandeln sich langsam in SiO<sub>2</sub> um. Die dabei freiwerdenden Zn-Ionen werden anschließend durch bisher unbekannte Bindungspartner komplexiert und überwiegend in die Vakuole transportiert. Weiersbye-Witkowski et al. (1997) fanden ebenfalls Colokalisationen von Silizium zusammen mit einer Reihe unterschiedlicher Metalle in Läsionen von *Lagenaria sphaerica* Blättern, die durch Infektion mit *Sphaerotheca fuliginea* (Mehltau) induziert wurden.

### 1.3 Germanium das Analogon von Silizium

Germanium (Ge) ist das nächst höhere Element von Silizium in der 4. Hauptgruppe des Periodensystems. Für Diatomeen und Höhere Pflanzen wirkt Germanium bereits in geringsten Konzentrationen toxisch (Werner, 1967a, b). 1970 führte ein Unfall in einer japanischen Fabrik zur Verunreinigung des Wassers mit Germanium. Reispflanzen die in der Nähe angebaut wurden, zeigten daraufhin an den Blattscheiden eine große Anzahl brauner nekrotischer Spots (Takahashi et al., 1990). Einige Untersuchungen zeigen, dass Germanium und Silizium über den gleichen Aufnahmemechanismus in die Pflanze gelangen. Pflanzen, die großen Si-Mengen aufnehmen, zeigen auch eine hohe Aufnahme von Germanium (Takahashi et al., 1976b, c). Die Aufnahme von <sup>68</sup>Ge in Reis nimmt mit steigenden Si-Konzentrationen in der Nährlösung ab (Takahashi et al., 1976a). Werner (1967a) untersuchte die Bedeutung von Silizium in Höheren Pflanzen, indem er Germanium als Hemmstoff einsetzte. Konzentrationen zwischen 15 – 75 µg GeO<sub>2</sub> /ml Nährlösung hemmen das Wachstum von *Sinapis alba*, *Lemna minor*, *Wolffia arrhiza*, *Nicotiana tabacum*, *Zinnia elegans* und anderen Pflanzen. In *Aspergillus niger* wurde das Wachstum unter den gleichen Bedingungen dagegen nicht beeinflusst. Die Toxizität des Germaniums wirkt sich auch auf den Chlorophyllgehalt in *Lemna minor* aus und verhindert das Auswachsen der Seitenwurzeln in *Lycopersicon pimpinellifolium*. Die Hemmwirkung des Germaniums kann

durch Applikation von Silizium in Form von  $\text{Si}(\text{OH})_4$  in *Lemna minor* teilweise aufgehoben werden.

Aufgrund der ähnlichen strukturellen Eigenschaften zu Silizium, scheint Germanium ein idealer Kandidat, um die bis heute unbekannt Mechanismen der Si-Aufnahme in Pflanzen zu studieren. Die Eigenschaft des Germaniums verhalf Ma et al. (2002) eine Mutante von *Oryza sativa* (GR1) zu isolieren, die bedeutend weniger Silizium aufnimmt als der Wildtyp. Die GR1 Mutante zeigt nach Applikation von Germanium keine Bildung brauner nekrotischer Spots, welches als typisches Symptom einer Ge-Toxizität in Reis angesehen wird. Der Vergleich homologer Sequenzen zu Genen, welche für Si-Transporter in *Cylindrotheca fusiformis* kodieren, führte zu keinem Erfolg (Hildebrand et al., 1997). Genetische Analysen ergaben aber, dass das Gen, welches für den Transporter von Silizium in Reis verantwortlich ist, ein dominantes Gen ist (Ma et al., 2002). Die derzeitigen Befunde sprechen zumindest in Diatomeen und monokotylen Pflanzen, wie Reis, für eine kompetitive Hemmung der Si-Aufnahme durch Germanium. Die Existenz solcher Si-Transportsysteme, wie sie in *Cylindrotheca fusiformis* und *Oryza sativa* gefundenen wurden, ist in den Membranen dikotyler Pflanzen fraglich. Im Gegensatz zu Diatomeen und Gramineae ist die Bedeutung des Siliziums in dikotylen Pflanzen wenig untersucht. In Diatomeen stellt Silizium ein essentielles Element dar und Reis-Pflanzen gelten als Si-Akkumulierer. In dikotylen Pflanzen wird dagegen von einer passiven Si-Aufnahme, in Abhängigkeit vom Transpirationsstrom, ausgegangen. Die Frage zur möglichen physiologischen Funktion und eventuellen Wirkungsweise bei der SM-Toleranz in dikotylen Pflanzen ist ungeklärt.

### 1.4 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Über die molekularen Mechanismen, die der SM-Toleranz zu Grunde liegen, ist in Pflanzen wenig bekannt. Silizium ist zwar für einige Diatomeen-Spezies und Equisetaceae-Arten lebensnotwendig, oft wird es aber nicht als essentielles Element in Höheren Pflanzen angesehen. Darüber hinaus gibt es wenig Wissen über eine Beteiligung von Silizium an der SM-Toleranz.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Zusammenhänge zwischen SM-Toleranz und Si-Aufnahme und -Speicherung untersucht werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen sollten Aussagen zur Aufnahme, Verteilung und Akkumulation der Schwermetalle Kupfer und Zink, sowie des Siliziums in den Pflanzen aufzeigen. Zudem sollte untersucht werden, ob Germanium als kompetitiver Inhibitor für die Si-Aufnahme geeignet ist. Im Fall einer solchen

Hemmung der Si-Aufnahme sollten anhand von Ge-Applikationen Erkenntnisse zur Wirkung von Silizium unter Kupfer- und Zink-Stress in den Pflanzen gewonnen werden. Die Verwendung von ATPase-Inhibitoren wie 2,4-Dinitrophenol und Kaliumcyanid sollte weitere Aufschlüsse zum Aufnahmemechanismus des Siliziums geben. Da die SM-Toleranz ein komplexer Prozess ist, sollten auch Kompartimentierung und Speicherung durch andere Mechanismen, wie Komplexierung durch organische Säuren, Aminosäuren, Phytochelatine und Phenole untersucht werden. Als Testsysteme sollten Zellkulturen unterschiedlich schwermetall-toleranter *Silene*-Spezies (*Silene cucubalus*, *Silene jennisensis*) verwendet werden. Zellkulturen haben gegenüber intakten Pflanzen den Vorteil, dass Aufnahme über das Wurzelsystem, Transport in den Spross und Verteilung im Blattparenchym keine Rolle spielen. Sie können aber die intakte Pflanze mit ihren vielfältigen Differenzierungen nicht widerspiegeln. Als weitere Versuchsobjekte sollten zwei nahe verwandte Spezies, *Arabidopsis thaliana* (schwermetall-sensitiv) und *Arabidopsis halleri* (schwermetall-tolerant), verwendet werden. *Arabidopsis halleri* ist eine Pflanze, die auf Cu- und Zn-belasteten Böden wächst und beachtliche Mengen dieser Schwermetalle ohne Schaden speichern kann. Zusammenhänge zwischen SM-Toleranz und Silizium in dikotylen Pflanzen würden wesentlich zur Aufklärung der Mechanismen, die zur Toleranz führen, beitragen. Wenn die positiven Effekte des Siliziums, wie sie bereits in Reis beobachtet wurden, auch auf andere Kulturpflanzen übertragbar sind, könnte der Einsatz von Silizium als Düngemittel zu einer erheblichen Steigerung der Ernteerträge führen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Laborchemikalien von den Firmen Fluka (Buchs SG, Schweiz), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim; Seelze) und Merck (Darmstadt) bezogen. Organische Lösungsmittel und Säuren lieferte die Firma Merck (Darmstadt). Die Inhaltstoffe der Nährmedien wurden von Duchefa (Niederlande), Sigma (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) und Strem Chemicals (U.S.A.) bezogen.

#### 2.1.2 Medien

Tab. 2.1 Herstellung häufig verwendeter Medien (Angaben beziehen sich auf 1 l Gesamtvolumen)

Medium	Zusammensetzung
Linsmaier & Skoog Medium (LS) (Linsmaier & Skoog, 1965)	<u>Mikroelemente:</u> 0,025 mg $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,025 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ; 36,7 mg FeNaEDTA; 6,2 mg $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,83 mg KJ; 16,9 mg $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ; 0,25 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 8,6 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ <u>Makroelemente:</u> 332,02 mg $\text{CaCl}_2$ ; 170 mg $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1900 mg $\text{KNO}_3$ ; 180,54 mg $\text{MgSO}_4$ ; 1650 mg $\text{NH}_4\text{NO}_3$ Vitamine: 100 mg myo-Inositol; 0,4 mg ThiaminHCL Hormone: 0,22 mg 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure; 0,186 mg 1-Naphtyl-essigsäure 30 g Saccharose; pH 6,0
Hoagland Medium (Hoagland & Arnon, 1938)	<u>Mikroelemente:</u> 2,86 mg $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 1,81 mg $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,22 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 80 $\mu\text{g}$ $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ; 16 $\mu\text{g}$ $\text{MoO}_3$ <u>Makroelemente:</u> 115,3 mg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 606,6 mg $\text{KNO}_3$ ; 656,4 mg $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; 240,76 mg $\text{MgSO}_4$ 5 $\mu\text{M}$ Fe-HBED (Chaney, 1988), pH 5,3-5,7
Modifiziertes Hoagland Medium für Wurzel- Wachstums-Assays	<u>Makroelemente:</u> 0,28 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; 0,1 mM $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ; 0,2 mM $\text{MgSO}_4$ ; 0,6 mM $\text{KNO}_3$ 5 $\mu\text{M}$ Fe-HBED 500 mg MES 1 % Saccharose, pH 5,7 (KOH) 1,5 % Gelrite

### 2.2 Kultivierung und Behandlung der Pflanzen

#### 2.2.1 Pflanzenmaterial

Zu Beginn der Arbeit dienten als Untersuchungsobjekte Suspensionskulturen von *Silene cucubalus* und *Silene jenseensis* (von Prof. Toni M. Kutchan, Abteilung Naturstoff-Biotechnologie, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie), die sich durch unterschiedliche Toleranz gegenüber Schwermetallen auszeichnen. Nachdem über einen längeren Zeitraum Probleme mit der Anzucht der Zellkulturen nicht behoben werden konnten, wurde das Versuchssystem gewechselt.

Es wurden Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia (Col-0) und Landsberg erecta (Ler-1)) und der schwermetall-toleranten Art *Arabidopsis halleri* (L.) O'Kane und Al-Shehbaz (früher *Cardaminopsis halleri* (L.) Hayek) benutzt.

Pflanzen und Samen von *Arabidopsis halleri* wurden auf der zink- und kupferhaltigen mittelalterlichen Schlackenhalde Bredelem, in der Nähe von Langelsheim gesammelt.

#### 2.2.2 Anzucht und Vermehrung

##### Suspensionskulturen

Aus bereits vorhandenen Gewebekalluskulturen wurden sterile Zellsuspensionskulturen von *Silene cucubalus* und *Silene jenseensis* unter Schütteln (120 rpm) bei 25 °C im Dunkeln angezogen. Das verwendete LS-Medium (Kap. 2.1.2) wurde wöchentlich erneuert.

##### Pflanzenanzucht

Zur Anzucht der Pflanzen diente ein Substrat aus einem Gemisch gleicher Teile Erde und Sand bzw. Vermiculite (2-3 mm Körnung, Marmullar, Witten). *Arabidopsis halleri* Pflanzen wurden vegetativ über die Generierung von Stecklingen aus einer Mutterpflanze vermehrt. Unter Langtag-Bedingungen (16 h/Tag bei 24 °C und 8 h/Nacht bei 24 °C) wuchsen die Pflanzen in klimatisierten Phytokammern (Percival Scientific, bezogen über CLF Laborgeräte, Emersacker). *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden unter Langtag-Bedingungen zu generativem Wachstum herangezogen. Vegetativ wuchsen die Pflanzen unter Kurztag-Bedingungen (8 h/Tag 23 °C und 16 h/Nacht 21 °C).

### Hydroponische Kulturen

Sterile Samen von *Arabidopsis thaliana* wurden in mit 0,5 %iger Agarose gefüllten 200 µl PCR-Reaktionsgefäßen (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) in der Phytokammer zum Keimen gebracht. Die PCR-Gefäße wurden zuvor am unteren Ende abgeschnitten und in lichtdurchlässige mit Hoagland-Medium gefüllten Behältern platziert.

Stecklinge von *Arabidopsis halleri* wurden ohne Agar herangezogen. Die Bewurzelung erfolgte ebenfalls in lichtdurchlässigen Behältern. Nach 14 Tagen wurden die jungen Pflanzen in 1,5 l Hydrokulturtöpfe (3 Pflanzen pro Topf) überführt. Das Medium wurde wöchentlich gewechselt.

### Oberflächensterilisation von Samen

Samen wurden in 70 % (v/v) Ethanol für 2 min gewaschen und anschließend für 15 min mit einer 6 %igen (v/v) Natriumhypochloridlösung / 0,2 % (v/v) Tween<sup>®</sup>20 behandelt. Nach Entfernen der Hypochloridlösung wurden die Samen mindestens sechsmal in sterilem Wasser gewaschen.

### Wurzel-Wachstums-Assays

Oberflächensterile *Arabidopsis thaliana* Samen wuchsen auf Minimal-Hoagland-Medium ohne Mikroelemente bei Dauerlicht und 24 °C. Zu vergleichende Pflanzen (Col-0, Ler-1 WT und Ler-1 tt4-Linie) wuchsen auf der gleichen Platte.

#### 2.2.3 Behandlung der Pflanzen

Zu den Zellkulturen, den hydroponisch herangezogenen Pflanzen und den Keimlingen auf Platten wurden die entsprechenden Stammlösungen der in Wasser gelösten Schwermetalle zugesetzt. Die Versuchsdauer betrug für Zellkulturen 5 Tage, für hydroponische Kulturen 7, 10 oder 14 Tage und die Keimlinge auf den Platten wuchsen 10 Tage.

Die Endkonzentrationen der Schwermetallsalze in den Medien sind für den jeweiligen Versuchsansatz in Tab. 2.2 zusammengefasst.

**Tab. 2.2 Endkonzentration der Schwermetallsalze**

	Zellkultur	hydroponische Pflanzen	Wachstums-Assay
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	0,1 mM bis 0,5 mM	0,003 mM bis 0,01 mM	-
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	0,25 mM bis 4 mM	0,05 mM bis 2 mM	0,05 M bis 1 mM

Außerdem wurden Stammlösungen reiner Kieselsäure und Germaniumdioxid (in 2% KOH) zum Nährmedium hinzugefügt. Die Endkonzentrationen dieser beiden Substanzen sind in Tab. 2.3 dargestellt.

**Tab. 2.3 Endkonzentration reiner Kieselsäure und Germaniumdioxid**

	Zellkultur	hydroponische Pflanzen	Wachstums-Assay
<b>Si(OH)<sub>4</sub> Kieselsäure</b>	0,05 mM bis 0,15 mM	0,1 mM bis 1 mM	0,25 mM bis 1 mM
<b>GeO<sub>2</sub></b>	-	1 µg/ml bis 50 µg/ml ( $9,5 \times 10^{-3}$ bis 0,478 mM)	0,002 µg/ml bis 50 µg/ml ( $1,9 \times 10^{-5}$ bis 0,478 mM)

Neben den Versuchen zum Schwermetall-Stress und der Aufnahme von Kieselsäure und Germaniumdioxid wurden Untersuchungen zur Aufnahme von Kieselsäure nach Applikation der Hemmstoffe 2,4-Dinitrophenol bzw. Kaliumzyanid an hydroponisch kultivierten Pflanzen durchgeführt. Den Pflanzen wurden die entsprechenden Stammlösungen der Inhibitoren zum Nährmedium zugesetzt. In Tab. 2.4 sind die Endkonzentrationen im Medium zusammengefasst.

**Tab. 2.4 Endkonzentration der Hemmstoffe 2,4-Dinitrophenol und Kaliumzyanid**

	Zellkultur	hydroponische Pflanzen	Wachstums-Assay
<b>2,4-DNP</b>	-	$10^{-4}$ mM bis $10^{-3}$ mM	-
<b>KCN</b>	-	$10^{-4}$ mM	-

### 2.2.4 Aufarbeitung des Versuchsmaterials

Die Zellen der Suspensionskulturen wurden durch Filtration vom Nährmedium getrennt, ca. 5 min mit 0,01 M Na<sub>2</sub>-EDTA und anschließend mit deionisiertem Wasser gewaschen, um

adsorbierte Schwermetall-Ionen zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei  $-70\text{ °C}$  gelagert.

Hydroponische Kulturen wurden in Spross und Wurzeln getrennt und die Wurzeln  $1 \times 20\text{ min}$  in  $0,01\text{ M Na}_2\text{-EDTA}$  und  $3 \times 20\text{ min}$  in deionisiertem Wasser gewaschen. Spross und Wurzeln wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-70\text{ °C}$  aufbewahrt.

Bei den Keimlingen auf den Platten wurden die Wurzeln gemessen, gegebenenfalls von den Keimblättern der Chlorophyllgehalt bestimmt.

### 2.3 Allgemeine Methoden

#### 2.3.1 Chlorophyllbestimmung

Für die Extraktion der Pigmente aus gemörsertem Pflanzenmaterial wurden  $5\text{ ml } 80\% \text{ (v/v)}$  Aceton verwendet. Die weitere Homogenisierung erfolgte mit einem Ultra-Turrax (Jahnke & Kunkel, Staufen). Anschließend wurde das Zellmaterial unter Schütteln für mindestens  $1\text{ h}$  extrahiert (bis zur Farblosigkeit des Extraktionsmaterials).

Der Extrakt wurde bei  $\lambda = 663\text{ nm}$  und  $\lambda = 646\text{ nm}$  spektrophotometrisch gemessen. Die Berechnung der Pigmentgehalte erfolgte nach Lichtenthaler und Wellburn (1983):

$$\text{Chl. a } [\mu\text{g/ml Extrakt}] = 12,21 * \text{OD}_{663} - 2,81 * \text{OD}_{646}$$

$$\text{Chl. b } [\mu\text{g/ml Extrakt}] = 20,13 * \text{OD}_{646} - 5,03 * \text{OD}_{663}$$

$$\text{Pigmentgehalt } [\text{mg/g}] = \text{Aceton } [\text{ml}] * \text{Pigmentgehalt } [\mu\text{g/ml Extrakt}] / \text{Einwaage } [\text{mg}]$$

#### 2.3.2 Mikrowellenaufschluss

Gefriergetrocknete Proben (Zellkulturen bis  $200\text{ mg}$ , Blattmaterial  $40\text{ mg} - 100\text{ mg}$ , Wurzelmaterial  $20\text{ mg} - 40\text{ mg}$ ) wurden mit  $1,75\text{ ml Aqua tridest.}$ ,  $3\text{ ml } 65\% \text{ iger HNO}_3 \text{ (v/v)}$  und  $0,2\text{ ml } 40\% \text{ iger Flusssäure (HF) (v/v)}$  versetzt und durch ein mehrstufiges Aufschlussverfahren in der Mikrowelle (microPREP A, MLS) in PTFE-Reaktionsbehältern vollständig in Lösung gebracht. Überschüssige HF in den Proben wurde durch  $1,25\text{ ml } 5\% \text{ ige (w/v)}$  Borsäure komplexiert (Tab. 2.5).

**Tab. 2.5 Grundprogramm „Reaktiv-Organik“ und Komplexierung**

Programmschritt	t (mm.ss)	E (Watt)	T (°C)
Reaktiv-Organik 1	02:30	700	75
Reaktiv-Organik 2	05:30	500	130
Reaktiv-Organik 3	04:00	1000	200
Reaktiv-Organik 4	12:00	1000	200
Komplexierung 1	08:00	1000	160
Komplexierung 2	07:00	1000	160

Nach jedem Probenaufschluss wurden die Reaktionsbehälter in einem weiteren Programm mit 1:20 verdünnter 65 %ige HNO<sub>3</sub> (v/v) gereinigt (siehe Tab. 2.6).

**Tab. 2.6 Reinigungsprogramm**

Programmschritt	t (mm.ss)	E (Watt)	T (°C)
Reinigung 1	10:00	1000	180
Reinigung 2	10:00	1000	180

### 2.3.3 Bestimmung von wasserlöslichem Silizium

Zur Behandlung der Pflanzen und Zellkulturen wurde Kieselsäure über eine Kationenaustauscher-Säule (Dowex 50 (Fluka, Buchs SG; Schweiz) aus Na-Wasserglas gewonnen. Der Austauscher wurde mit 0,1 M HCl aktiviert und mit Aqua dest. neutral gewaschen, bevor eine 1:10 verdünnte Wasserglaslösung aufgegeben wurde. 100 µl des gewonnenen Kieselsäure-Eluates wurden zur Bestimmung der Silizium Konzentration eingesetzt (Silizium-Test *Spectroquant* von Merck (Darmstadt). Das Eluat wurde in 10 ml Wasser (Aqua tridest.) aufgenommen und mit schwefelsaurer Ammoniumheptamolybdatlösung (Si-1A) versetzt. Dabei reagiert wasserlösliches Silizium zu gelber β-Silikomolybdänsäure (pH 1-2). Nach 3 min wurde Weinsäure (Si-2A) zugegeben, welche potentiell vorliegende Phosphorverbindungen zerstört. Die anschließende Zugabe von Photo-Rex®/Bisulfit-Gemisch (Si-3A) führt zur Umwandlung in β-Silicomolybdänblau, dessen Extinktion bei  $\lambda = 820$  nm gemessen wurde. Zur Berechnung der Siliziumkonzentration im gewonnenen Eluat wurde eine Extinktionskurve im Bereich 0,05 mg/l Si bis 5 mg/l Si erstellt. Als Standardlösung diente der Silizium Atomspektroskopie-Standard von Fluka (Buchs SG, Schweiz).

### Bestimmung der Kieselsäurekonzentration im Probenmaterial

Zur Bestimmung der Si-Konzentration wurden 0,25 - 0,5 ml des in der Mikrowelle aufgeschlossenen Probenmaterials (Kap. 2.3.2) mit 10 ml 5 %iger (w/v) Borsäure in 15 ml Greiner-Röhrchen gefüllt und ein neutraler pH-Wert mit 20 %iger (v/v) NaOH-Lösung eingestellt. Nach Zugabe der Spectroquant-Reagenzien (Si-1A bis Si-3A) führt die Anwesenheit von Kieselsäure in der Probe zur Blaufärbung. Die Konzentration konnte mit Hilfe der photometrischen Bestimmung bei  $\lambda = 820$  nm und der Kalibrierungskurve ermittelt werden.

Die ubiquitäre Verbreitung von Silizium erschwert den Nachweis bestimmter physiologischer Funktionen unter Mangelbedingungen. Auch die Minimierung der Si-Konzentration durch Verwendung von ultrareinem Wasser, „suprapuren“ Nährsalzen und PTFE-Gefäßen schließt ein Einbringen von Silizium „nicht aus. Da aber in allen Experimenten Kontrollen mit untersucht wurden, die einen direkten Vergleich ermöglichen, sind Si-freie Bedingungen nicht unbedingt notwendig, um Rückschlüsse auf beobachtete Effekte ziehen zu können.

### 2.3.4 Bestimmung der Gesamtkonzentration von Schwermetallen mittels Atom-Absorptions-Spektrometrie (AAS)

Zur Bestimmung der Zn- und Cu-Konzentrationen im aufgeschlossenen Probenmaterial (Kap. 2.3.2) wurde die Atom-Absorption-Spektrometrie (Analyst 800, Perkin Elmer, Überlingen) im Flammen-Atomisator oder im Graphitrohr-Atomisator eingesetzt.

#### Flammen-AAS

Zur Atomisierung in der Flamme wird die Probelösung über einen Zerstäuber eingesaugt und gelangt als Flüssigkeitströpfchen in die Flamme. Das Aerosol wird am Brennerkopf entzündet und die enthaltene Substanz auf diesem Wege atomisiert. Die Flammen-AAS erlaubt die Bestimmung von Elementkonzentrationen von wenigen  $\mu\text{g/l}$  bis hin in den  $\text{mg/l}$ -Bereich. Der Probenverbrauch liegt normalerweise bei 2 ml Messlösung für die Bestimmung eines Elements. Zink und Kupfer wurden mit der Luft-Acetylen-Flamme bestimmt. Die Gehalte der Elemente wurden mittels Eichkurve im Bereich 0-5  $\text{mg/l}$  bestimmt.

### Elektrothermische Atomisierung

Neben der Flammen-Technik steht die Graphitrohr-Technik mit einer höheren Nachweisempfindlichkeit (ng/l) zur Verfügung. Zudem werden für die Bestimmung im Graphitrohrföfen nur einige  $\mu\text{l}$  Probelösung benötigt. Die Atomisierung erfolgt durch programmiertes Aufheizen der Probe in einer Edelschutzgasatmosphäre (Argon), bei Zink bis 700 °C und bei Kupfer bis 1200 °C. Die Veraschung erfolgt bei einer Temperatur von 1800 °C (Zink) bis 2000 °C (Kupfer). Die Gehalte an Kupfer- und Zink-Ionen wurden mittels einer Kalibrierungskurve im Bereich von 0 - 100  $\mu\text{g/l}$  errechnet.

### 2.3.5 Ermittlung der Germaniumkonzentration mittels ICP-MS

Gefriergetrocknetes Pflanzenmaterial wurde wie bereits unter Kap. 2.3.2 beschrieben, aufgeschlossen und die Germanium-Konzentration mittels ICP-Massenspektrometrie (Gerätetyp: ELAN DRc, Hersteller: Perkin Elmer / SCIEX) bestimmt. Die Messung erfolgte am Umweltforschungszentrum Leipzig/Halle GmbH im Department Analytik und wurde von mir unter Anleitung durch Herrn Dr. Stärk durchgeführt.

Die Probelösung wird über ein pneumatisches Zerstäubersystem in ein induktiv gekoppeltes Argonplasma eingebracht. Bei einer Temperatur von 5000 - 7000 K im Plasma werden die Elemente ionisiert. Die überwiegend einfach positiv geladenen Ionen gelangen durch ein Interface und über ein Ionenlinsensystem in das Hochvakuum des Quadrupol-MS. Ein Quadrupol-MS besteht aus vier Metallstäben, die als Elektroden dienen. Die Ionen werden durch die anliegenden Spannungen (hochfrequente Wechsel- und Gleichspannungen) auf eine spiralförmige Bahn gezwungen. Abhängig von Frequenz und Amplitude der Wechsel- sowie der Gleichspannung können nur Ionen mit einem bestimmten Verhältnis von Masse und Ladung ( $m/z$ ) das Quadrupol passieren. Die Ionen werden mittels eines empfindlichen Detektors nachgewiesen. Zur quantitativen Bestimmung der Konzentration des Germaniums in den Lösungen wurde das Spektrometer mit Germanium-Standardlösungen (1  $\mu\text{g/L}$  bis 10  $\mu\text{g/L}$ ) kalibriert.

### 2.4 Biochemische Methoden und Analytik

#### 2.4.1 Extraktion löslicher phenolischer Verbindungen

Frisches Pflanzenmaterial von *Arabidopsis thaliana* und *Arabidopsis halleri* wurde mit 500 µl 80 %igem (v/v) Methanol unter Zusatz von Zirkonium-Kügelchen ( $ZrO_2$  Ø 1 mm, Biospec Products, U.S.A.) und 100 mM Quercetin als Standard mit einem Bead Beater (Biospec Products, U.S.A.) innerhalb einer Minute homogenisiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (10 min bei 14000 rpm) des Materials. Ein Teil des Überstandes wurde in 200 µl HPLC-Einsätze (Watercorporation, U.S.A.) überführt und im Anschluss wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, chromatographisch aufgetrennt.

#### 2.4.2 Extraktion organischer Säuren

50 mg gemörstertes Pflanzenmaterial wurde mit einem Ultra-Turrax (Jahnke & Kunkel, Staufen) homogenisiert und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur mit 500 µl 80 %igem (v/v) Methanol extrahiert. Nach Zentrifugation (30 min bei 14000 rpm) wurde der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde erneut extrahiert und zentrifugiert. Die methanolischen Extrakte wurden vereint und bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

#### 2.4.3 Analyse von phenolischen Verbindungen mittels HPLC

Die Analyse löslicher phenolischer Verbindungen aus *Arabidopsis*-Blattextrakten erfolgte mittels HPLC (Firma Waters, 2795 separation module) und wurde von Herrn Dr. Baumert, Leibniz-IPB Halle, Abt. Sekundärstoffwechsel, Arbeitsgruppe: Phenylpropanstoffwechsel durchgeführt. Die Umkehrphasen-Chromatographie erfolgte an EC 250/4 Nucleosil 120-5  $C_{18}$ -Säulen der Firma Macherey und Nagel (Düren). Als Laufmittel A wurde 1,5 % (v/v) Phosphorsäure und als Laufmittel B Acetonitril verwendet. Phenolische Verbindungen wurden mit folgendem Gradienten getrennt: innerhalb von 40 min von 10% B (v/v) auf 40% B (v/v) in A bei einer Flussrate von 1 ml/min (Detektion im PDA 2996 bei 330 nm). Retentionszeiten wurden mit dem Standard Quercetin (100 mM) verglichen.

**2.4.4 Gaschromatographie/ Massenspektrometrie**

Die Analyse von organischen Säuren erfolgte mittels Gaschromatographie (GC) in Kopplung mit Massenspektrometrie (MS) und wurde von Dr. Schliemann, Leibniz-IPB Halle, Abt. Sekundärstoffwechsel, Arbeitsgruppe: Biochemie der Mykorrhiza, durchgeführt. GC-MS-Messungen mit Elektronenstoß-Ionisation wurden auf dem Gerät GCT vorgenommen (GC: Agilent 6890, U.S.A., TOF *Time-of-flight*-Analysator-MS: GCT, Waters). In Tab. 2.7 sind die verwendeten Bedingungen aufgeführt.

**Tab. 2.7 GC-MS-Bedingungen**

Ionisation	Elektronenstoß-Ionisation
EI-Voltage	70 eV
Quellen-Temperatur	180 °C
m/z-Bereich	40 - 800
Injektor-Temperatur	250 °C
Injektionsmodus	splitlos (1 µl)

Für die GCT-Analyse wurde eine DB-5 MS Kapillarsäule (30 m x 0,25 mm i.d.; 0,25 µm Filmdicke; J & W Scientific, U.S.A.) verwendet. Als Trägergas wurde Helium bei einem konstanten Fluss von 1 ml/min benutzt. Das verwendete Temperaturprogramm ist in Tab. 2.8 zusammengefasst.

**Tab. 2.8 GC-Temperaturprogramm**

<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
50 °C	2 min isotherm
Gradient 1: 10 °C/min bis 300 °C	25 min
300 °C	10 min isotherm
Gradient 2: 10 °C/min bis 320 °C	2 min
320 °C	11 min isotherm
<b>Laufzeit</b>	<b>50 min</b>

Die Identifizierung der organischen Säuren und Aminosäuren erfolgte durch Vergleich mit den entsprechenden Standardverbindungen. Unter den Analysebedingungen hat Fumarat eine Retentionszeit (RT) von 12,5 min, Serin eine RT von 12,6 min, Malat eine RT von 14,2 min, Pipecolinat eine RT von 14,7 min, γ-Aminobuttersäure (GABA) eine RT von 14,8 min und Citrat eine RT von 18,0 min.

### 2.4.5 Analyse von Thiolen mittels Derivatisierung mit Monobrombiman

20 mg gefriergetrocknetes Material wurde in 2 ml 0,1 % TFA bei 4 °C und 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine Eppendorf-Reaktionsgefäß filtriert (0,2 µm) und bei 4 °C aufbewahrt. 250 µl Probenfiltrat wurden in 10 µl 20 mM MBrB (in Acetonitril), und 450 µl 200 mM HEPPS/ 6.3 mM DTPA bei pH 8,2 derivatisiert. Anschließend wurden 300 µl 1 M MSA dazugegeben und die Proben bei 4 °C in lichtgeschützten Eppendorf-Gefäßen aufbewahrt.

Die Trennung der niedermolekularen Monobrombiman-Derivate erfolgte in Anlehnung an Fahey et al. (1981) unter folgenden Bedingungen: (Tab. 2.9, Tab. 2.10)

**Tab. 2.9 HPLC-Bedingungen**

Stationäre Phase	Nucleosil 10C RP 18 (260 x 4 mm)
Mobile Phase	A: 0,05 % TFA in H <sub>2</sub> O B: 0,05 % TFA in Acetonitril
Flussrate	1 ml/ min
Injektionsvolumen	20 µl
Detektion	Fluoreszenz $\lambda_{e_x}$ : 280 nm / $\lambda_{e_m}$ : 480 nm UV/ Vis: 254 nm

**Tab. 2.10 Gradient**

Zeit	A (%)	B (%)
0 min	90	10
13 min	79	21
33 min	65	35
40 min	0	100
50 min	90	10
60 min	90	10

Die Detektion von Cystein, Glutathion und der Phytochelatine erfolgte durch Vergleich mit Standardverbindungen. Unter diesen Bedingungen hat Cystein eine Retentionszeit (RT) von 4 min, Glutathion eine RT von 5,5 min, PC2 eine RT von 12 min und PC3 eine RT von 15,5 min.

**2.5. Elektronenmikroskopische Methoden**

**2.5.1 Fixierung**

Zur Untersuchung der Proben auf morphologischer Ebene wurde das Material chemisch fixiert. Zunächst erfolgte eine Vorfixierung in 3 %igem (v/v) Glutaraldehyd in Phosphatpuffer (pH 7,4). Anschließend wurde das Pflanzenmaterial in 1 %igem Osmiumtetroxid (OsO<sub>4</sub>) in Paladepuffer (Zusammensetzung: 14,7 g Veronal-Na; 9,7 g Natrium-Acetat x 3 H<sub>2</sub>O ad 500 ml dest. Wasser) fixiert, in einer Acetonreihe entwässert und in SPURR's Epoxydharz ERL (Epoxy Resin Low Viscosity; Zusammensetzung: 10 g ERL-4206; 6 g DER-736; 26 g NSA; 0,4 g S1) eingebettet (Spurr, 1969). Alle aufgeführten Arbeitsschritte erfolgten in einem Einbettautomaten (Lynx™ el, Fa. Leica, Bensheim, Deutschland) und sind in Tab. 2.11 zusammengefasst.

**Tab. 2.11 Glutaraldehyd-Osmiumtetroxid-Fixierung**

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Zeit</b>
3% Glutaraldehyd/Phosphatpuffer	120 min
Waschen mit Phosphatpuffer	15 min
Waschen mit Phosphatpuffer	30 min
Waschen mit Phosphatpuffer	60 min
Waschen mit Phosphatpuffer	60 min
1 % OsO <sub>4</sub> /Paladepuffer	60 min
Waschen mit Leitungswasser	20 min
20 % Aceton/Uranylacetat (2 %)	30 min
30 % Aceton	10 min
50 % Aceton	10 min
75 % Aceton	10 min
90 % Aceton	10 min
100 % Aceton	20 min
100 % Aceton	20 min
Aceton/ERL (1:1)	20 min
Aceton/ERL /1:2)	20 min
100 % ERL	60 min
100 % ERL	12 h

Anschließend wurden die Proben in Einbettungsgefäße überführt und für 48 h im Trockenschrank bei 60 °C polymerisiert.

Eingebettete Proben wurden mit einem Diamantmesser der Firma Diatome (Schweiz) an einem Ultramikrotom (Ultracut S, Leica, Bensheim, Deutschland) geschnitten. Die ca. 60 nm ultradünnen Schnitte wurden mit Chloroform gestreckt und anschließend auf Cedukol-befilmte Kupferträgernetze (200 *mesh*) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit einem Transmissionselektronenmikroskop EM912 Omega (Leo, Oberkochen; Deutschland).

### 2.5.2 Kontrastierung der Präparate

Die Trägernetze wurden in einer geschlossenen Kammer, die NaOH-Plätzchen zur Reduzierung des CO<sub>2</sub>-Gehaltes enthielt, auf je einen Tropfen Bleicitratlösung gelegt. Die Bleicitratlösung setzte sich aus 1,5 g Bleiacetat; 1,76 g Natriumcitrat; 30 ml H<sub>2</sub>O und 8 ml frisch zubereitetes NaOH zusammen (Reynolds, 1963). Nach 40 min wurden die Netze mit Aqua tridest. gewaschen und anschließend luftgetrocknet.

### 2.5.3 Probenpräparation zur Elementanalyse

#### 2.5.3.1 Gefrierfixierung

Die Gefrierfixierung erfolgte mit dem Kryojet (JFD 030, Balzers; Liechtenstein). Dazu wurde das Probenmaterial mit einer Rasierklinge in kleine Gewebestückchen geschnitten und zwischen je zwei Trägerplättchen aus Kupfer gelegt. Anschließend wurden die Gewebeproben von zwei Seiten mit einem Propanstrahl (-180 °C) beschossen. Mit dieser Methode werden die notwendigen schnellen Einfriergeschwindigkeiten erreicht, die für die Bildung von amorphem Eis notwendig sind.

Bis zur darauffolgenden Gefriersubstitution wurden die Proben in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

#### 2.5.3.2 Gefriersubstitution

Die Gefriersubstitution der Proben erfolgte im Substitutionsgerät Csauto (Leica, Bensheim; Deutschland). Über einen Zeitraum von 3 Tagen wurde das zu untersuchende Material mit

gekühltem Aceton bei -80 °C substituiert. Danach erfolgte eine langsame Erwärmung des Gewebes um 5 °C pro min bis zum Erreichen der Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben mit Epoxidharz (ERL), wie in Tab. 2.12 ersichtlich, infiltriert.

**Tab. 2.12 Infiltration mit Epoxidharz (ERL)**

<b>Chemische Verbindung</b>	<b>Zeit</b>
Aceton/ERL 2:1	30 min
Aceton/ERL 1:2	30 min
ERL 100 %	60 min
ERL 100 %	14 h

Nach der Infiltration wurde das Material in Einbettungsgefäße überführt und bei 60 °C für 48 h polymerisiert.

### 2.5.4 EDX-Messungen

Für EDX-Messungen wurden ultradünne Schnitte (50-60 nm) des gefriersubstituierten Materials am Ultramikrotom hergestellt. Die ultradünnen Schnitte wurden mit einem Diamantmesser erhalten und anschließend auf unbefilmte Titanträgernetze (200 *mesh*) aufgenommen. Titanetze wurden benutzt, weil sie keine überlappenden Peaks mit den zu messenden Elementen besitzen. Die Ti-Peaks in den Spektren stammen nicht von dem biologischen Material, sondern von den Trägernetzen.

Die Messungen erfolgten an einem Transmissionsmikroskop EM 912 OMEGA (LEO) mit EDX-System (exl II, Oxford Instruments, High Wycombe, Bucks, U.K.) mit einer Spotgröße von 100 nm, einer Beschleunigungsspannung von 80 keV und einem Emissionsstrom von 18 - 20 µA.

### 2.5.5 ESI-Messungen und EEL-Spektroskopie

Der Energieverlust inelastisch gestreuter Elektronen kann in Elektronenmikroskopen mit speziellen Energiefiltern für die Identifizierung von Elementen und deren Bindungspartnern auf subzellulärer Ebene benutzt werden. Die Bilderzeugung mit inelastisch gestreuten Elektronen eines Elementes erlaubt die Dartellung der räumlichen Verteilung dieses

## Material und Methoden

Elementes mit hoher Empfindlichkeit (ESI - Electron Spectroscopic Imaging). Die im Spektrometer aufgetrennten inelastisch gestreuten Elektronen der Elemente einer Probe können als Spektren dargestellt werden (EELS- Electron Energy Loss Spectroscopy). Diese Spektren werden für die Identifizierung der Elemente benutzt. Darüber hinaus enthalten die kantennahen Feinstrukturen Informationen über die Bindungspartner der Elemente und durch Vergleich mit entsprechenden Standards ist eine Identifizierung chemischer Verbindungen möglich. Quantenchemische Rechnungen, welche die EEL-Spektren simulieren, unterstützen die Aussagen.

Für ESI und EELS wurden 30 - 50 nm dicke Schnitte des gefriersubstituierten Materials auf unbefilmte Cu-Trägernetze (200 *mesh*) aufgenommen.

EEL-Spektren und ESI-Bilder wurden von einer SIT TV-Kamera mit einer Energieauflösung von  $\sim 1$  eV erstellt und mit dem Bildverarbeitungssystem ESIVISION (SIS Software GmbH, Münster; Deutschland) bearbeitet. Für die Abbildung der Kupferverteilung wurde die Cu-M<sub>2,3</sub>-Ionisationskante benutzt. ESI-Bilder zur Verteilung von Silizium in der Probe entstanden bei einem Energieverlust im Bereich der Si-L<sub>2,3</sub>-Ionisationskarte. Für die Verteilung von Zink in der Probe wurde die Zn-M-Ionisationskarte benutzt. Zur morphologischen Identifizierung der gemessenen Bereiche wurde bei allen Objekten das entsprechende Bild bei 0 eV (*zero loss image*) aufgenommen. Diese Bilder wurden aufgrund niedriger Kontraste nachträglich mit einem Bildverarbeitungsprogramm (Photoshop, Adobe) bearbeitet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von Kupfer und Zink auf das Wachstum von *Silene*-Spezies

Für die Experimente standen zwei verschiedene *Silene*-Spezies (*S. cucubalus* und *S. jensseensis*) als Zellkulturen zur Verfügung, deren Wachstums- und Toleranzparameter zunächst untersucht wurden. Die Suspensionskulturen wurden wie unter Kap. 2.2.2 beschrieben, kultiviert und über einen Zeitraum von 7 d mit Kupfer oder Zink in den Konzentrationen 0,15 mM Cu<sup>2+</sup> bis 0,5 mM Cu<sup>2+</sup> bzw. 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> bis 2 mM Zn<sup>2+</sup> inkubiert (Kap. 2.2.3). In Tab. 3.1 ist das ermittelte Trockengewicht der *S. cucubalus* und *S. jensseensis* Zellkulturen nach Inkubation mit unterschiedlichen Cu-Konzentrationen und in Tab. 3.2 nach Inkubation mit unterschiedlichen Zn-Konzentrationen dargestellt.

Es wird deutlich, dass die Zellkulturen sehr unterschiedlich auf die beiden Metalle reagieren. *S. jensseensis* toleriert weitaus höhere Cu- oder Zn-Konzentrationen als *S. cucubalus*. Während bei *S. cucubalus* eine signifikante Wachstumshemmung bereits durch 0,15 mM Cu<sup>2+</sup> und 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> erreicht wird, konnte eine eindeutige Beeinträchtigung des Wachstums bei *S. jensseensis* erst nach 1 mM Zn<sup>2+</sup>-Applikation festgestellt werden. Die Zugabe von 0,5 mM Cu<sup>2+</sup> reichte nicht aus, um das Wachstum von *S. jensseensis* signifikant zu hemmen.

**Tab. 3.1: Einfluss von Kupfer (Cu) auf das Zellwachstum**

Bestimmung des Trockengewichtes in mg, Versuchsdauer 7 d, n = 3, MW ± SE

Zellkultur	Kontrolle	0,15 mM Cu <sup>2+</sup>	0,2 mM Cu <sup>2+</sup>	0,3 mM Cu <sup>2+</sup>	0,4 mM Cu <sup>2+</sup>	0,5 mM Cu <sup>2+</sup>
<i>Silene cucubalus</i>	1,05 ± 0,12	0,79 ± 0,08	0,70 ± 0,08	0,56 ± 0,05	0,31 ± 0,10	0,21 ± 0,09
<i>Silene jensseensis</i>	0,56 ± 0,06	0,62 ± 0,08	0,63 ± 0,07	0,56 ± 0,08	0,52 ± 0,08	0,5 ± 0,06

**Tab. 3.2: Einfluss von Zink (Zn) auf das Zellwachstum**

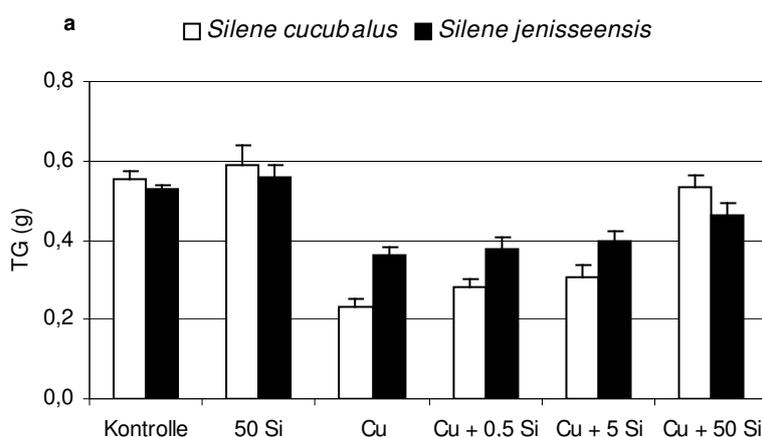
Bestimmung des Trockengewichtes in mg, Versuchsdauer 7 d, n = 3, MW ± SE

Zellkultur	Kontrolle	0,25 mM Zn <sup>2+</sup>	0,5 mM Zn <sup>2+</sup>	1 mM Zn <sup>2+</sup>	1,5 mM Zn <sup>2+</sup>	2 mM Zn <sup>2+</sup>
<i>Silene cucubalus</i>	1,05 ± 0,12	0,72 ± 0,08	0,61 ± 0,08	0,66 ± 0,05	0,42 ± 0,08	0,36 ± 0,09
<i>Silene jensseensis</i>	0,56 ± 0,06	0,55 ± 0,09	0,48 ± 0,05	0,40 ± 0,08	0,37 ± 0,07	0,35 ± 0,05

### 3.2 Einfluss von Silizium auf die Toxizität von Kupfer und Zink

Einige Ergebnisse sprechen dafür, dass Silizium eine Funktion bei der Schwermetall-Entgiftung hat (Williams & Vlamis, 1957; Neumann et al., 1997a, 1999; Horst et al., 1999; Iwasaki, 2002a, b). Es wurde der Einfluss von Silizium unter Cu- und Zn-Stress in beiden *Silene*-Kulturen untersucht (Abb. 3.1 a, b). Für die *S. cucubalus* Zellkultur wurden Schwermetall-Konzentrationen (0,15 mM Cu<sup>2+</sup>, 0,25 mM Zn<sup>2+</sup>) gewählt, die das Wachstum signifikant hemmen. Zur Untersuchung des Einflusses von Silizium auf die Toxizität von Zink und Kupfer wurden bei *S. jensiseensis* 1 mM Zn<sup>2+</sup> und 0,3 mM Cu<sup>2+</sup> verwendet. Bei *S. jensiseensis* konnte durch Applikation von 0,5 mM Cu<sup>2+</sup> keine signifikante Wachstumshemmung beobachtet werden. Es wurde daher 0,3 mM Cu<sup>2+</sup> gewählt, da diese Konzentration im Vergleich zur nächst kleinere Konzentration (0,2 mM Cu<sup>2+</sup>) die größte Wachstumsbeeinträchtigung zeigte (siehe Tab. 3.1; 0,63 mg TG nach Applikation von 0,2 mM Cu<sup>2+</sup>, 0,56 mg TG nach Applikation von 0,3 mg Cu<sup>2+</sup>; Differenz: 0,7 mg TG).

Einen deutlich positiven Einfluss zeigt Silizium bei *S. cucubalus* in Anwesenheit von 0,15 mM Cu<sup>2+</sup> (Abb. 3.1 a). In einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Silizium (0,5 - 50 µg/ml Si) nimmt das Trockengewicht zu und erreicht bei der höchsten applizierten Si-Konzentration nahezu den Kontrollwert (Abb. 3.1 a). In den mit 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> behandelten Kulturen ist der Effekt weitaus geringer. Das Wachstum ist bei einer Konzentration von 50 µg/ml Si kaum verändert im Vergleich zur reinen Zn-behandelten Kultur (Abb. 3.1 b). Für *S. jensiseensis* wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Unter Cu-Stress wird durch die Zugabe von 50 µg/ml Si ein deutlich besseres Wachstum erkennbar, während Silizium unter Zn-Stress kaum einen Einfluss zeigt (Abb. 3.1 a, b).

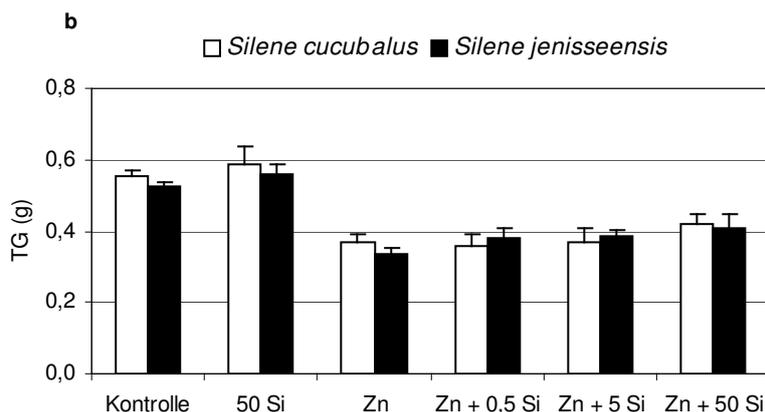


**Abb. 3.1 a:** Einfluss von Silizium (Si) nach Kupfer-(Cu)-Stress

*Silene cucubalus* 0,15 mM Cu<sup>2+</sup>

*Silene jensiseensis* 0,3 mM Cu<sup>2+</sup>

Si (µg/ml); n = 3, MW ± SE



**Abb. 3.1 b:** Einfluss von Silizium (Si) nach Zink-(Zn)-Stress

*Silene cucubalus* 0,25 mM Zn<sup>2+</sup>

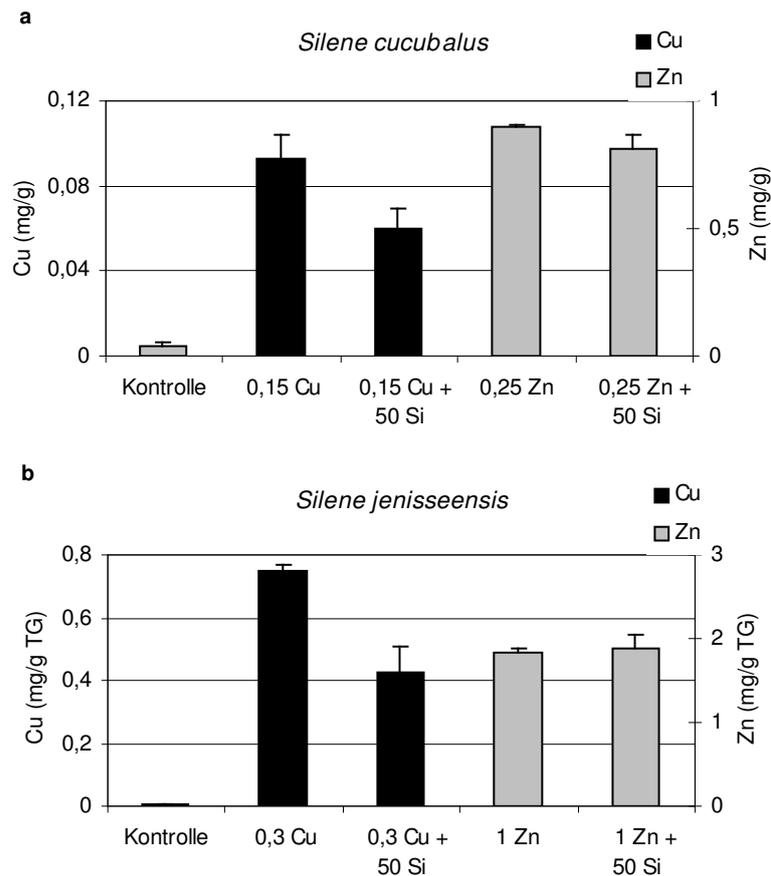
*Silene jennisensis* 1 mM Zn<sup>2+</sup>

Si (µg/ml); n = 3, MW ± SE

### 3.3 Aufnahme von Kupfer und Zink in *Silene*-Spezies

Die Anwesenheit von Silizium begünstigt das Zellwachstum von *Silene* in Gegenwart erhöhter Cu-Ionen (Abb. 3.1 a). Das Wachstum der Zellen in Gegenwart erhöhter Zn-Ionen wird durch Silizium kaum beeinflusst (Abb. 3.1 b). Daher war es von Interesse, Unterschiede in der Aufnahme von Kupfer und Zink in An- bzw. Abwesenheit von Silizium festzustellen. Für die Messungen wurden Proben mit der höchsten Si-Konzentration (50 µg/ml Si) verwendet. Für *S. cucubalus* und *S. jennisensis* wurden die gleichen Schwermetall-Konzentrationen verwendet wie in Kap. 3.2 beschrieben.

Die Aufnahme von Kupfer ist in Gegenwart von 50 µg/ml Si in beiden Zellkulturen deutlich reduziert (Abb. 3.2 a, b). Bei *S. cucubalus* wurden ca. 35 % und bei *S. jennisensis* ca. 45 % weniger Cu-Ionen aufgenommen. Die Aufnahme von Zink wird in beiden Zellkulturen durch die Zugabe von Silizium im Medium bedeutend weniger beeinflusst (Abb. 3.2 a, b). Während für *S. cucubalus* ca. 9 % weniger Zink in Anwesenheit von Silizium gemessen wurde, bleibt die Aufnahme von Zink in *S. jennisensis* in Gegenwart von Silizium nahezu unverändert (101 %). Die Toleranz von *S. jennisensis* gegenüber Kupfer im Vergleich zur sensitiveren *S. cucubalus* wird in diesen Abbildungen besonders deutlich. Bemerkenswert ist die achtfach höher gemessene Cu-Konzentration in *S. jennisensis* im Vergleich zu *S. cucubalus*, obwohl die Cu-Applikation nur doppelt so hoch war (Abb. 3.2 a, b).



**Abb. 3.2 a, b:** Aufnahme von Kupfer (Cu) und Zink (Zn) in *Silene*-Zellkulturen  
a - *Silene cucubalus* 0,15 mM Cu<sup>2+</sup>, 0,25 mM Zn<sup>2+</sup>, 50 µg/ml Si  
b - *Silene jennisseensis* 0,3 mM Cu<sup>2+</sup>, 1 mM Zn<sup>2+</sup>, 50 µg/ml Si  
Analyse der Schwermetalle mittels AAS; n = 3, MW ± SE

### 3.4 Zelluläre Lokalisation von Kupfer, Zink und Silizium

Silizium fördert das Wachstum der beiden *Silene*-Zellkulturen in Gegenwart erhöhter Cu-Ionen durch eine reduzierte Aufnahme von Kupfer. Zellwachstum und Zn-Aufnahme in Gegenwart erhöhter Zn-Ionen werden durch Si-Applikationen kaum beeinflusst.

Um mögliche Unterschiede in der Lokalisation der Elemente Kupfer, Zink und Silizium wurden vergleichende Untersuchungen mit den beiden *Silene*-Zellkulturen durchgeführt. Die Analysen zur Lokalisation der Elemente basieren auf Besonderheiten in der Ultrastruktur und in der Verteilung bzw. der Speicherung der Elemente in den einzelnen Kompartimenten der Zelle.

### 3.4.1 Ultrastrukturelle Untersuchungen

Zunächst wurden beide Zellkulturen auf Besonderheiten in ihrer Ultrastruktur hin untersucht. Bereits in den Kontrollen von *S. jensseensis* werden deutliche Unterschiede im Vergleich zur weniger Cu- und Zn-toleranten *S. cucubalus* erkennbar. Während bei *S. cucubalus* keine wesentlichen Besonderheiten in den Zellen zu sehen waren (Abb. 3.3 a, b), konnten im Cytoplasma und in den Mitochondrien von *S. jensseensis* elektronendichte Niederschläge beobachtet werden (Abb. 3.3 c). Außerdem waren bis in die Zentralvakuole reichende Invaginationen erkennbar, die von Plasmamembran und Tonoplasten umschlossen sind und membranöse Bestandteile enthalten (Abb. 3.3 d, e). Diese Invaginationen können sich vollständig von der Plasmamembran lösen und liegen dann in der Vakuole als Vesikel vor (Abb. 3.3 f). Die Vesikel, welche vorrangig in den Zellen von *S. jensseensis* gefunden wurden, stellen eine Besonderheit dar, da sie von zwei Membranen, der Plasmamembran und der Tonoplastenmembran, umgeben sind.

### 3.4.2 EDX- Messungen

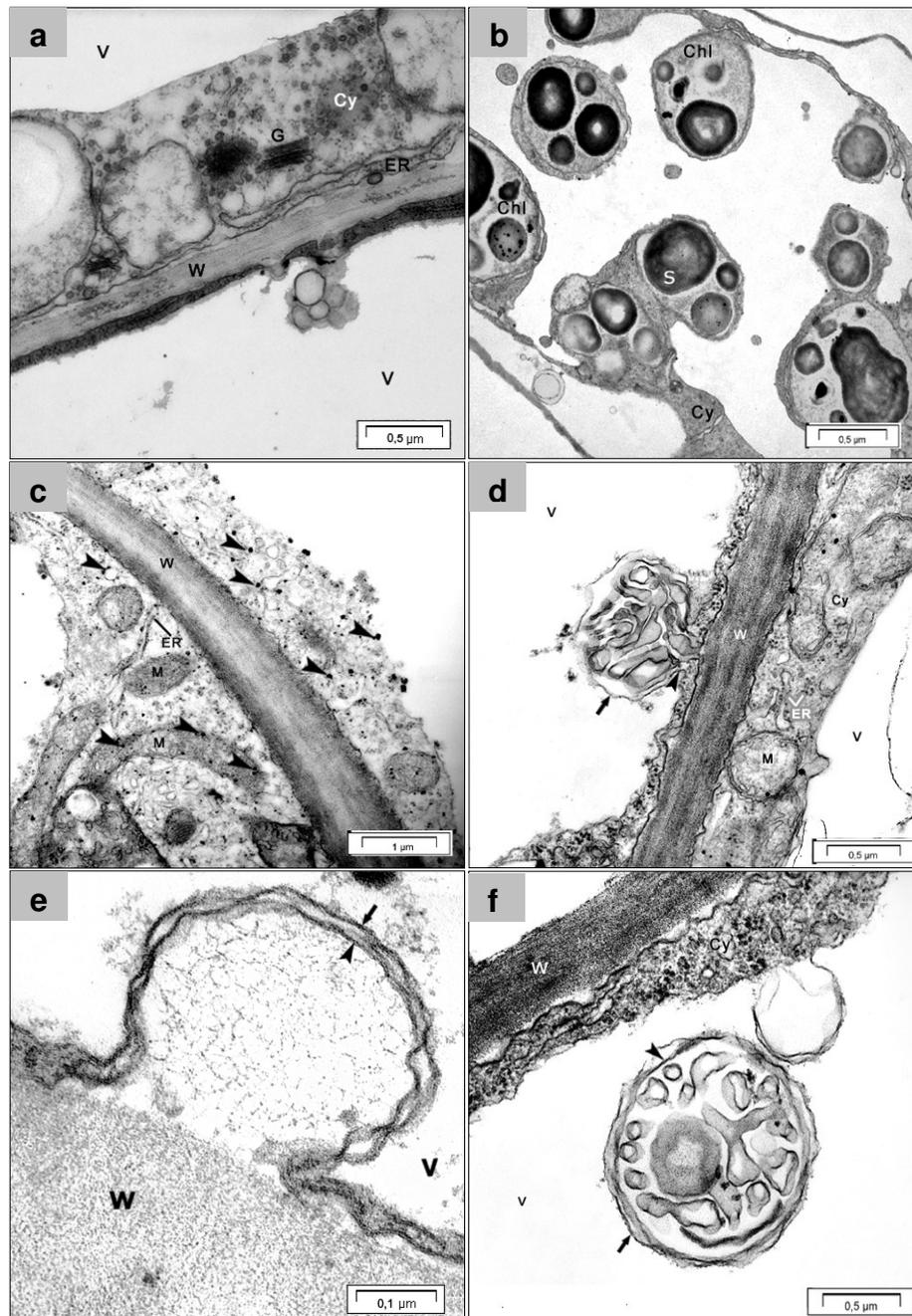
EDX-Messungen geben Auskunft über das Vorhandensein von Elementen in der Zelle. Wegen der sehr großen Vakuolen der Zellkulturen verdünnen sich die Metall-Gehalte in diesem Kompartiment stark und sind durch Punktmessungen nicht nachweisbar gewesen. Die Zellwände der beiden *Silene*-Spezies binden nur sehr geringe Mengen an Kupfer und Zink (Anhang: Abb. 3.41 a - f). Die EDX-Spektren von Zellwänden unbehandelter Zellkulturen zeigen sowohl bei *S. cucubalus* als auch bei *S. jensseensis* keine messbaren Zn-Vorkommen. Kupfer konnte eindeutig in den Zellwänden der *S. jensseensis* Zellkultur nachgewiesen werden (Anhang: Abb. 3.41 a, b). Unter normalen Wachstumsbedingungen waren in den Zellwänden von *S. cucubalus* höhere Si-Mengen als bei *S. jensseensis* detektierbar.

Elektronendichte Niederschläge im Cytoplasma zeigen hingegen deutlich höhere Konzentrationen an Kupfer, Zink und Silizium (Tab. 3.3 - Tab. 3.5). Im Cytoplasma vorkommende Niederschläge unbehandelter Zellkulturen von *S. jensseensis* enthalten mehr Silizium, Kupfer und Zink als die gefundenen Niederschläge im Cytoplasma unbehandelter *S. cucubalus* Zellkulturen (Tab. 3.3, Abb. 3.4 a, b). Die große Schwankungsbreite der Messwerte zeigt die Variabilität der Elementkonzentrationen in den einzelnen Zellen der Zellkultur und ist nicht auf messtechnische Zahlen zurückzuführen

Tab. 3.3: Quantitative EDX-Messungen von *Silene*-Zellkulturen unter Kontrollbedingungen

Anzahl der Zn-Atome im Referenzvolumen (RV)  $\times 10^3$ , Anzahl der Cu-Atome im RV  $\times 10^3$ , Anzahl der Si-Atome im RV  $\times 10^6$ ; n = 15, MW  $\pm$  SE

Zellkultur	Silizium	Kupfer	Zink
<i>Silene cucubalus</i>	7,0 $\pm$ 1,61	5,6 $\pm$ 2,06	4,2 $\pm$ 1,45
<i>Silene jenseensis</i>	12,9 $\pm$ 0,98	8,3 $\pm$ 3,32	5,8 $\pm$ 2,12



**Abb. 3.3 a, b: Ultrastrukturen von *Silene cucubalus* Zellkulturen**

a - Zellbestandteile wie Zellwand (W), Cytoplasma (Cy), Golgi-Apparat (G), Endoplasmatisches Retikulum (ER) und Vakuole (V) sind erkennbar.

b - im Cytoplasma (Cy) lokalisierte Chloroplasten (Chl) im Querschnitt mit Stärkekörnern (S)

**Abb. 3.3 c, d: Ultrastrukturelle Besonderheiten von *Silene jensseensis* Zellkulturen**

c - Elektronendichte Niederschläge im Cytoplasma (Cy) (schwarze Pfeile); M: Mitochondrium, ER: Endoplasmatisches Retikulum, W: Zellwand

d - Invagination mit membranösem Material von Plasmamembran (▲) und Tonoplast (↑) umgeben.

**Abb. 3.3 e, f: Besonderheit von *Silene jensseensis* Zellkulturen**

e - vergrößerte Aufnahme zur Entstehung einer Invagination (Einstülpung), die von Plasmamembran (▲) und Tonoplastenmembran (↑) umschlossen ist.

f - vollständig von der Plasmamembran abgetrennte Invagination. Deutlich zu erkennen sind die Plasmamembran (▲) und die Tonoplastenmembran (↑), welche membranöses Material einschließen.

V: Vakuole, W: Zellwand

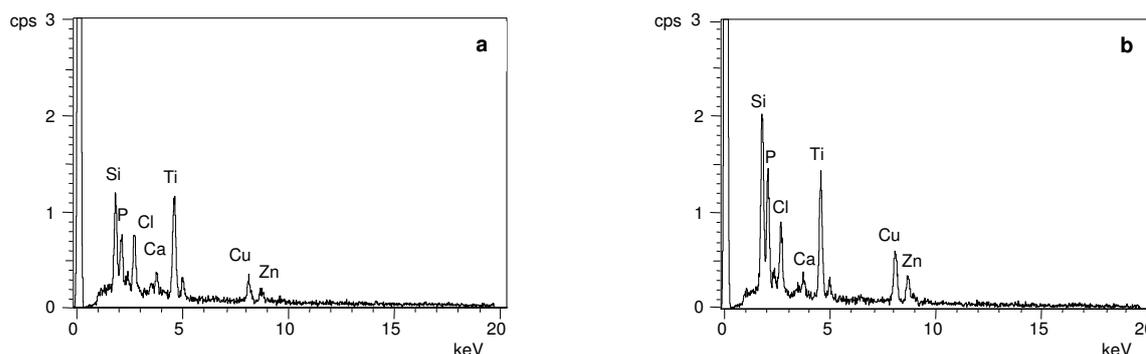


Abb. 3.4 a, b: EDX-Spektren aus dem Cytoplasma von *Silene* unter Kontrollbedingungen

a - *Silene cucubalus*

b - *Silene jensseensis*

Nach Behandlung der Zellkulturen mit Zink wurden erhöhte Ca-, Cl- und Si-Konzentrationen in den im Cytoplasma liegenden Niederschlägen gemessen (Abb. 3.5 a für *S. cucubalus*; Abb. 3.5 b für *S. jensseensis*). Während allerdings die Zn-Konzentration in den Niederschlägen von *S. cucubalus* steigt, wurde in den Niederschlägen der *S. jensseensis* Zellkultur keine signifikante Erhöhung der Zn-Konzentration gefunden. Die quantitative Analyse von 15 gemessenen Niederschlägen aus dem Cytoplasma zeigt, dass die Niederschläge der *S. jensseensis* Zellkultur nach Applikation von Zink deutlich weniger Silizium, Kupfer und Zink enthalten als die Niederschläge der Kontrollen. Die Niederschläge der *S. cucubalus* Zellkultur zeigen hingegen eine leichte Erhöhung der Zn-Konzentration und eine zweifach erhöhte Cu-Konzentration. Die Si-Konzentration ist dagegen leicht reduziert.

Tab. 3.4: Quantitative EDX-Messungen von *Silene* Zellkulturen nach Zn/Si-Stress

(*Silene cucubalus* 0.25 mM Zn<sup>2+</sup>, 50µg/ml Si; *Silene jensseensis* 1 mM Zn<sup>2+</sup>, 50 µg/ml Si)

Anzahl der Zn-Atome im Referenzvolumen (RV) x 10<sup>3</sup>, Anzahl der

Cu-Atome im RV x 10<sup>3</sup>, Anzahl der Si-Atome im RV x 10<sup>6</sup>; n = 15, MW ± SE

Zellkultur	Silizium	Kupfer	Zink
<i>Silene cucubalus</i>	6,0 ± 0,94	11,9 ± 2,66	3,4 ± 1,24
<i>Silene jensseensis</i>	6,0 ± 2,06	5,6 ± 3,39	3,6 ± 2,22

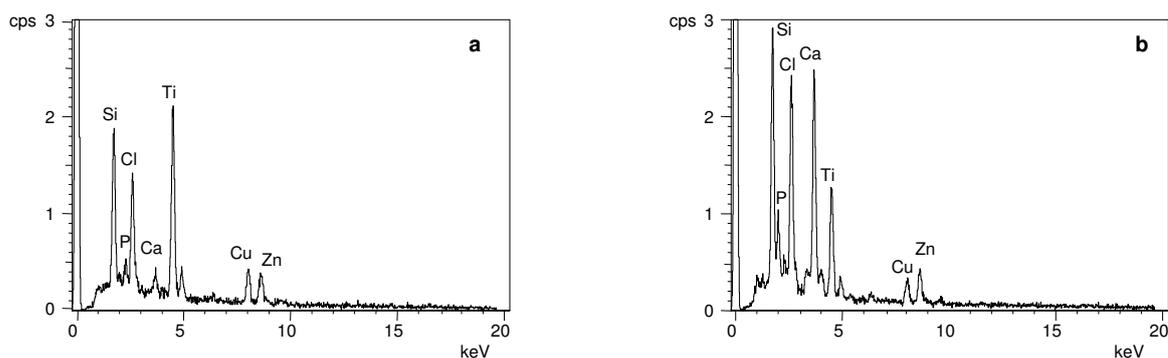


Abb. 3.5 a, b: EDX-Spektren aus dem Cytoplasma nach Zink-Stress

a - *Silene cucubalus*

b - *Silene jensseensis*

Die EDX-Spektren von Niederschlägen aus dem Cytoplasma Cu-behandelter Zellkulturen zeigen sowohl für *S. jensseensis* als auch für *S. cucubalus* eine deutliche Zunahme der Cu-Konzentration (Abb. 3.6 a, b). Das EDX-Spektrum der *S. jensseensis* Zellkultur weist zudem erhöhte Zn-Vorkommen auf. Dies ist allerdings kein allgemeines Auftreten, was quantitative Analysen zeigen (Tab. 3.5). Quantitative EDX-Messungen aus dem Cytoplasma von *S. cucubalus* zeigen nach Cu-Applikation keine wesentliche Veränderung der Si- und Zn-Konzentration, aber eine dreifache Zunahme der Cu-Konzentration. Die Cu-Konzentration der Niederschläge von *S. jensseensis* ist nach Applikation von Kupfer nur um ca. 39 % erhöht. Der Gehalt an Zink ist reduziert. Die Si-Konzentration bleibt wie bei *S. cucubalus* unverändert.

Tab. 3.5: Quantitative EDX-Messungen von *Silene*-Zellkulturen nach Cu/Si-Stress

(*Silene cucubalus* 0.15 mM Cu<sup>2+</sup>, 50 µg/ml Si; *Silene jensseensis* 0.3 mM Cu<sup>2+</sup>, 50 µg/ml Si)

Anzahl de Zn-Atome im Referenzvolumen (RV) x 10<sup>3</sup>, Anzahl der

Cu-Atome im RV x 10<sup>3</sup>, Anzahl de Si-Atome im RV x 10<sup>6</sup>; n = 15, MW ± SE

Zellkultur	Silizium	Kupfer	Zink
<i>Silene cucubalus</i>	7,1 ± 1,44	15,4 ± 6,61	4,0 ± 1,44
<i>Silene jensseensis</i>	12,4 ± 4,08	10,2 ± 3,41	2,8 ± 1,66

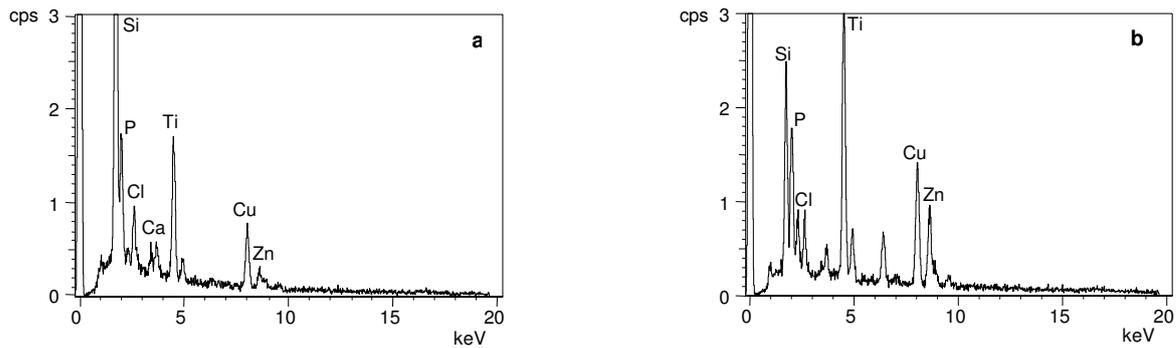


Abb. 3.6 a, b: EDX-Spektren aus dem Cytoplasma nach Kupfer-Stress

a - *Silene cucubalus*

b - *Silene jennisensis*

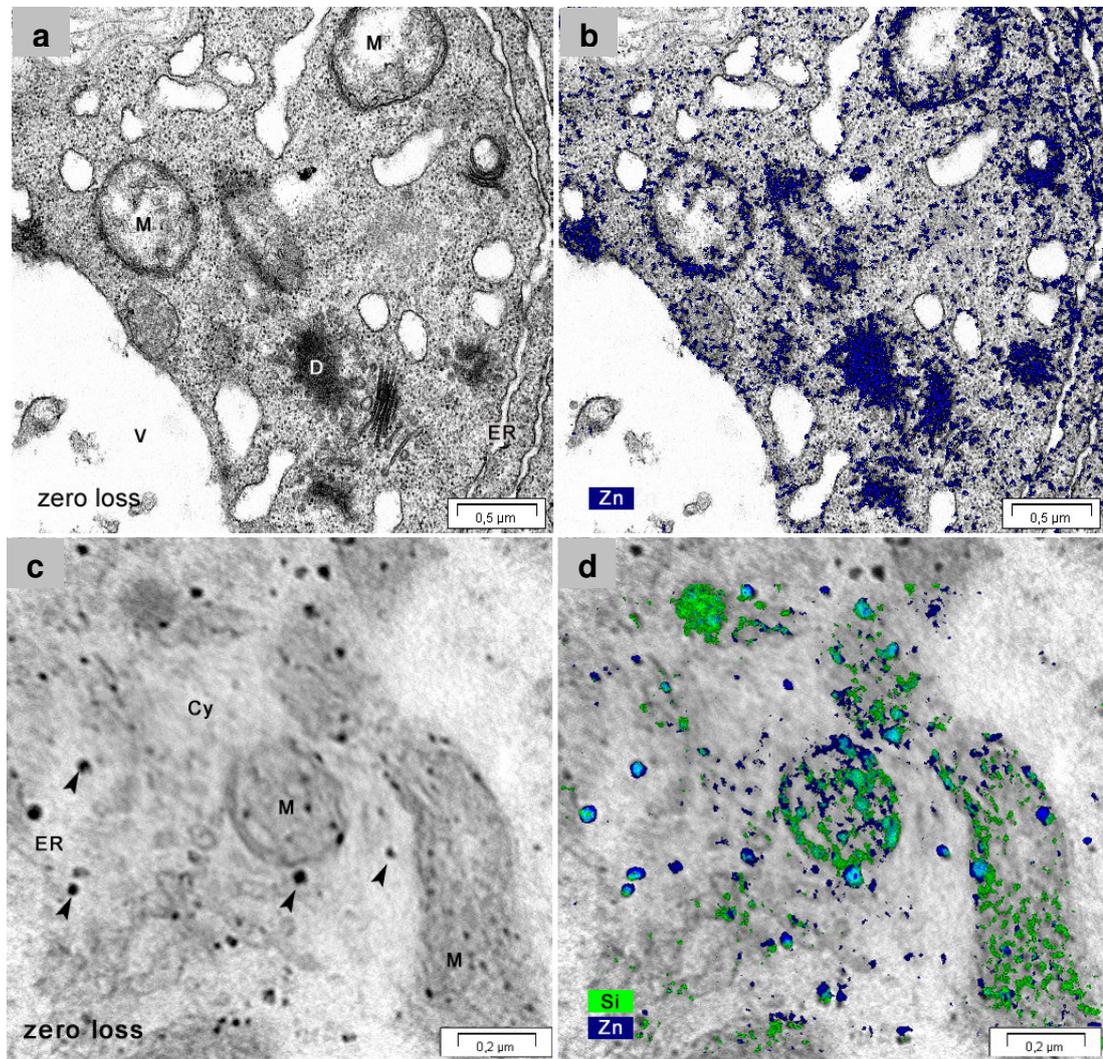
### 3.4.3 Speicherung und Verteilung von Zink und Silizium in der Zelle

EDX-Messungen erlauben als Punktmessungen zwar quantitative Aussagen über die elementare Zusammensetzung sehr kleiner Bereiche in der Zelle, die Verteilung von Elementen kann damit aber nur unzureichend beschrieben werden. Für solche Fragestellungen ist die Verwendung der Elementinformationen inelastisch-gestreuter Elektronen besser geeignet. *Electron Spectroscopic Imaging* (ESI) erlaubt die 2-dimensionale Darstellung der Verteilung eines Elementes in der Zelle und *Electron Energy Loss Spectroscopy* (EELS) gibt Informationen über die Bindungspartner eines Elementes. Quantitative Aussagen sind mit diesen Methoden allerdings nicht möglich.

Im Cytoplasma von *S. cucubalus* Zellen ist nach Behandlung der Zellen mit Zink und Silizium nur Zink (blau) nachweisbar (Abb. 3.7 a, b). Besonders viele Zn-Ablagerungen sind in den Mitochondrien, den Diktyosomen und im endoplasmatischen Retikulum zu finden. Eine Aufnahme von Silizium in die Zellen konnte nicht gefunden werden (Abb. 3.7 b).

Im Cytoplasma und in den Mitochondrien der Zellen von *S. jennisensis* sind nach Applikation von Zink und Silizium verstärkt elektronendichte Niederschläge zu beobachten (Abb. 3.7 c, d). ESI-Bilder geben die Verteilung von Silizium und Zink in diesen Strukturen wieder. Es zeigt sich, dass Silizium (grün) vor allem in den Mitochondrien zu finden ist, während die elektronendichten Strukturen Silizium und Zink (hellblau, durch Überlagerung der Verteilung von Si-grün und Zn-blau) enthalten. EEL-Spektren dieser Niederschläge zeigen an der Si-Kante einen charakteristischen Peak bei 95 eV und an der O-Kante einen Peak bei 540 eV (Abb. 3.8 A, B). Vergleiche mit Zn-Silikat Standards ergaben, dass diese Peaks für Silikate charakteristisch sind. Auffällig ist, dass der Peak bei 95 eV große Intensitätsunterschiede zwischen Standard und biologischer Probe aufweist.

Durch Standards mit hohem und niedrigem Zn-Gehalt kann gezeigt werden, dass die Höhe des Peaks vom Zn-Gehalt der Probe abhängig ist (Abb. 3.8 C). Der Zn-Gehalt der cytoplasmatischen Niederschläge ist offenbar gering.



**Abb. 3.7 a, b:** Verteilung von Zink (Zn) und Silizium (Si) in *Silene cucubalus* Zellkulturen

a - zero loss-Bild

b - ESI-Bild der Zn-Verteilung

Lokalisation von Zn (blau) im Cytoplasma (Cy) insbesondere in den Diktyosomen (D) und den Mitochondrien (M);

V: Vakuole

**Abb. 3.7 c, d:** Verteilung von Zink (Zn) und Silizium (Si) in *Silene jenseensis* Zellkulturen

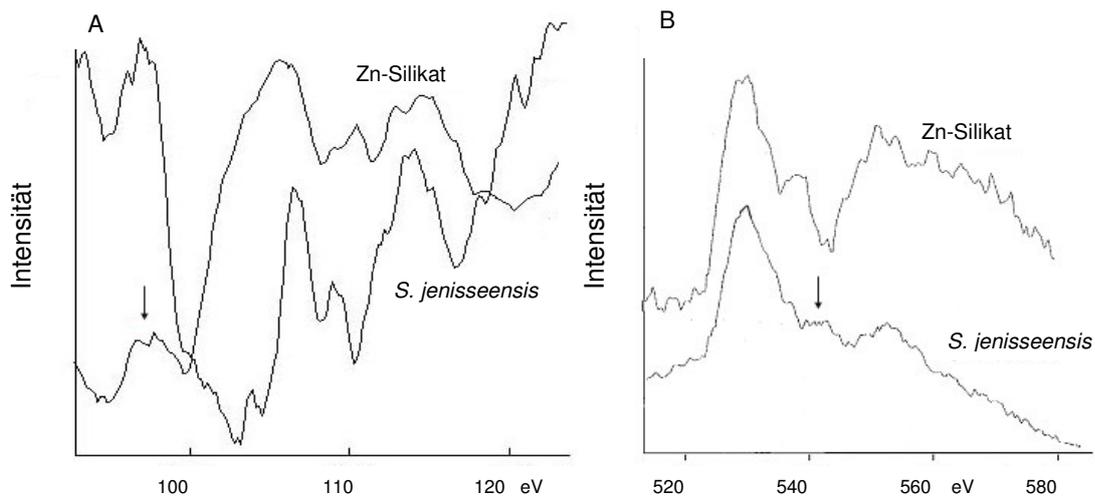
a - zero loss-Bild

b - ESI-Bild zur Verteilung von Zn und Si

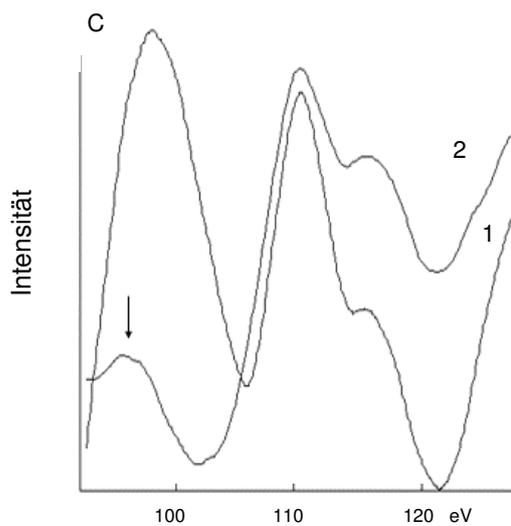
Lokalisation von Si (grün) und Zn (blau) im Cytoplasma (Cy), insbesondere in den Mitochondrien (M)

Das gemeinsame Vorkommen von Zn und Si in den Niederschlägen (Pfeile) ergibt hellblau.

ER: Endoplasmatisches Retikulum



**Abb. 3.8 A, B:** EEL-Spektren von Zn-Silikat-Standard und cytoplasmatischen Niederschlägen von *S. jenniseensis*  
 Die Peaks bei 95 eV und 540 eV (Pfeile) sind charakteristisch für Silikate  
 A - Si-L<sub>2,3</sub> Kante  
 B - O-K Kante



**Abb. 3.8 C:** EEL-Spektren der Si-L<sub>2,3</sub> Kante verschiedener Zn-Silikat Standards  
 1 - niedrige Zn-Konzentration  
 2 - hohe Zn-Konzentration  
 Die Höhe des Peaks bei 95 eV ist vom Zn-Gehalt der Probe abhängig (Pfeil)

In der biologischen Probe sind offenbar nicht alle OH-Gruppen mit Zink substituiert, sodass von folgender Struktur der Niederschläge ausgegangen werden kann (Abb. 3.9).

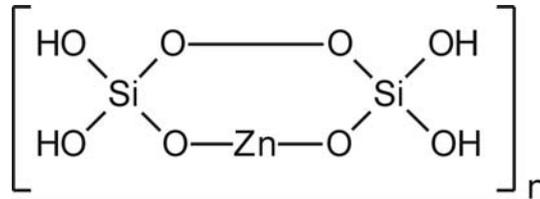


Abb. 3.9: mögliche Struktur des Zn-Silikats in der biologischen Probe (Schwieger et al., 1987)

Auffällige elektronentransparente Strukturen in den Zellwänden von *S. jenseensis* enthalten nur Silizium (Abb. 3.10 a, b). Ein Vergleich der EEL-Spektren dieser Strukturen mit den Spektren von  $\text{SiO}_2$  zeigte Übereinstimmung an der Si-L<sub>2,3</sub> und der O-K-Kante (Abb. 3.11 A, B). Quantenchemische Rechnungen bestätigen diese Aussage (Abb. 3.11 A/3, B/3). Das Kontrastverhalten im Elektronenmikroskop lässt den Schluss zu, dass der Si-Gehalt dieser Strukturen klein sein muss. Es handelt sich offenbar um  $\text{SiO}_2$ -Gele mit hohem Wassergehalt.

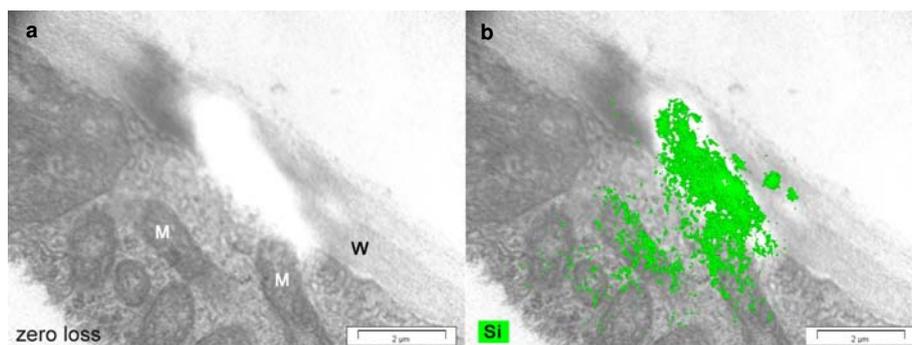
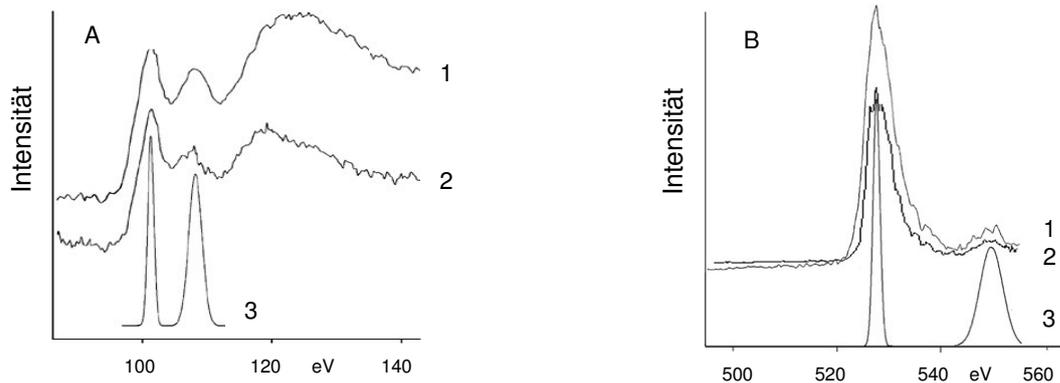


Abb. 3.10 a, b: **Si-Ablagerung in der Zellwand von *Silene jenseensis***  
a - zero loss-Bild  
b - ESI-Bild der Si-Verteilung  
Lokalisation von Si (grün) in der Zellwand (W); M: Mitochondrien



**Abb. 3.11 A, B: EEL-Spektren der Si- L<sub>2,3</sub> Kante (A) und der O-K Kante (B)**

1 - SiO<sub>2</sub>-Standard

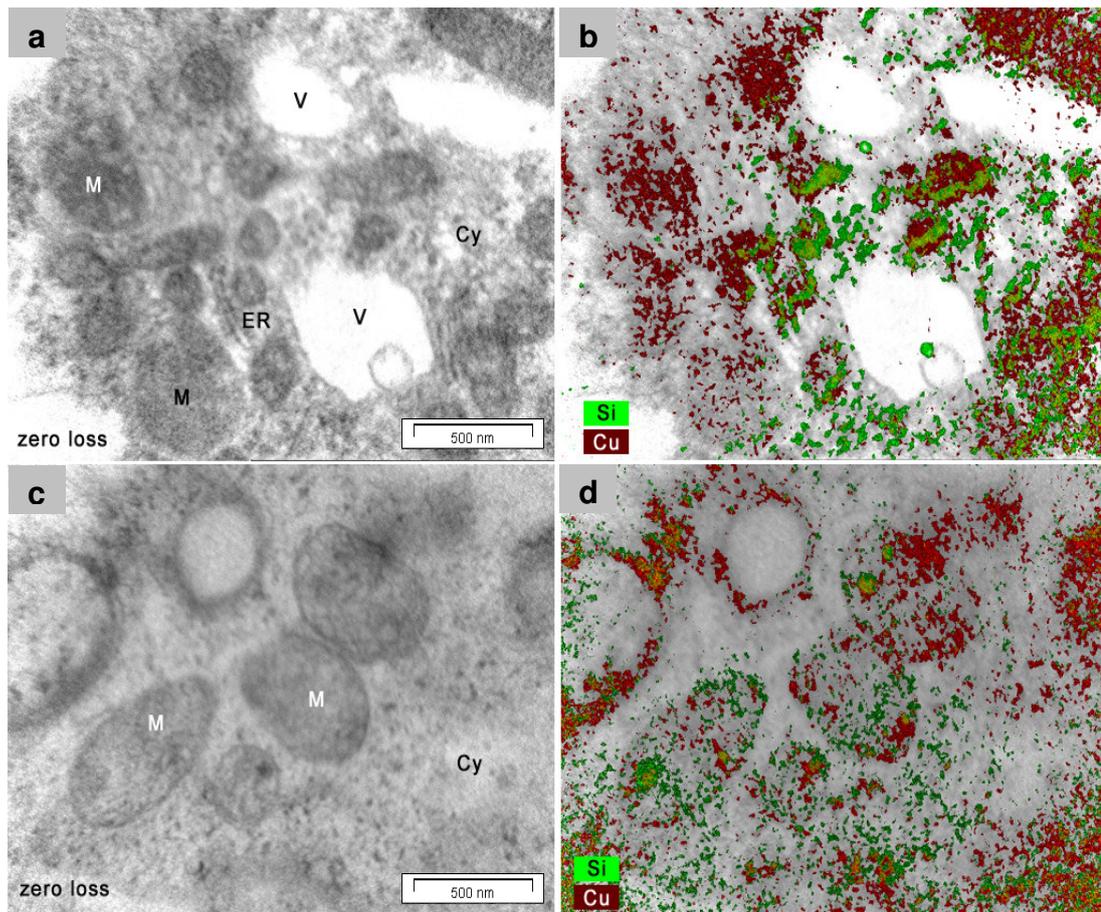
2 - Si-Ablagerung in der Zellwand von *Silene jennisensis*

3 - DFT (Dichte-Funktions-Theorie), berechnetes Spektrum von SiO<sub>2</sub>

Übereinstimmung der 3 Spektren charakterisiert die elektronentransparenten Ablagerungen in der Zellwand als SiO<sub>2</sub>.

### 3.4.4 Speicherung und Verteilung von Kupfer und Silizium in der Zelle

Nach Behandlung der Zellkulturen mit Kupfer und Silizium sind im Cytoplasma von *S. cucubalus* Zellen beide Elemente nachweisbar (Abb. 3.12 a, b). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in *S. jennisensis* Zellen erhalten (Abb. 3.12 c, d). Allerdings ist die Verteilung der Elemente im Cytoplasma unterschiedlich. Während es zu einer Ansammlung von Kupfer in den Mitochondrien kommt, befindet sich Silizium eher im Cytoplasma. Vereinzelte Colokalisierungen von Kupfer und Silizium ergeben in den EEL-Spektren keine Hinweise auf das Vorkommen von Cu-Silikat.



**Abb. 3.12 a, b:** Verteilung von Kupfer (Cu) und Silizium (Si) in *Silene cucubalus* Zellkulturen

a - zero loss-Bild

b - ESI-Bild der Cu- und Si-Verteilung

Lokalisation von Cu (rot) im Cytoplasma (Cy), insbesondere in den Mitochondrien (M) und von Si (grün) im Cytoplasma; ER: Endoplasmatisches Retikulum, V: Vakuole

**Abb. 3.12 c, d:** Verteilung von Kupfer (Cu) und Silizium (Si) in *Silene jensseensis* Zellkulturen

c - zero loss-Bild

d - ESI-Bild der Cu- und Si-Verteilung

Lokalisation von Cu (rot) bevorzugt in den Mitochondrien (M) und Si (grün) im Cytoplasma (Cy); Das gemeinsame Vorkommen von Cu und Si ergibt orange.

### 3.5 Vorkommen von Phytochelatinen und Glutathion in *Silene*-Spezies

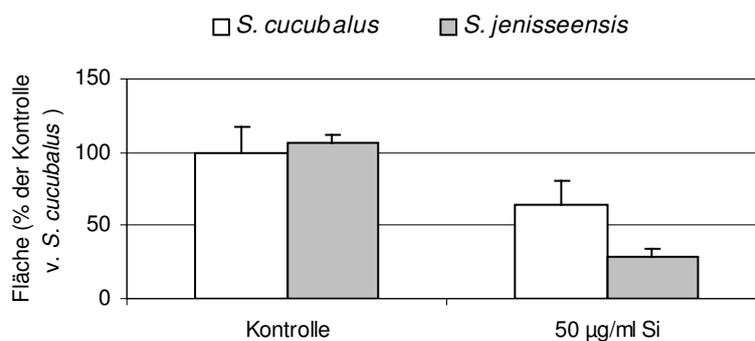
Phytochelatine (PC) sind in der Lage Schwermetalle zu binden. Die Komplexbildung von Metall-Ionen durch PC kann entscheidend zur SM-Toleranz in Pflanzen beitragen (Rauser, 1995; Cobbett, 2000). Glutathion (GSH) ist das Substrat für die Synthese von PC. Die Produktion von Phytochelatinen führt zur Abnahme von GSH (Grill et al., 1987) und zu oxidativem Stress (De Vos et al., 1992).

Da die SM-Toleranz ein komplexer Prozess ist, sollte neben der möglichen Bedeutung von Silizium, auch die Komplexierung durch Phytochelatine untersucht werden.

Von Interesse war es, mögliche Unterschiede im PC-Gehalt und in der GSH-Konzentration zwischen der schwermetall-sensitiveren *S. cucubalus* und der schwermetall-toleranteren *S. jenseensis* unter Einfluss von Kupfer, Zink und Silizium aufzuzeigen.

Um einen Vergleich zwischen den unbehandelten und den unterschiedlich behandelten Zellen erstellen zu können, wurden stets die gleichen Ausgangsmengen unter den gleichen Extraktionsbedingungen im selben Versuchszeitraum aufgearbeitet.

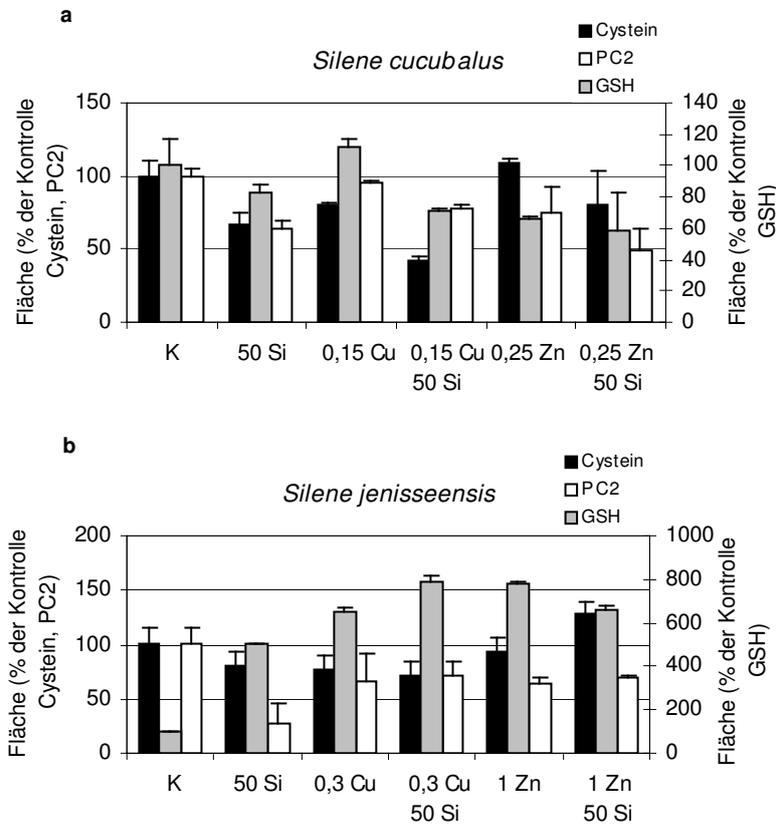
In beiden Kulturen ist der Gehalt an PC2 unter normalen Wachstumsbedingungen annähernd gleich (Abb. 3.13). Die Applikation von 50 µg/ml Si führt zu einer Abnahme des PC2-Gehaltes in beiden Zellkulturen, wobei die PC2-Konzentration deutlich stärker in der *S. jenseensis* Zellkultur reduziert wird.



**Abb. 3.13:** Vorkommen von PC2 in unbehandelten (Kontrolle) und Si-gefütterten *Silene*-Zellkulturen  
Nachweis mittels HPLC

Cu- oder Zn-Applikationen führen zu keiner Erhöhung des PC2-Gehaltes in den Zellkulturen von *S. cucubalus* (Abb. 3.14 a) und *S. jenseensis* (Abb. 3.14 b). Die Glutathion-(GSH)-Konzentration ist dagegen nach Cu-Applikation in der *S. cucubalus* Zellkultur leicht erhöht. Zink bewirkt eine Abnahme des GSH-Gehaltes bei *S. cucubalus*. Die GSH-Konzentration in der *S. jenseensis* Zellkultur ist sowohl nach Cu- als auch nach Zn-Applikation deutlich erhöht. Die Cystein-Konzentration nimmt nach Cu-Applikation bei *S. cucubalus* leicht ab und wird durch Zn-Zugaben leicht erhöht. Der Cystein-Gehalt von *S. jenseensis* wird ebenfalls durch Kupfer leicht reduziert und bleibt nach Zn-Applikation nahezu unverändert. Die Anwesenheit von Silizium neben Kupfer oder Zink führt in der *S. cucubalus* Zellkultur zu einer Reduktion der PC2-, GSH- und Cystein-Konzentration sowohl im Vergleich zur Kontrolle, als auch im Vergleich zu den Cu- oder Zn-behandelten Zellkulturen (Abb. 3.14 a).

In den Zellen von *S. jennisseensis* wird in Anwesenheit von Silizium neben Kupfer oder Zink eine Erhöhung der GSH-Konzentration, und eine Abnahme der PC2-Konzentration erkennbar. Die Cystein-Konzentration ist nach Applikation von Zink mit Silizium erhöht (Abb. 3.14 b).



**Abb. 3.14 a, b: Vorkommen thiolhaltiger Verbindungen unter verschiedenen Stressbedingungen**

a - *Silene cucubalus* 0,15 mM Cu<sup>2+</sup>, 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> ± 50 µg/ml Si

b - *Silene jennisseensis* 0,3 mM Cu<sup>2+</sup>, 1 mM Zn<sup>2+</sup> ± 50 µg/ml Si

K - Kontrolle; Nachweis mittels HPLC

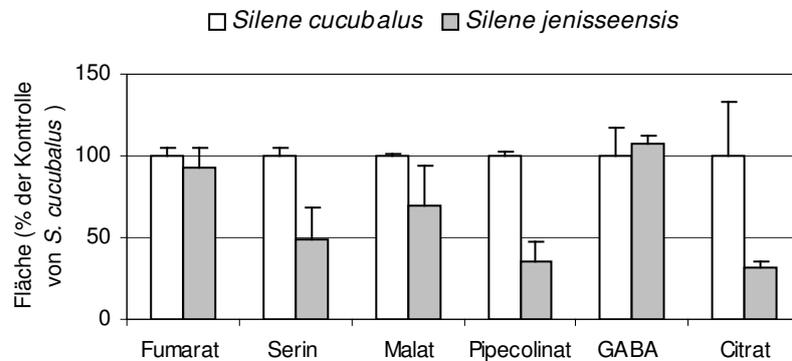
### 3.6 Organische Säuren und Aminosäuren in *Silene*-Spezies

Organische Säuren wie Malat, Citrat oder Oxalat sind in verschiedene SM-Toleranzmechanismen involviert. Sie unterstützen den Transport von Ionen durch das Xylem und in die Vakuole (Clemens, 2001).

Neben den Untersuchungen zur möglichen Bedeutung von Silizium in der SM-Toleranz war es auch interessant, ob es Unterschiede in der Konzentration organischer Säuren zwischen den unbehandelten und den mit Zn- bzw. Cu-behandelten Zellkulturen gibt.

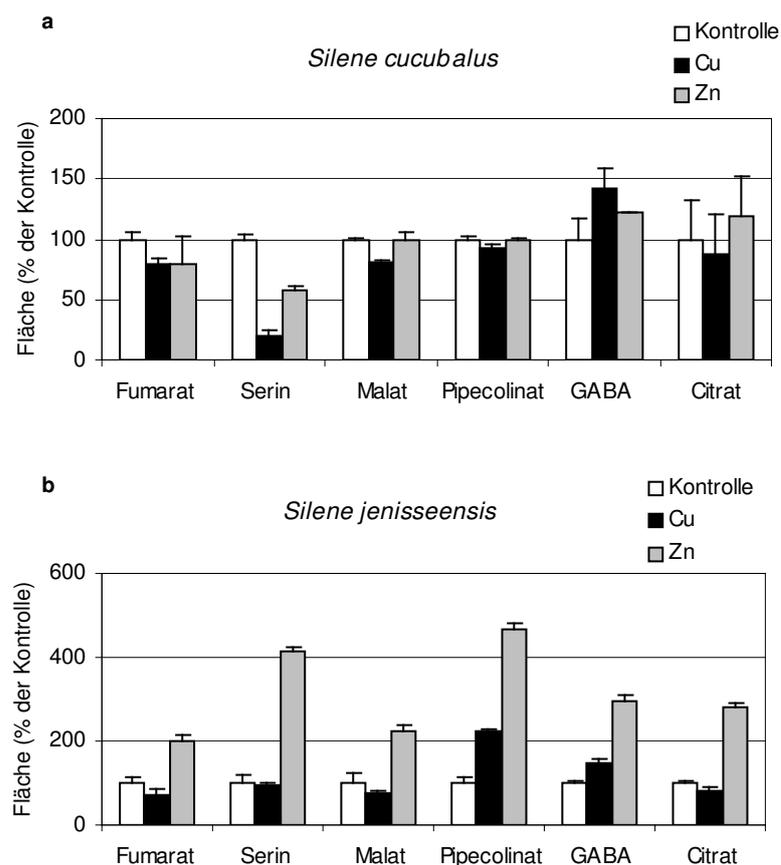
Für die Versuche wurden 0,15 mM Cu<sup>2+</sup> und 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> an *Silene*-Zellkulturen appliziert. Unbehandelte Zellkulturen dienten als Kontrollen. Die Methanolextrakte wurden wie in Kap. 2.4.2 beschrieben, gewonnen.

Um einen Vergleich zwischen den unbehandelten und den Zn- bzw. Cu-behandelten Zellen erstellen zu können, wurden gleiche Ausgangsmengen unter gleichen Bedingungen aufgearbeitet.



**Abb. 3.15 a:** Vorkommen ausgewählter organischer Säuren und Aminosäuren in *Silene*-Zellkulturen

n = 3, MW ± SE; Messung mittels GC/MS



**Abb. 3.15 b, c:** Vorkommen ausgewählter organischer Säuren und Aminosäuren in *Silene*-Zellkulturen

b - *Silene cucubalus* 0,15 mM Cu<sup>2+</sup>, 0,25 mM Zn<sup>2+</sup>

c - *Silene jenseensis* 0,15 mM Cu<sup>2+</sup>, 0,25 mM Zn<sup>2+</sup>

n = 3, MW ± SE; Messung mittels GC/MS

Unbehandelte Zellkulturen von *S. cucubalus* enthalten deutlich höhere Konzentrationen an organischen Säuren wie Malat und Citrat bzw. an den Aminosäuren Serin und Pipecolinat, als die unbehandelten Kulturen von *S. jensseensis* (Abb. 3.15 a). Zn- und Cu-Applikationen scheinen allerdings unterschiedliche Reaktionen im organischen Säurehaushalt der beiden *Silene*-Spezies hervorzurufen (Abb. 3.15 b, c). In *S. cucubalus* Zellkulturen wurde nach Applikation von Kupfer eine starke Reduktion der Serin-Konzentration beobachtet (Abb. 3.15 b). Diese Reduktion ist nach Applikation von Zink weniger ausgeprägt. Der Fumarat-Gehalt nimmt unter Einfluss von Kupfer oder Zink leicht ab. Malat wird unter Einfluss von Zink nicht beeinflusst. Die Applikation von Kupfer bewirkt allerdings eine leichte Reduktion des Malat-Gehaltes. Die Pipecolinsäure wird unter Einfluss von Kupfer oder Zink unwesentlich beeinflusst.  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) zeigt nach Applikation von Kupfer einen deutlichen Konzentrationsanstieg. Auch nach Applikation von Zink lassen sich leicht erhöhte GABA-Werte feststellen. Die Citrat-Konzentration ist ebenfalls nach Applikation von Zink erhöht. Die Cu-Applikation bewirkt allerdings eine leichte Reduktion des Citrat-Gehaltes bei *S. cucubalus* (Abb. 3.15 b). *S. jensseensis* Zellkulturen zeigen nach Applikation von Zink einen deutlichen Anstieg der Fumarat-, Serin-, Malat-, Pipecolinat-, GABA- und Citrat-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 3.15 c). Nach Applikation von Kupfer waren nur die Konzentrationen der Pipecolinsäure und der  $\gamma$ -Aminobuttersäure erhöht. Der Gehalt an Fumarat, Malat und Citrat war nach Applikation von Kupfer bei *S. jensseensis* leicht reduziert, während der Serin-Gehalt unverändert blieb.

Zellkulturen haben den Vorteil, dass es sich um einfache Systeme, Einzelzellen oder kleine undifferenzierte Zellklumpen handelt, die leicht zu handhaben sind. Sie können aber die intakte Pflanze mit ihren vielfältigen Differenzierungen nicht widerspiegeln.

Die Verwendung intakter Pflanzen von *S. cucubalus* und *S. jensseensis*, als Fortführung der Versuche an den entsprechenden Zellkulturen, war nicht möglich, da das entsprechende Samenmaterial nicht zur Verfügung stand.

Um die an den *Silene*-Zellkulturen gewonnenen Daten zu überprüfen, wurden daher als Versuchsobjekte zwei nahe verwandte Spezies *Arabidopsis thaliana* (schwermetall-sensitiv) und *Arabidopsis halleri* (schwermetall-tolerant) verwendet.

### 3.7 Zelluläre Lokalisation von Kupfer, Zink und Silizium in *Arabidopsis*-Spezies

Wie auch für die *Silene*-Zellkulturen wurden zunächst Untersuchungen zur zellulären Lokalisation der Elemente Kupfer, Zink und Silizium in den Blättern von *A. thaliana* und

*A. halleri* durchgeführt. Ziel der Analysen war es, Besonderheiten und Unterschiede in den Zellstrukturen der beiden *Arabidopsis*-Spezies herauszuarbeiten.

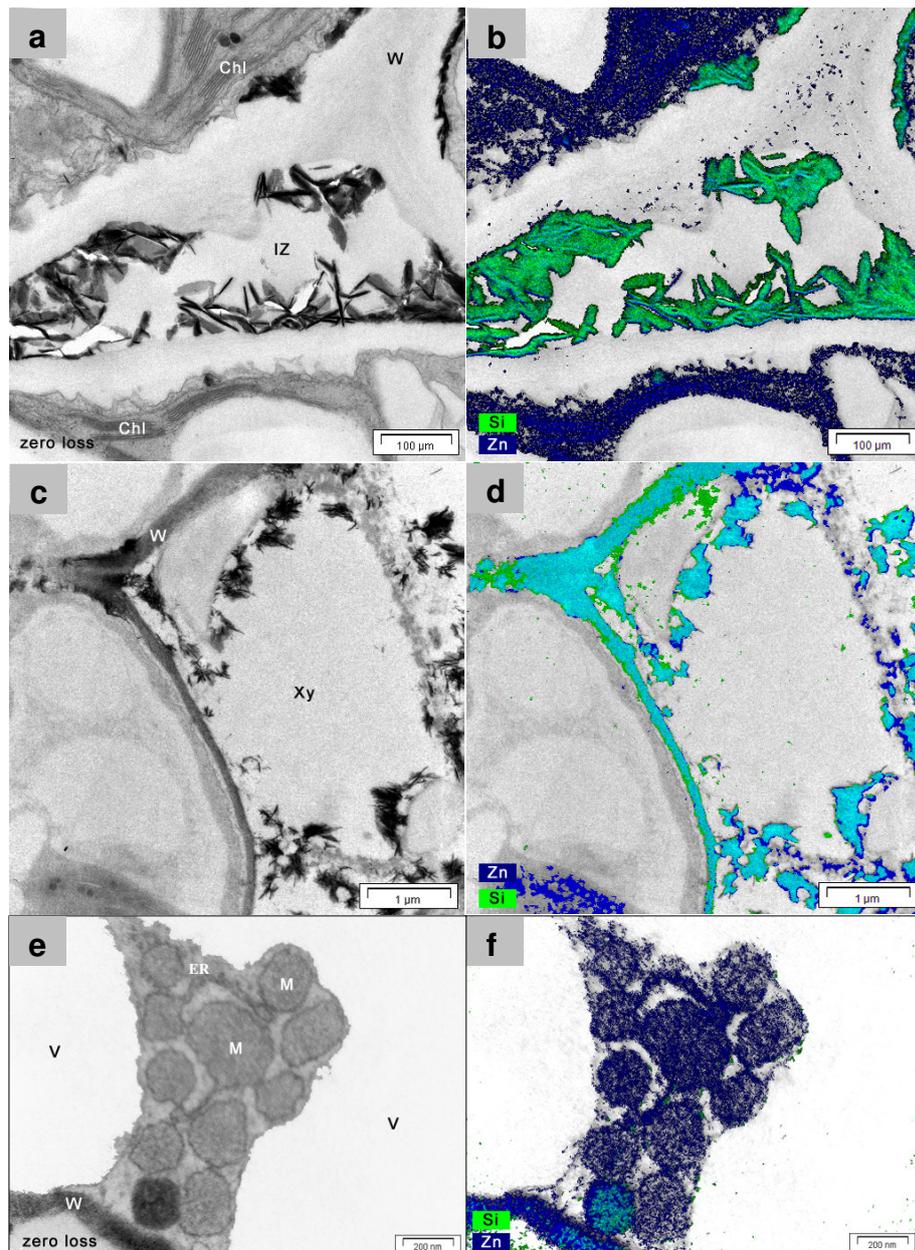
### 3.7.1 Speicherung und Verteilung von Zink und Silizium in den Blättern

Die Bestimmung der Verteilung von Zink und Silizium erfolgte mittels ESI-Messungen. Die in den Interzellularen und im Xylem auftretenden Niederschläge der Blätter von *A. thaliana* sind Colokalisationen von Zink und Silizium (Abb. 3.16 a-d). Durch entsprechende EEL-Spektren konnten diese Präzipitate als Zn-Silikat identifiziert werden. Zink wird offenbar als Zn-Silikat im Xylem transportiert (Abb. 3.16 c, d). In den Blattparenchymzellen befindet sich Zink im Cytoplasma und den Organellen, wie den Mitochondrien (Abb. 3.16 e, f). Zn-Silikat-Niederschläge finden sich auch in den extrazellulären Räumen von *A. halleri* Blattparenchymzellen (Abb. 3.17 a, b), sowie im Xylem (Abb. 3.17 c, d). Außerdem wurden im Cytoplasma und in den Kernen von *A. halleri* 20-30 nm große elektronendichte Partikel beobachtet, die neben Zink und Silizium auch Zn-Silikat enthalten (Abb. 3.17 e, f). Zudem enthalten die Vakuolen beträchtliche Mengen an Zink, worauf später näher eingegangen wird (Abb. 3.34 g, h). Außerdem wurden in den Vakuolen von *A. halleri* häufig Invaginationen beobachtet, die sowohl von der Plasmamembran als auch von der Tonoplastenmembran umgeben sind (Abb. 3.17 g). Diese Einstülpungen enthalten membranöse Zellbestandteile und zudem beträchtliche Mengen an Zink und Silizium (Abb. 3.17 h). Solche Invaginationen können sich vollständig von der Membran ablösen und liegen dann in der Vakuole als Vesikel vor (Abb. 3.17 i, j).

### 3.7.2 Speicherung und Verteilung von Kupfer und Silizium in den Blättern

Der Transport von Kupfer und Silizium in die Blätter von *A. thaliana* (Abb. 3.18 e, f) und *A. halleri* (Abb. 3.19 e, f) erfolgt über das Xylem. In den Xylemgefäßen beider Arten konnten die Elemente separat sowie in Colokalisierungen nachgewiesen werden.

Vergleicht man die Lokalisation der Elemente in *A. thaliana* und in *A. halleri* fällt auf, dass in den Zellwänden von *A. thaliana* vorwiegend Silizium (Abb. 3.18 a, b) in denen von *A. halleri* dagegen Kupfer (3.19 a, b) lokalisiert ist. Innerhalb der Zelle ist Kupfer in beiden *Arabidopsis*-Spezies hauptsächlich in den Organellen, wie den Chloroplasten (*A. thaliana*, Abb. 3.18 c, d) und den Mitochondrien (*A. halleri*, Abb. 3.19 c, d) zu finden.



**Abb. 3.16 a-f: Verteilung von Zink (Zn) und Silizium (Si) in *Arabidopsis thaliana* Blättern**

a - zero loss-Bild einer Interzellulare (IZ)

b - ESI-Bild zur Verteilung von Zn und Si

Lokalisation von Si (grün) in der Interzellulare und zwischen Zellwand (W) und Cytoplasma (Cy)

Lokalisation von Zn (blau) im Cytoplasma (Cy) und in den Plastiden (Chl); S: Stärkekorn

c - zero loss-Bild des Xylems (Xy)

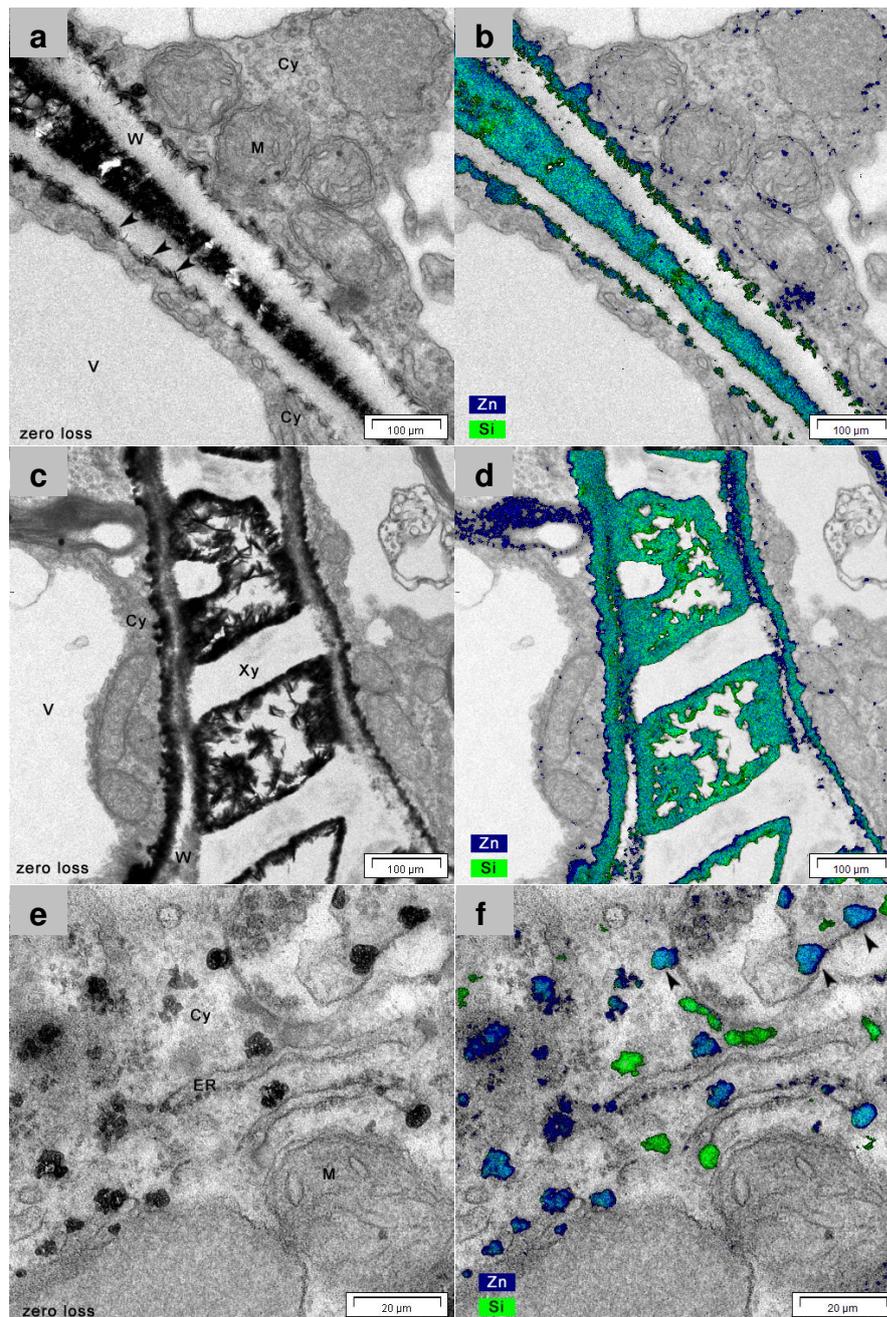
d - ESI-Bild zur Verteilung von Zn und Si

Deutlich zu erkennen sind die Colokalisationen von Zn und Si (hellblau) in der Xylemwand und im Lumen des Xylems; W: Zellwand

e - zero loss-Bild

f - ESI-Bild zur Verteilung von Zn und Si

Im Endoplasmatischem Retikulum (ER) und den Mitochondrien (M) ist Zn (blau) nachweisbar.



**Abb. 3.17 a-f: Verteilung von Zink (Zn) und Silizium (Si) in *Arabidopsis halleri* Blättern**

a - zero loss-Bild

b - ESI-Bild zur Verteilung von Zn und Si

Im extrazellulären Raum und zwischen Wand und Cytoplasma (Cy) sind Zn und Si colokalisiert (hellblau).

Die Pfeile kennzeichnen die Niederschläge zwischen Zellwand (W) und Cytoplasma (Cy);

V: Vakuole, M: Mitochondrium

c - zero loss-Bild des Xylems (Xy)

d - ESI-Bild zeigt die Verteilung von Zn und Si bzw. Zn-Silikat

In den Zellwänden (W) des Xylems (Xy) sind nadelförmige Niederschläge nachweisbar, die Zn-Silikat

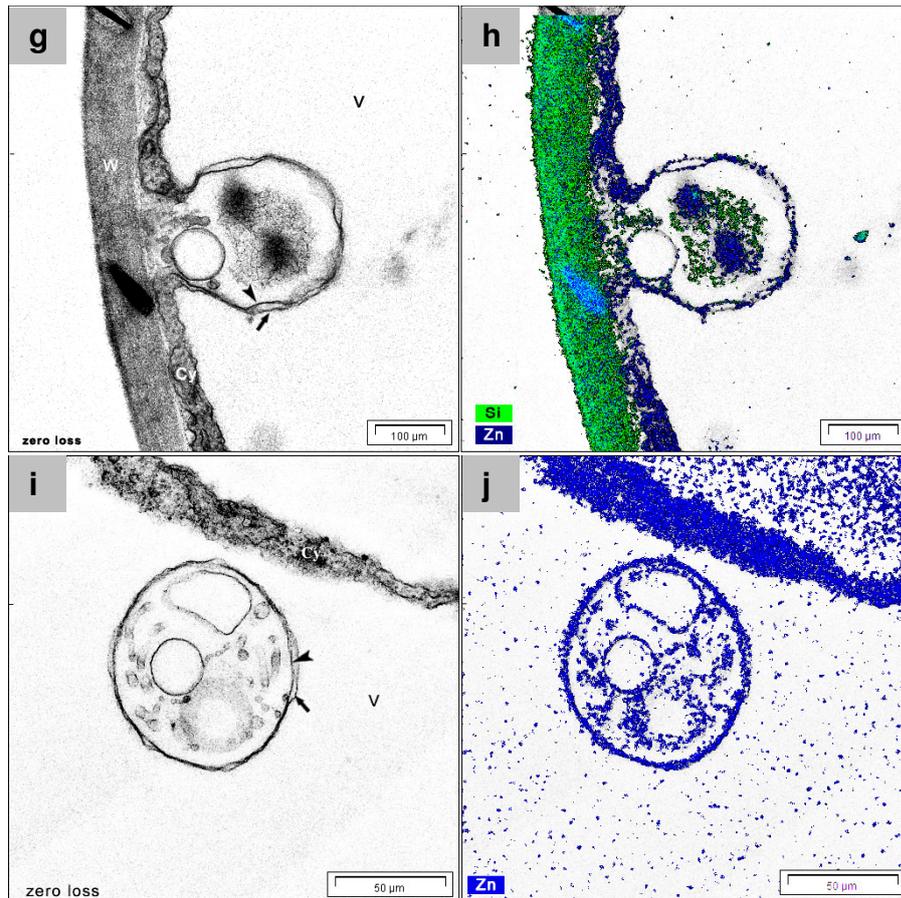
(hellblau) enthalten. V: Vakuole

e - zero loss-Bild des Cytoplasmas

f - ESI-Bild zur Verteilung von Zn und Si bzw. Zn-Silikat

Im Cytoplasma (Cy) befindliche Niederschläge (20 - 30 nm) enthalten Zn (blau), Si (grün) und Zn-Silikat

(hellblau); ER: Endoplasmatisches Retikulum, M: Mitochondrium



**Abb. 3.17 g-j: Verteilung von Zink (Zn) und Silizium (Si) in *Arabidopsis halleri* Blättern**

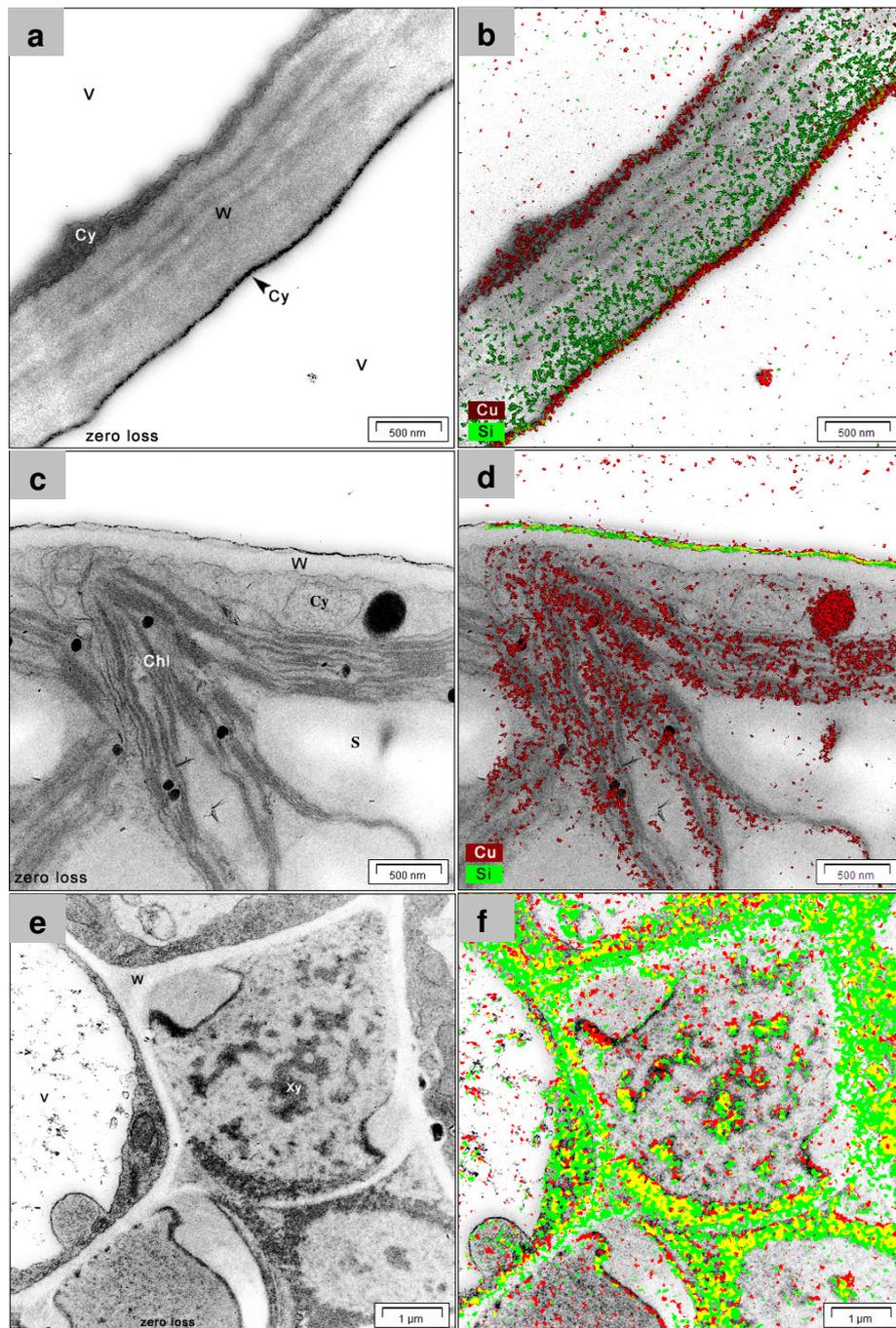
g - zero loss-Bild einer Invagination mit membranösem Material

h - ESI-Bild zeigt die Lokalisation von Zn (blau) im Cytoplasma (Cy) und in der Invagination  
Lokalisation von Si (grün) in der Zellwand (W) und in der Invagination; V: Vakuole

i - zero loss-Bild einer vollständig abgetrennten Invagination in der Vakuole (V)

j - ESI-Bild zur Verteilung von Zn (blau) in der Vakuole, im Vesikel und im Cytoplasma (Cy)

Die Invagination wird von der Plasmamembran (▲) und der Tonoplastenmembran (↑) umgeben.



**Abb. 3.18 a-f: Verteilung von Kupfer (Cu) und Silizium (Si) in *Arabidopsis thaliana* Blättern**

a - zero loss-Bild

b - ESI-Bild der Cu und Si Verteilung

In den Zellwänden (W) ist Si (grün) und im Cytoplasma (Cy) Cu (rot) nachweisbar; V: Vakuole

c - zero loss-Bild eines Chloroplasten (Chl)

d - ESI-Bild der Verteilung von Cu und Si

Lokalisation von Si (grün) in der Zellwand (W)

Lokalisation von Cu (rot) im Chloroplasten; S: Stärkekorn

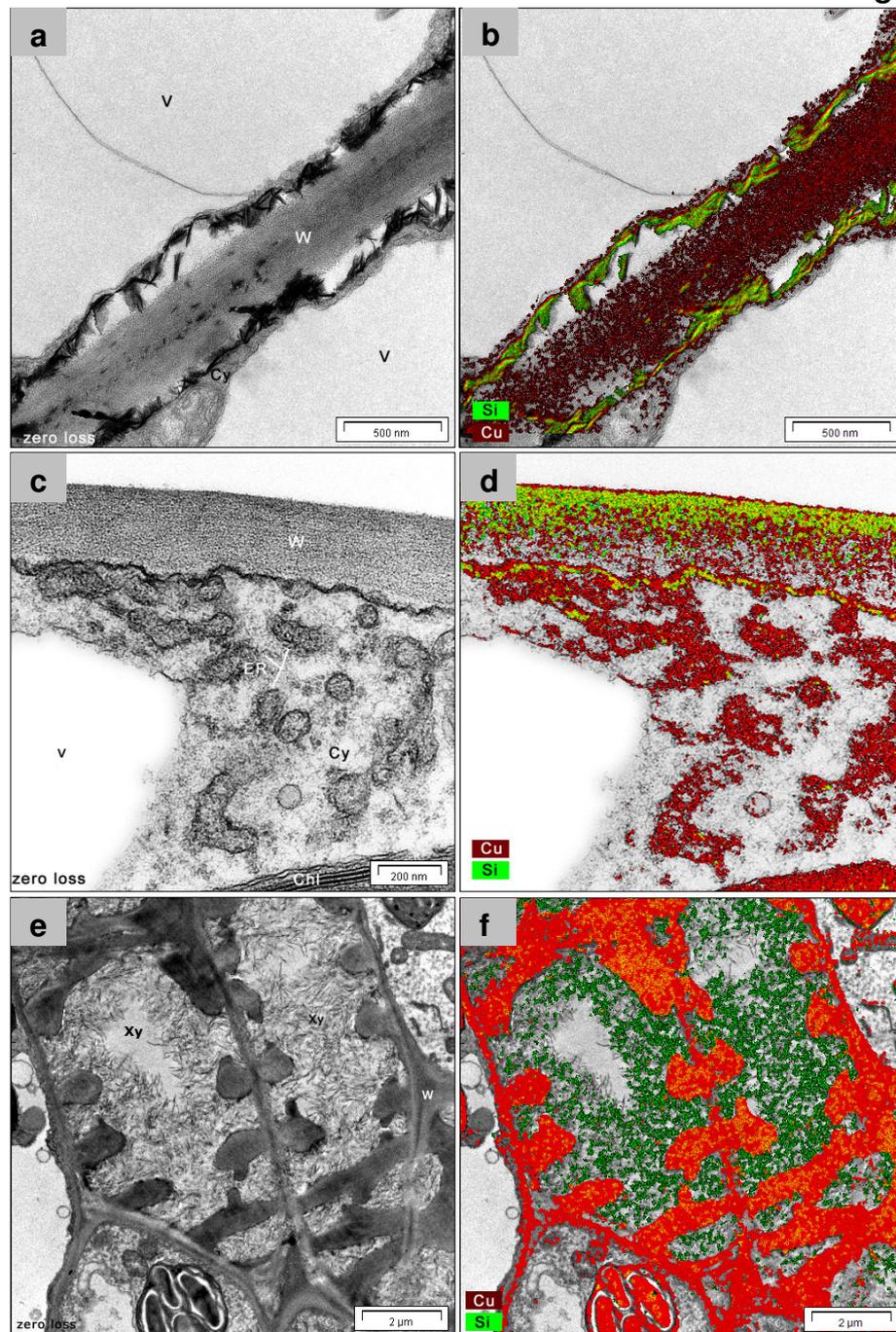
e - zero loss-Bild des Xylems (Xy)

f - ESI-Bild der Verteilung von Cu und Si

Lokalisation von Si (grün) in den Zellwänden (W)

Lokalisation von Cu (rot) im Lumen des Xylems

Das gemeinsame Vorkommen von Cu und Si ist durch gelbe Bereiche gekennzeichnet; V: Vakuole



**Abb. 3.19 a-f: Verteilung von Kupfer (Cu) und Silizium (Si) in *Arabidopsis halleri* Blättern**

a - zero loss-Bild

b - ESI-Bild der Cu und Si Verteilung

Zwischen den Zellwänden (W) und dem Cytoplasma (Cy) sind nadelförmige Kristalle mit Si (grün) und Cu (rot) nachweisbar. Das gemeinsame Vorkommen von Cu und Si ist durch gelbe Bereiche gekennzeichnet. Lokalisation von Cu (rot) in der Zellwand (W) und im Cytoplasma (Cy); V: Vakuole

c - zero loss-Bild

d - ESI-Bild der Verteilung von Cu und Si

Lokalisation von Si (grün) und Cu (rot) in der Zellwand (W) und zwischen Wand und Cytoplasma (Cy)  
Lokalisation von Cu (rot) im Cytoplasma (Cy) insbesondere im Endoplasmatischem Retikulum (ER) und den Chloroplasten (Chl) V: Vakuole

e - zero loss-Bild des Xylems (Xy)

f - ESI-Bild der Verteilung von Cu und Si

Lokalisation von Cu (rot) in den Zellwänden (W) und den Verdickungswänden des Xylems (Xy)  
Lokalisation von Si (grün) im Lumen des Xylems

### 3.8 Schwermetall-Aufnahme in *Arabidopsis*-Spezies

Auf zellulärer Ebene konnten nur geringe Unterschiede zur Verteilung und Speicherung von Kupfer zwischen den beiden *Arabidopsis*-Spezies herausgefunden werden. Von Interesse war es daher, Unterschiede in der Aufnahme und im Transport von Kupfer zu finden. Die Untersuchungen erfolgten an Hydrokulturen von *Arabidopsis thaliana* und *Arabidopsis halleri*. Diese wurden wie in Kap. 2.2.2 angezogen und anschließend über einen Zeitraum von 7 d mit Kupfer oder Zink behandelt (Kap. 2.2.4). Bis zu einer Konzentration von 0,015 mM Cu<sup>2+</sup> erfolgt eine konzentrationsabhängige Aufnahme von Kupfer in die Wurzeln beider Spezies. Mit zunehmender Konzentration dieses Elements im Medium ist eine erhöhte Aufnahme in die Wurzeln messbar (Tab. 3.6). In den Blättern von *A. halleri* ist der Cu-Gehalt von der Konzentration im Außenmedium abhängig (Tab. 3.7). Für *A. thaliana* trifft das nur bis zu einer Konzentration von 0,007 mM Cu<sup>2+</sup> zu. Unbehandelte Wurzeln von *A. halleri* enthalten deutlich mehr Kupfer als unbehandelte Wurzeln von *A. thaliana*. Bis zu einer Medium-Konzentration von 0,005 mM Cu<sup>2+</sup> ist der Cu-Gehalt in den Wurzeln von *A. halleri* stets höher als in den Wurzeln von *A. thaliana*. Von 0,007 mM Cu<sup>2+</sup> bis 0,015 mM Cu<sup>2+</sup> enthalten die Wurzeln von *A. thaliana* mehr Kupfer.

Die Blätter von *A. thaliana* und *A. halleri* enthalten unter normalen Wachstumsbedingungen ähnliche Cu-Werte. Die Applikation von nur 0,003 mM Cu<sup>2+</sup> führt in den Blättern von *A. halleri* zu einer höheren Akkumulation des Metalls als in den Blättern von *A. thaliana*. Unter allen gegebenen Cu-Applikationen wurden stets höhere Cu-Werte in den Blättern von *A. halleri* bestimmt. Unter gleichen Versuchsbedingungen wird in den Blättern von *A. thaliana* bei einer Konzentration von 0,015 mM Cu<sup>2+</sup> nur etwa 1/5 der Cu-Konzentration von *A. halleri* erreicht.

Tab. 3.6: Kupfer-(Cu)-Konzentrationen in den Wurzeln von *Arabidopsis*-Pflanzen

µg Cu/ g TG, Cu=Cu<sup>2+</sup>; Versuchsdauer 7 d; n = 3, MW ± SE; Analyse der Schwermetalle mittels AAS

Hydrokultur	Kontrolle	0,003 mM Cu	0,005 mM Cu	0,007 mM Cu	0,01 mM Cu	0,015 mM Cu
<i>Arabidopsis thaliana</i>	7,7 ± 2,6	363,5 ± 88,2	594,3 ± 13,3	764,5 ± 28,5	883,6 ± 57,8	935,7 ± 55,5
<i>Arabidopsis halleri</i>	46,5 ± 3,5	435,7 ± 17,8	625 ± 25,0	693,8 ± 24,3	740 ± 10,0	820 ± 30,2

Tab. 3.7: Kupfer-(Cu)-Konzentrationen in den Blätter von *Arabidopsis*-Pflanzen

µg Cu/ g TG, Cu=Cu<sup>2+</sup>; Versuchsdauer 7 d; n = 3, MW ± SE; Analyse der Schwermetalle mittels AAS

Hydrokultur	Kontrolle	0,003 mM Cu	0,005 mM Cu	0,007 mM Cu	0,01 mM Cu	0,015 mM Cu
<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,2 ± 0,56	7,0 ± 0,51	8,8 ± 2,4	11,5 ± 1,3	10,4 ± 5,0	10,7 ± 5,2
<i>Arabidopsis halleri</i>	4,5 ± 0,5	10,3 ± 0,9	14,3 ± 1,7	17,6 ± 3,2	23,3 ± 8,3	49,1 ± 0,9

Die Akkumulation von Zink führte sowohl in den Wurzeln (Tab. 3.8) als auch in den Blättern von *A. halleri* (Tab. 3.9) zu einer Zunahme in Abhängigkeit der Medienkonzentration. Die Aufnahme von Zink in die Wurzeln von *A. thaliana* ist ebenfalls von der Zn-Konzentration im Medium abhängig. Die Aufnahmerate bei *A. thaliana* unterscheidet sich aber deutlich von *A. halleri* (Tab. 3.8). Während nach einer Applikation von 0,2 mM Zn<sup>2+</sup> die Wurzeln beider Spezies ähnlich hohe Zn-Werte besaßen, wird nach Applikation von 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> eine höhere Zn-Aufnahme in die Wurzeln von *A. halleri* beobachtet. Nach Applikation von 1 mM Zn<sup>2+</sup> enthalten die Wurzeln von *A. halleri* doppelt so hohe Zn-Werte wie die von *A. thaliana*.

In den Blättern von *A. halleri* wurde bereits ab einer Mediumkonzentration von nur 0,2 mM Zn<sup>2+</sup> 8-mal so hohe Zn-Konzentration wie in den Blättern von *A. thaliana* gemessen (Tab. 3.9). Mit zunehmender Zn-Konzentration im Medium erfolgt eine Abnahme der Zn-Konzentrations-Differenz zwischen den Blättern von *A. thaliana* und *A. halleri*. Bei einer Konzentration von 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> im Medium beträgt das Verhältnis zwischen *A. halleri* und *A. thaliana* Blättern ca. 7,5; nach 0,3 mM Zn<sup>2+</sup> ca. 5,6; nach 0,5 mM Zn<sup>2+</sup> ca. 4,0 und nach 1 mM Zn<sup>2+</sup> ca. 4,7. Auffallend sind die gemessenen Werte in den Blättern und Wurzeln von *A. halleri*. Nach Applikation von 0,2 mM Zn<sup>2+</sup> und 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> enthalten die Blätter fast doppelt so hohe Zn-Konzentrationen wie deren Wurzeln. Nach 0,5 mM Zn<sup>2+</sup> und 1 mM Zn<sup>2+</sup> wurden gleiche Konzentrationen sowohl in den Wurzeln als auch in den Blättern gemessen. Die Blätter von *A. thaliana* enthalten immer geringere Zn-Konzentrationen als deren Wurzeln.

**Tab. 3.8: Zink-(Zn)-Konzentration in den Wurzeln von *Arabidopsis*-Pflanzen**

mg Zn/ g TG; Versuchsdauer 7 d; n = 3, MW ± SE; Analyse der Schwermetalle mittels AAS

Hydrokultur	Kontrolle	0,2 mM Zn <sup>2+</sup>	0,25 mM Zn <sup>2+</sup>	0,3 mM Zn <sup>2+</sup>	0,5 mM Zn <sup>2+</sup>	1 mM Zn <sup>2+</sup>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,08 ± 0,0	4,4 ± 1,5	5,3 ± 0,8	5,7 ± 1,2	7,3 ± 0,7	10,2 ± 0,7
<i>Arabidopsis halleri</i>	0,11 ± 0,1	4,9 ± 1,6	6,9 ± 2,2	7,8 ± 1,4	13,4 ± 0,7	21,1 ± 0,8

**Tab. 3.9: Zink-(Zn)-Konzentration in den Blätter von *Arabidopsis*-Pflanzen**

mg Zn/ g TG; Versuchsdauer 7 d; n = 3, MW ± SE; Analyse der Schwermetalle mittels AAS

Hydrokultur	Kontrolle	0,2 mM Zn <sup>2+</sup>	0,25 mM Zn <sup>2+</sup>	0,3 mM Zn <sup>2+</sup>	0,5 mM Zn <sup>2+</sup>	1 mM Zn <sup>2+</sup>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,05 ± 0,0	1,1 ± 0,6	2,1 ± 0,1	2,8 ± 0,1	4,4 ± 0,3	5,9 ± 0,8
<i>Arabidopsis halleri</i>	0,07 ± 0,0	8,3 ± 0,3	15,8 ± 2,3	15,6 ± 3,2	17,4 ± 3,2	27,7 ± 5,1

### 3.9 Einfluss von Kupfer auf die Kieselsäure-Aufnahme

Silizium bewirkt eine reduzierte Cu-Aufnahme in den untersuchten *Silene*-Zellkulturen (Abb. 3.2 a, b). *A. halleri* Wurzeln nehmen bis zu einer Konzentration von 0,007 mM Cu<sup>2+</sup> deutlich mehr Kupfer als die Wurzeln von *A. thaliana* auf (Tab. 3.6). In den folgenden Experimenten wurde daher der mögliche Einfluss von Kupfer auf die Aufnahme von Kieselsäure in beiden *Arabidopsis*-Spezies untersucht.

Die Kieselsäure-(KS)-Konzentration der Wurzeln und Blättern von *Arabidopsis*-Pflanzen, die mit 0,005 mM Cu<sup>2+</sup> (*A. thaliana*) bzw. 0,01 mM Cu<sup>2+</sup> (*A. halleri*) und Kieselsäure über einen Zeitraum von 7 d behandelt wurden, wurde photometrisch (Kap. 2.3.3) bestimmt. Dabei wurden Konzentrationen bis 1 mM KS verwendet. Parallel dazu wurde die KS-Konzentration in den Wurzeln und Blättern von *Arabidopsis*-Hydrokulturen gemessen, die nur mit Kieselsäure behandelt wurden. Die für diesen Versuch gewählten Cu-Konzentrationen entsprachen der Verträglichkeit der jeweiligen Pflanzenart.

Die Aufnahme von Kieselsäure in die Wurzeln von *A. halleri* und *A. thaliana* ist abhängig von der KS-Konzentration im Medium (Tab. 3.10, Tab. 3.12). Nach einer Zugabe von 0,25 mM KS zum Medium können 1,6 µg KS/ mg TG (*A. thaliana*) bzw. 0,97 µg KS/ mg TG (*A. halleri*) in den Wurzeln gemessen werden. Wird die Konzentration von Kieselsäure im Medium erhöht, wird eine erhöhte KS-Aufnahme in die Wurzeln beobachtet. So konnten nach Applikation von 1 mM KS 2,6 µg KS/ mg TG (*A. thaliana*) bzw. 4,60 µg KS/ mg TG (*A. halleri*) im aufgearbeiteten Wurzelmaterial nachgewiesen werden. Unter Einfluss von Kieselsäure enthalten die Blätter von *A. halleri* mehr Kieselsäure als die Blätter von *A. thaliana*. Dabei scheint der Transport von Kieselsäure unabhängig von der Medienkonzentration, im Gegensatz zu den Wurzeln, zu sein (Tab. 3.11, Tab. 3.13). Die Aufnahme von Kieselsäure ändert sich bedeutend, wenn zur jeweiligen KS-Konzentration außerdem Kupfer appliziert wird (Tab. 3.10, Tab. 3.12). Besonders deutlich wird das bei *A. thaliana*. Hier erhöht sich die KS-Konzentration in den Wurzeln in Gegenwart von Cu/KS auf das 5fache (0,25 mM KS), auf das 9fache (0,5 mM KS) bzw. auf das 6fache (1 mM KS) gegenüber der Einzelapplikation von KS. Bei *A. halleri* ist die Aufnahme von Kieselsäure unter Einfluss von Kupfer ebenfalls erhöht. Dabei wurden nach 0,25 mM KS/Cu 4fach, nach 0,5 mM/Cu 2fach und nach 1 mM KS/Cu ebenfalls 2fach höhere KS-Werte als ohne Cu-Applikation gemessen. Die Blätter von *A. halleri* und *A. thaliana* zeigen unter Einfluss von Kupfer ebenfalls bedeutend höhere KS-Werte. Besonders nach Zugabe von 0,5 mM KS/Cu wurden sehr hohe KS-Konzentrationen in den Blättern beider Spezies gemessen, die 17mal (*A. thaliana*) bzw. 19mal (*A. halleri*) höher waren, als ohne Cu-Applikation (Tab. 3.11, Tab. 3.13).

Tab. 3.10: KS-Konzentration in den Wurzeln von *A. thaliana* Pflanzen $\mu\text{g KS/ mg TG}$ , Versuchsdauer 7 d,  $n = 3$ ,  $\text{MW} \pm \text{SE}$ ; KS-Bestimmung mittels Silikat-Test

Wurzeln	Kontrolle	0,25 mM KS	0,5 mM KS	1 mM KS
0 mM Cu	0,10 $\pm$ 0,1	1,60 $\pm$ 0,2	1,75 $\pm$ 0,0	2,60 $\pm$ 0,0
0,005 mM Cu	0,12 $\pm$ 0,0	8,19 $\pm$ 0,0	15,4 $\pm$ 0,1	14,8 $\pm$ 0,1

Tab. 3.11: KS-Konzentration in den Blätter von *A. thaliana* Pflanzen $\mu\text{g KS/ mg TG}$ , Versuchsdauer 7 d,  $n = 3$ ,  $\text{MW} \pm \text{SE}$ ; KS-Bestimmung mittels Silikat-Test

Blätter	Kontrolle	0,25 mM KS	0,5 mM KS	1 mM KS
0 mM Cu	0,03 $\pm$ 0,0	0,67 $\pm$ 0,17	0,46 $\pm$ 0,0	0,66 $\pm$ 0,1
0,005 mM Cu	0,04 $\pm$ 0,0	6,8 $\pm$ 1,7	7,7 $\pm$ 2,2	4,20 $\pm$ 0,6

Tab. 3.12: KS-Konzentration in den Wurzeln von *A. halleri* Pflanzen $\mu\text{g KS/ mg TG}$ , Versuchsdauer 7 d,  $n = 3$ ,  $\text{MW} \pm \text{SE}$ ; KS-Bestimmung mittels Silikat-Test

Wurzeln	Kontrolle	0,25 mM KS	0,5 mM KS	1 mM KS
0 mM Cu	0,40 $\pm$ 0,2	0,97 $\pm$ 0,1	2,70 $\pm$ 0,4	4,60 $\pm$ 0,4
0,01 mM Cu	0,68 $\pm$ 0,0	4,05 $\pm$ 2,0	5,03 $\pm$ 0,1	10,3 $\pm$ 2,1

Tab. 3.13: KS-Konzentration in den Blätter von *A. halleri* $\mu\text{g KS/ mg TG}$ , Versuchsdauer 7 d,  $n = 3$ ,  $\text{MW} \pm \text{SE}$ ; KS-Bestimmung mittels Silikat-Test

Blätter	Kontrolle	0,25 mM KS	0,5 mM KS	1 mM KS
0 mM Cu	0,40 $\pm$ 0,0	1,50 $\pm$ 0,9	1,37 $\pm$ 0,6	1,80 $\pm$ 0,1
0,01 mM Cu	0,10 $\pm$ 0,0	3,02 $\pm$ 0,8	6,90 $\pm$ 2,0	3,72 $\pm$ 0,2

### 3.10 Aufnahme von Kieselsäure und Zink in *Arabidopsis*-Spezies

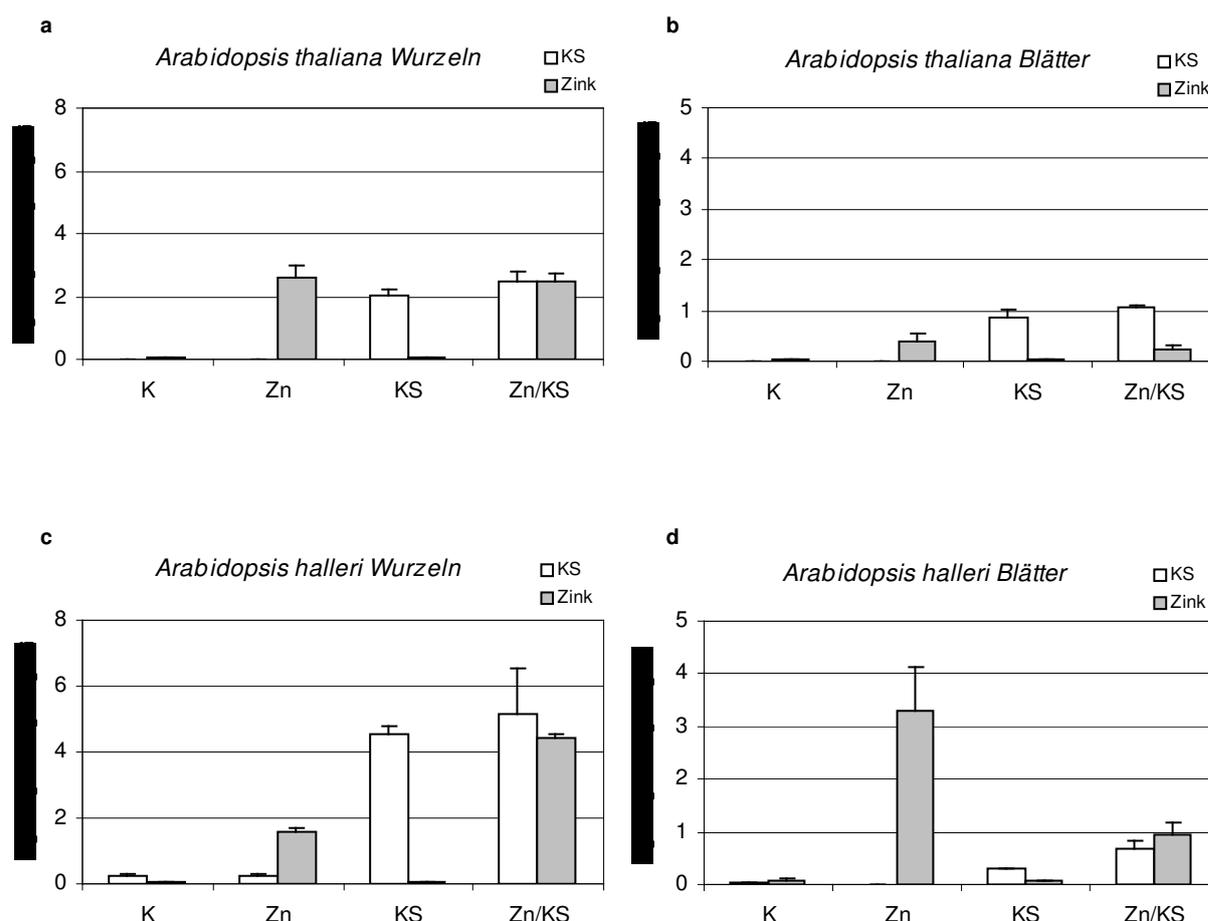
In den *Silene*-Zellkulturen konnte kein Einfluss von Silizium in Gegenwart erhöhter Zn-Konzentrationen auf das Zellwachstum und auf die Aufnahme von Zink beobachtet werden (Abb. 3.1 b; Abb. 3.2 a, b). Die gemessene Zn-Konzentration in den Wurzeln und Blättern von *A. halleri* ist unter allen gegebenen Zn-Applikationen höher, als bei *A. thaliana*.

Aufgrund dieser Voruntersuchungen wurden *Arabidopsis*-Hydrokulturen beider Spezies mit 0,05 mM  $\text{Zn}^{2+}$ , 0,25 mM KS oder 0,05 mM  $\text{Zn}^{2+}$  mit 0,25 mM KS (Zn/KS) über einen Zeitraum von 7 d behandelt. Nach dem Aufschließen des Probenmaterials (Kap. 2.3.2) wurde die KS-

Konzentration photometrisch (Kap. 2.3.3) und die Zn-Konzentration mittels AAS (Kap. 2.3.4) in den Wurzeln und Blättern bestimmt. Zum Vergleich wurde auch die KS- und Zn-Konzentration in den Wurzeln und Blättern unbehandelter Pflanzen bestimmt.

Keine wesentlichen Unterschiede in der Aufnahme und dem Transport von Zn bzw. Zn/KS wurden bei *A. thaliana* beobachtet. Die Menge des aufgenommenen Zinks wird durch die Anwesenheit von KS nicht beeinflusst (Abb. 3.20 a, b). Für *Arabidopsis halleri* wurden dagegen deutliche Unterschiede in der Aufnahme und im Transport von Zink beobachtet. (Abb. 3.20 c, d). Die Wurzeln enthalten 2,5fach mehr Zink in Gegenwart von KS im Vergleich zur Einzelapplikation von Zink (Abb. 3.20 c).

Im Gegensatz zur höheren Zn-Konzentration in den Wurzeln in Gegenwart von Kieselsäure, zeigen die Blätter von *A. halleri* deutlich weniger Zink nach Applikation von Zn/KS. Wie in Abb. 3.20 d zu erkennen ist, enthielten die Blätter nach Applikation von Zink dreifach höhere Zn-Konzentrationen als die Blätter nach Applikation von Zn/KS.



**Abb. 3.20 a-d: Zink-(Zn)- und Kieselsäure-(KS)-Konzentration in *Arabidopsis*-Pflanzen**

*Arabidopsis thaliana* a - Wurzeln, b - Blätter

*Arabidopsis halleri* c - Wurzeln, d - Blätter

K - Kontrolle, Zn - 0,05 mM Zn<sup>2+</sup>, KS - 0,25 mM KS, Zn/KS - 0,05 mM Zn<sup>2+</sup> und 0,25 mM KS;

n = 3, MW ± SE, Kieselsäurebestimmung (Silikat-Test), Zn-Messung (AAS)

### 3.11 Einfluss von Germanium auf die Aufnahme von Kieselsäure und Zink

Die Aufnahme von Silizium und Germanium in Pflanzen scheint den gleichen Gesetzmäßigkeiten zu folgen. Germanium wird verwendet, um das Aufnahmeverhalten von Silizium zu simulieren (Takahashi et al., 1976 a-c). In *A. halleri* kommt es in Gegenwart von Silizium zu einer deutlichen Abnahme von Zink in den Blättern und einer gleichzeitigen Zunahme der Zn-Konzentration in den Wurzeln (Abb. 3.20 c-d). In *A. thaliana* wurde ein solcher Einfluss nicht beobachtet (Abb. 3.20 a-b).

Aus diesem Grunde war es von Interesse, ob Germanium in *Arabidopsis* die Aufnahme und die Verteilung von Kieselsäure und folglich auch die von Zink beeinflusst. Für den Versuchsansatz wurden Pflanzen von *A. thaliana* und *A. halleri* mit verschiedenen Konzentrationen an Germanium (1 - 30 µg/ml Ge), in Gegenwart von 0,25 mM KS oder 0,25 mM KS mit 0,05 mM Zn<sup>2+</sup> (Zn/KS), über einen Zeitraum von 7 d behandelt. Als Vergleichspflanzen dienten unbehandelte Pflanzen, mit Zink (0,05 mM Zn<sup>2+</sup>) und Zn/KS (0,05 mM Zn<sup>2+</sup>/ 0,25 mM KS) gefütterte Pflanzen. Die Abb. 3.21 A-G zeigen die unterschiedlichen Reaktionen der *A. thaliana* Pflanzen unter den gegebenen Stress-Situationen. Applikationen von KS bzw. Ge/KS führen zu keiner makroskopischen Veränderung (Abb. 3.21 B, E). Sie sind optisch von der unbehandelten Pflanze nicht zu unterscheiden (Abb. 3.21 a). Die Zugabe von Zink oder Zn/KS bewirkt auf den Unterseiten und an den Blattadern der älteren Blätter eine deutliche Anthocyanfärbung (Abb. 3.21 C, D). Wird neben Zn bzw. Zn/KS noch Ge ins Medium gegeben, erkennt man neben der Anthocyanbildung eine zusätzliche Vergilbung der jungen Blätter (Abb. 3.21 F, G). *A. halleri* Hydrokulturen zeigen unter den gleichen Stressbedingungen keine makroskopischen Veränderungen. Die verwendete Ge-Konzentration bewirkte keine Vergilbung der Blätter. Anthocyanbildung wurde erst nach Applikation höherer Zn-Konzentrationen auf der Unterseite von *A. halleri* Blättern beobachtet.



**Abb. 3.21 A-G:** Hydroponisch angezogene *Arabidopsis thaliana* Col-0 Pflanzen  
 makroskopische Veränderungen der Blätter nach Applikation von  
 Zink (Zn), Germanium (Ge) und / oder Kieselsäure (KS)

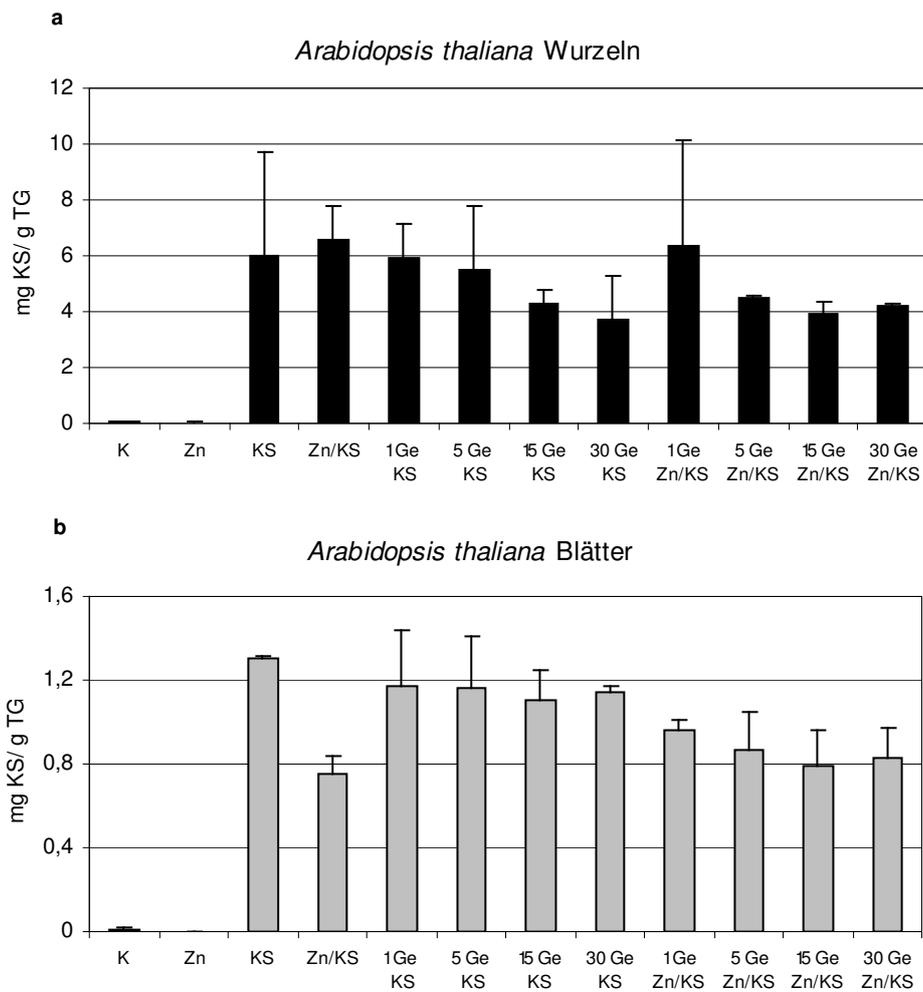
### 3.11.1 Einfluss von Germanium auf die Aufnahme von Kieselsäure

Der Annahme folgend, dass Pflanzen nicht in der Lage sind zwischen Silizium und Germanium zu unterscheiden, sollte eine Abnahme von Kieselsäure bei simultaner Applikation von Germanium zu beobachten sein. Deshalb wurde untersucht, ob diese Annahme auch auf die beiden *Arabidopsis*-Spezies zutrifft.

Sowohl bei *A. thaliana* als auch bei *A. halleri* hat die Zugabe des Substanzgemisches von 1 µg/ml Ge und 0,25 mM KS keinerlei Auswirkung auf die KS-Aufnahme. Die KS-Konzentration der Wurzeln ist ähnlich hoch, wie die nach Einzelapplikation von Kieselsäure. Erst mit steigender Ge-Konzentration (5, 15 bzw. 30 µg/ml Ge) im Substanzgemisch sinkt der Gehalt an Kieselsäure in den Wurzeln der *Arabidopsis*-Pflanzen. Im Ausmaß der Abnahme unterscheiden sich *A. thaliana* und *A. halleri* voneinander. So konnte für *A. thaliana* nach Applikation von 30 µg/ml Ge und 0,25 mM KS eine Abnahme im KS-Gehalt der Wurzeln von ca. 39 % (Abb. 3.22 a), für *A. halleri* eine Reduzierung um 56 % detektiert werden (Abb. 3.23 a).

Nach Applikation von Zn/KS und 5-30 µg/ml Ge wurden ebenfalls reduzierte KS-Werte bei *A. thaliana* gemessen. Dabei beträgt die Reduktion unter allen drei applizierten Ge-Konzentrationen in den Wurzeln ca. 33 %. In *A. halleri* führt die Zugabe von 1 µg/ml Ge neben Zn/KS zu einer Erhöhung der KS-Konzentration in den Wurzeln. Mit steigender Konzentration von Germanium im Substanzgemisch nimmt der Gehalt an Kieselsäure in den Wurzeln ab. Dabei ist die Reduktion nach Zugabe von 15 µg/ml Ge und Zn/KS mit ca. 32 % am größten.

Die Blätter von *A. thaliana* zeigen nach Applikation von 0,25 mM KS und unterschiedlichen Ge-Konzentrationen nur eine geringe Abnahme des KS-Gehaltes. Diese ist bei allen vier Substanzgemischen fast gleich stark ausgeprägt (Abb. 3.22 b). Nach Zugabe von Zn/KS und verschiedenen Konzentrationen an Germanium kommt es zu einer stärkeren Reduktion der Kieselsäure in den Blättern von *A. thaliana*. Die Reduktion beträgt im Vergleich zur Einzelapplikation mit KS zwischen 26 % und 39 %. In den Blättern von *A. halleri* wurden sehr unterschiedliche KS-Werte nach verschiedenen Ge-Applikationen bestimmt. So wurden nach Zugabe von 5, 15 bzw. 30 µg/ml Ge/KS, sowie nach Zugabe 1 bzw. 5 µg/ml Ge/Zn/KS erhöhte KS-Konzentrationen in den Blättern gegenüber der Einzelapplikation von KS gemessen. Dagegen wurde nach Zugabe von 1 µg/ml Ge/KS sowie nach Zugabe von 15 bzw. 30 µg/ml Ge/Zn/KS eine Reduktion des KS-Gehaltes festgestellt (Abb. 3.23 b).



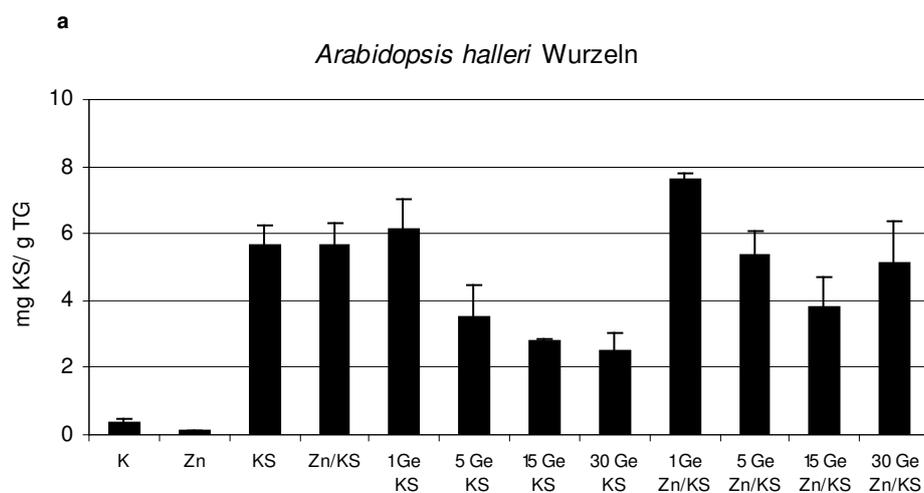
**Abb. 3.22 a, b:** Kieselsäure-(KS)-Konzentration unter Einfluss von Germanium in *A. thaliana* Pflanzen

a - Wurzeln

b - Blätter

K - Kontrolle, Zn - 0,05 mM Zn<sup>2+</sup>, KS - 0,25 mM KS, Zn/KS - 0,05 mM Zn<sup>2+</sup> und 0,25 mM KS;

Ge (µg/ml); KS-Bestimmung mittels Silikat-Test; n = 3, MW ± SE

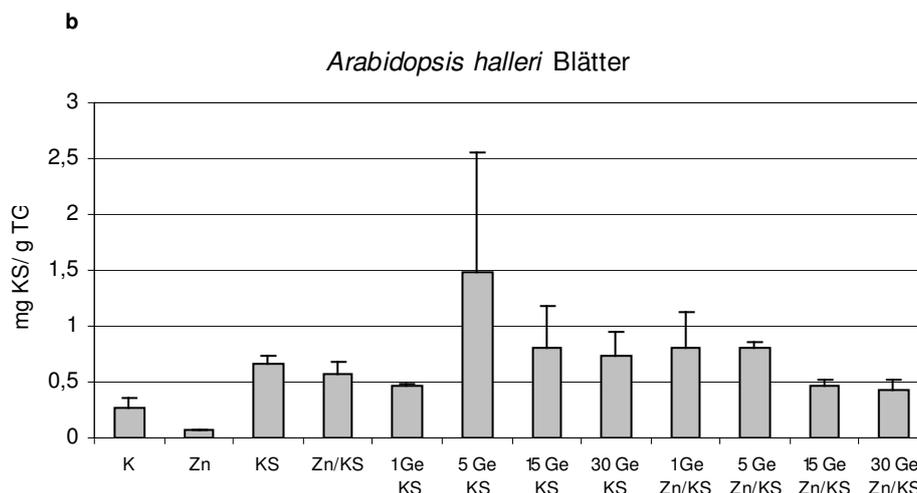


**Abb. 3.23 a:** Kieselsäure-(KS)-Konzentration unter Einfluss von Germanium in *A. halleri* Pflanzen

a - Wurzeln

K - Kontrolle, Zn - 0,05 mM Zn<sup>2+</sup>, KS - 0,25 mM KS, Zn/KS - 0,05 mM Zn<sup>2+</sup> und 0,25 mM KS;

Ge (µg/ml); KS-Bestimmung mittels Silikat-Test; n = 3, MW ± SE



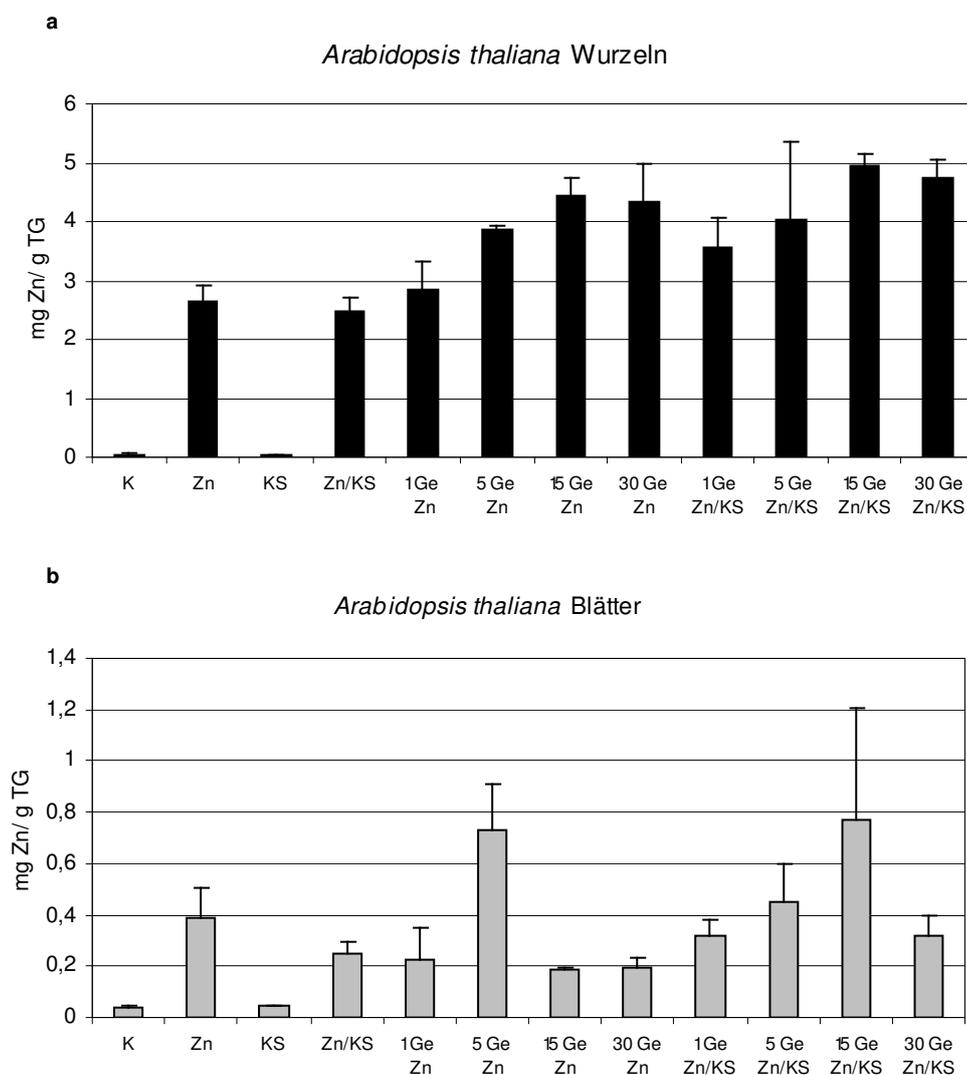
**Abb. 3.23 b:** Kieselsäure-(KS)-Konzentration unter Einfluss von Germanium in *A. halleri* Pflanzen  
 b - Blätter  
 K - Kontrolle, Zn - 0,05 mM Zn<sup>2+</sup>, KS - 0,25 mM KS, Zn/KS - 0,05 mM Zn<sup>2+</sup> und 0,25 mM KS;  
 Ge (µg/ml); KS-Bestimmung mittels Silikat-Test; n = 3, MW ± SE

### 3.11.2 Einfluss von Germanium auf die Aufnahme von Zink

Die Ergebnisse aus Kap. 3.11.1 sprechen für eine Hemmung der KS-Aufnahme durch Germanium sowohl in *A. thaliana* als auch in *A. halleri*. Da Kieselsäure offenbar eine Veränderung der Zn-Konzentration in *A. halleri* bewirkt (Abb. 3.20 c-d), ist durch die beobachtete kompetitive Hemmung der Kieselsäure durch Germanium (Abb. 3.23a) auch von einer Änderung der Zn-Konzentration auszugehen. Die Ergebnisse sind in den Abb. 3.24 a, b (*A. thaliana*) und Abb. 3.25 a, b (*A. halleri*) dargestellt.

Wird zum Medium der hydroponisch angezogenen *A. thaliana* und *A. halleri* Pflanzen das Substanzgemisch 0,05 mM Zn<sup>2+</sup> und 0,25 mM KS (Zn/KS) appliziert und mit der Einzelapplikation von 0,05 mM Zn<sup>2+</sup> verglichen, werden bedeutende Unterschiede bezüglich der Zn-Konzentration zwischen den beiden Spezies beobachtet. Bei *A. thaliana* Pflanzen hat die simultane Zugabe von Zink und Kieselsäure keinen Einfluss auf die Zn-Konzentration in den Wurzeln. Die gemessene Menge an diesem Element beträgt 2,5 mg/g TG und ist annähernd gleich der Menge, die nach alleiniger Zugabe von Zn zum Medium in den Wurzeln nachweisbar war (2,63 mg/g TG, Abb. 3.24 a). Die Wurzeln von *A. halleri* zeigen dagegen erhöhte Zn-Konzentrationen, wenn sich gleichzeitig Kieselsäure im Medium befindet. Im Vergleich zur Zn-Applikation (1,56 mg/g TG) ist der Gehalt bei Zugabe von Zink und Kieselsäure mit 4,4 mg/g TG fast dreifach so hoch (Abb. 3.25 a). Nach Zugabe des Substanzgemisches Zn/Ge bzw. Zn/KS/Ge zum Medium ist für *A. thaliana* eine erhöhte Zn-Konzentration in den Wurzeln zu verzeichnen. In beiden Versuchsansätzen, wird sowohl nach Zn/Ge- bzw. Zn/KS/Ge-Applikationen eine Abhängigkeit von der eingesetzten Germaniumkonzentration erkennbar (Abb. 3.24 a). Anders verhält sich dagegen *A. halleri*.

Zwar ist auch hier nach Zugabe von Zn/Ge eine erhöhte Zn-Konzentration in den Wurzeln im Vergleich zur Applikation von Zn messbar, jedoch sinkt mit zunehmender Ge-Konzentration der Gehalt an Zink in den Wurzeln bedeutend. Die Applikation des Substanzgemisch Zn/KS/Ge hat einen ähnlichen Einfluss wie nach erfolgter Zn/Ge-Zugabe. Auch hier ist eine Abnahme des Zn-Gehaltes in den Wurzeln messbar (Abb. 3.25 a). Dabei ist der Grad der Abnahme deutlich geringer, als unter Einfluss von Zn/Ge.



**Abb. 3.24 a, b:** Zink-(Zn)-Konzentration unter Einfluss von Germanium in *A. thaliana* Pflanzen

a - Wurzeln

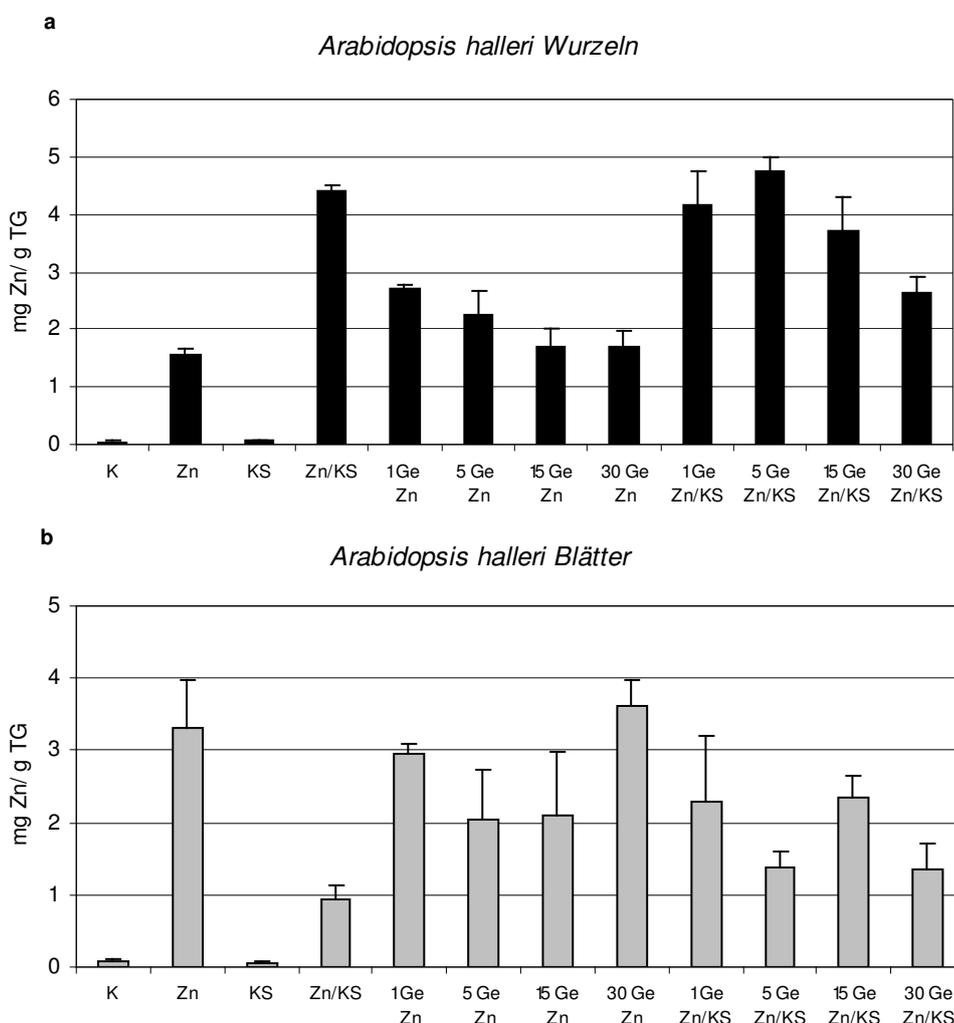
b - Blätter

K - Kontrolle, Zn - 0,05 mM Zn<sup>2+</sup>, KS - 0,25 mM KS, Zn/KS - 0,05 mM Zn<sup>2+</sup> und 0,25 mM KS;

Ge (µg/ml); KS-Bestimmung mittels Silikat-Test; n = 3, MW ± SE

In den Blättern von *A. thaliana* und *A. halleri* Pflanzen lässt sich bei einer gleichzeitigen Applikation von Zn/KS eine Abnahme des Zn-Gehaltes im Vergleich zur Einzelapplikation von Zn feststellen. Dabei beträgt die Reduktion bei *A. thaliana* ca. 55 % (Abb. 3.24 b) und bei *A. halleri* ca. 72 % (Abb. 3.25 b). Nach Zugabe des Substanzgemisches Zn und 5 µg/ml Ge zum Medium ist für *A. thaliana* eine erhöhte Zn-Menge in den Blättern messbar. Die Blätter

zeigten dagegen eine verminderte Zn-Menge, nach Applikation von 1, 15 oder 30  $\mu\text{g/ml}$  Ge/Zn im Vergleich zur Einzelapplikation von Zn. Die Zugabe von Ge/Zn/KS führt mit steigender Ge-Konzentration (1-15  $\mu\text{g/ml}$ ) im Medium zu einer Erhöhung der Zn-Konzentration in den Blättern von *A. thaliana* (Abb. 3.24 b). Nach einer Applikation von 30  $\mu\text{g/ml}$  Ge und Zn/KS wird dagegen eine leichte Abnahme von Zink in die Blätter im Vergleich zur Einzelapplikation von Zn beobachtet. Andere Ergebnisse wurden dagegen in den Blättern von *A. halleri* erhalten. Die Applikation der Substanzgemische 1, 5 oder 15  $\mu\text{g/ml}$  Ge/Zn führten zu einer Abnahme der Zn-Konzentration. Nach Applikation von 30  $\mu\text{g/ml}$  Ge/Zn wurde aber eine Erhöhung des Zn-Gehaltes in den Blättern um 10 % im Vergleich zur Applikation von Zn festgestellt. Die Applikation von Ge/Zn/KS bewirkt ebenfalls eine Reduktion des Zn-Gehaltes (ca. 19 % bis 59 % im Vergleich zur Einzelapplikation von Zn) in den Blättern unter Einfluss aller eingesetzten Ge-Konzentrationen (Abb. 3.25 b).



**Abb. 3.25 a, b:** Zink-(Zn)-Konzentration unter Einfluss von Germanium in *A. halleri* Pflanzen

a - Wurzeln

b - Blätter

K - Kontrolle, Zn - 0,05 mM  $\text{Zn}^{2+}$ , KS - 0,25 mM KS, Zn/KS - 0,05 mM  $\text{Zn}^{2+}$  und 0,25 mM KS;

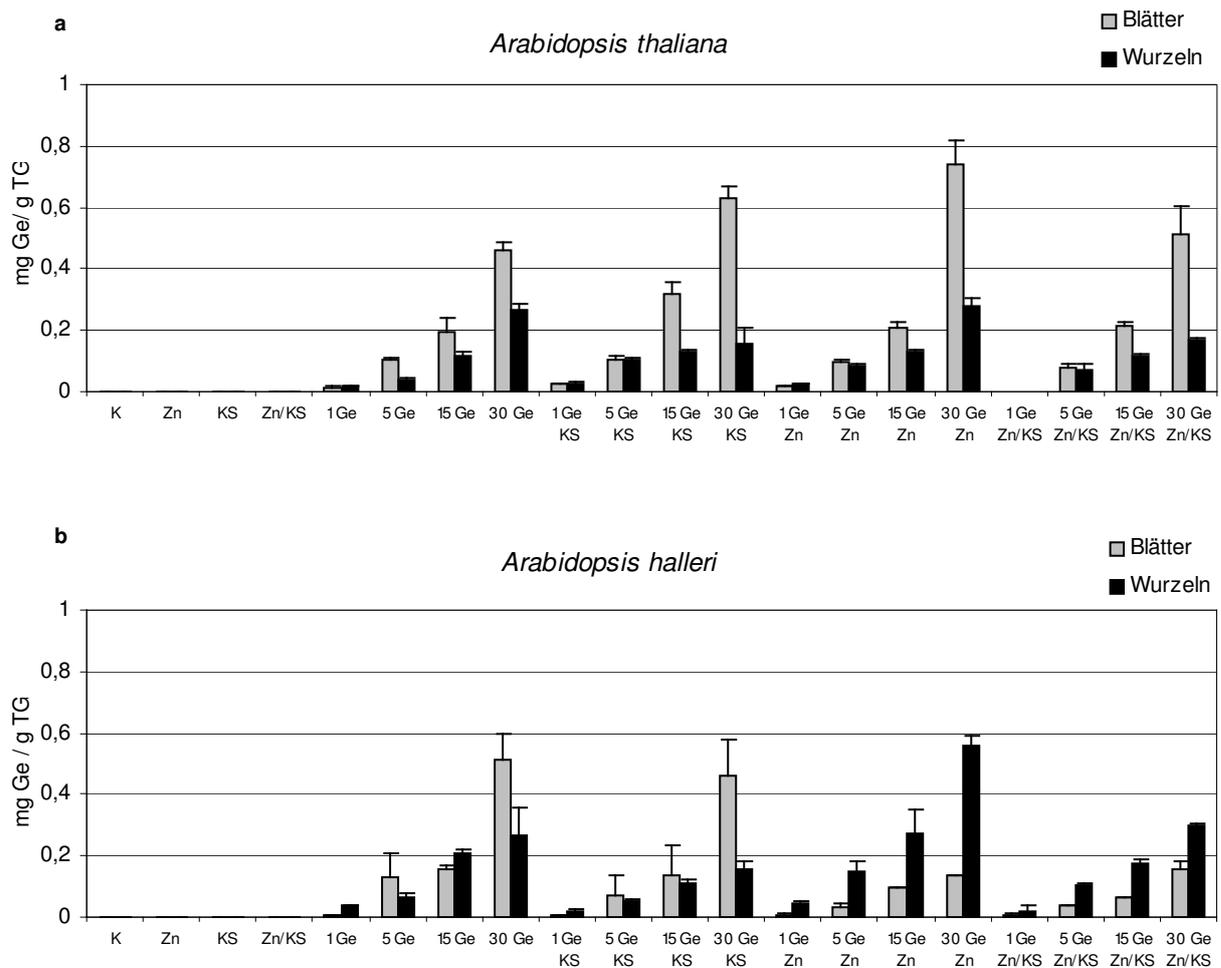
Ge ( $\mu\text{g/ml}$ ); KS-Bestimmung mittels Silikat-Test; n = 3, MW  $\pm$  SE

### 3.11.3 Aufnahme und Transport Germanium

Mit Hilfe der ICP-MS wurden außerdem die Ge-Konzentrationen in den Wurzeln und Blättern der *Arabidopsis*-Pflanzen untersucht.

Wie in den Abb. 3.26 a, b zu erkennen ist, erfolgt die Aufnahme und der Transport von Germanium in Abhängigkeit der Ge-Konzentration im Medium. Es fällt auf, dass in den Blättern von *A. thaliana* bei den Zn- und Zn/KS-dotierten Medien, bedeutend höhere Ge-Werte gemessen wurden, als in den Blättern von *A. halleri* (Abb. 3.26 a, b). Zudem ist die Ge-Konzentration in den Blättern von *A. thaliana* unter allen gegebenen Versuchsbedingungen stets höher, als in deren Wurzeln (Abb. 3.26 a). Diese Beobachtung wurde bei *A. halleri* nur nach Applikation von 1-30 µg/ml Ge oder nach Applikation von 1-30 µg/ml Ge/KS erhalten (Abb. 3.26 b). Wenn neben Germanium (1-30 µg/ml Ge) auch noch 0,05 mM Zn<sup>2+</sup> zum Medium appliziert wurde, ist der Ge-Anteil in den Wurzeln deutlich höher als in den Blättern der *A. halleri* Pflanzen. Auch nach Applikation des Substanzgemisches Ge/Zn/KS befindet sich in den Wurzeln der *A. halleri* Pflanzen mehr Germanium als in deren Blättern. Zudem war der Gesamtgehalt an Germanium gegenüber den anderen Applikationsgemischen deutlich reduziert. Bei *A. thaliana* steigt die Ge-Konzentration in den Blättern in Gegenwart von Kieselsäure. Gleichzeitig nimmt der Anteil an Germanium in den Wurzeln ab (Abb. 3.26 a). Nach Applikation von 1-15 µg/ml Ge/Zn werden ähnlich hohe Ge-Konzentrationen in den Wurzeln und Blättern der *A. thaliana* Pflanzen beobachtet, wie nach Einzelapplikation von Germanium. 30 µg/ml Ge/Zn bewirken einen starken Anstieg der Ge-Konzentration in den Blättern von *A. thaliana*. Nach Applikation des Substanzgemisches Ge/Zn/KS werden in den Wurzeln ähnlich hohe Ge-Werte, wie nach Applikation des Substanzgemisches Ge/KS, gemessen. Die Blätter zeigen dagegen gleich hohe Ge-Konzentrationen wie nach Einzelapplikation mit Germanium.

Bei *A. halleri* kommt es nach Applikation von Ge/Zn zu einem deutlichen Anstieg der Ge-Konzentration in den Wurzeln im Vergleich zur Einzelapplikation von Germanium (Abb. 3.26 b). Gleichzeitig nimmt der Ge-Anteil in den Blättern ab. Auch nach Applikation des Substanzgemisches 1-30 µg/ml Ge/Zn/KS ist der Ge-Anteil in den Wurzeln größer als in den Blättern. Allerdings ist der Gesamtgehalt an Germanium in der Pflanze gegenüber dem Gesamtgehalt nach Einzelapplikation von Germanium reduziert. Kieselsäure bewirkt eine leichte Abnahme der Ge-Konzentration sowohl in den Wurzeln als auch in den Blättern der *A. halleri* Pflanzen.



**Abb. 3.26 a, b:** Germanium-(Ge)-Konzentration unter Einfluss verschiedener Ge-Konzentrationen in *Arabidopsis*-Pflanzen

a - *Arabidopsis thaliana* Wurzeln und Blätter

b - *Arabidopsis halleri* Wurzeln und Blätter

K - Kontrolle, Zn - 0,05 mM Zn<sup>2+</sup>, KS - 0,25 mM KS, Zn/KS - 0,05 mM Zn<sup>2+</sup> und 0,25 mM KS;

Ge (µg/ml); KS-Bestimmung mittels Silikat-Test; n = 3, MW ± SE

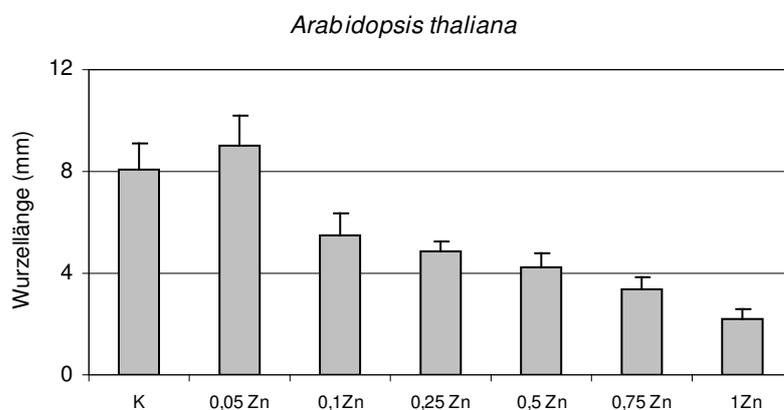
### 3.12 Wurzel-Wachstums-Assays

Mit Hilfe von Wurzel-Wachstums-Assays war es möglich über einen kurzen Zeitraum (10 d), Untersuchungen zum Einfluss von Silizium in Gegenwart erhöhter Zn-Konzentrationen durchzuführen. Zudem sollte mit Hilfe von Wurzel-Wachstums-Assays die kompetitive Eigenschaft des Germaniums gegenüber Silizium näher untersucht werden.

Da Samen von *A. halleri* auf Festmedium nicht zum Keimen gebracht werden konnten, sind leider keine vergleichenden Untersuchungen zwischen *A. thaliana* und *A. halleri* Keimlingen möglich.

### 3.12.1 Einfluss von Zink auf das Wurzellängen-Wachstum

*Arabidopsis thaliana* Samen vom Ökotyp Col-0 wurden auf Platten mit Festmedium (Kap. 2.1.2, Kap. 2.2.2) ausgelegt. Bei der Herstellung des Mediums wurden verschiedene Konzentrationen an Zink appliziert. Die Zugabe von 0,05 mM  $Zn^{2+}$  zum Medium fördert das Wurzellängen-Wachstum von *A. thaliana* Col-0 Keimlingen um ca. 11 % (Abb. 3.27). Mit steigender Konzentration an Zink war jedoch eine Hemmung des Wachstums messbar. So führte die Applikation von 0,5 mM  $Zn^{2+}$  zu einer Hemmung des Längenwachstums um die Hälfte und 1 mM  $Zn^{2+}$  sogar zu einer Reduktion von ca. 74 % gegenüber der Kontrolle.

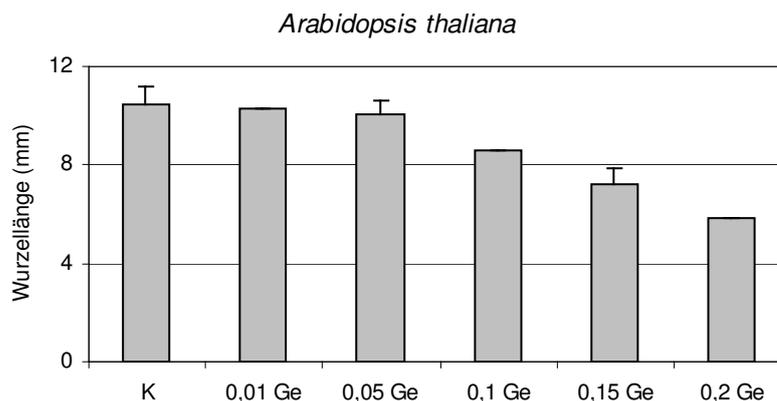


**Abb. 3.27:** Wurzellängen-Wachstum von *Arabidopsis thaliana* unter Einfluss von Zink (Zn)

K - Kontrolle, Zn (mM); Zeitraum 10 d; n > 25, MW ± SE

### 3.12.2 Einfluss von Germanium auf das Wurzellängen-Wachstum

Das Wurzellängen-Wachstum von *A. thaliana* Keimlingen des Ökotyps Col-0 wurde nach Zugabe verschiedener Ge-Konzentrationen bestimmt. 0,01  $\mu\text{g/ml}$  Ge und 0,05  $\mu\text{g/ml}$  Ge führen zu keiner signifikanten Änderung der Wurzellängen (Abb. 3.28). Die Applikation von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Ge hemmt das Wurzellängen-Wachstum um ca. 20 %. Eine Wachstumshemmung der Wurzellängen von ca. 31 % wird durch die Zugabe von 0,15  $\mu\text{g/ml}$  Ge zum Medium erreicht. Nach einer Applikation von 0,2  $\mu\text{g/ml}$  Ge sind die Wurzellängen mit ca. 58 % Wachstum gegenüber den unbehandelten Keimlingen nahezu um die Hälfte reduziert (Abb. 3.28).



**Abb. 3.28:** Wurzellängen-Wachstum von *Arabidopsis thaliana* unter Einfluss von Germanium (Ge)

K - Kontrolle, Ge ( $\mu\text{g/ml}$ ); Zeitraum 10 d;  $n > 25$ , MW  $\pm$  SE

### 3.12.2.1 Chlorophyllbestimmung

Nach der Wurzellängen-Bestimmung Ge-behandelter Keimlingen (Kap. 3.11.2) wurden die Blätter gleicher Ge-Konzentrationen (jeweilige Platte) gesammelt und der Gesamtchlorophyllgehalt bestimmt. In Tab. 3.14 sind die Chlorophyllgehalte den jeweiligen Stressbehandlungen gegenübergestellt. Bis zu einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Ge bleibt der Chlorophyll a und Chlorophyll b Gehalt in den Blättern konstant. Die Applikation von 0,15  $\mu\text{g/ml}$  Ge führt zur Abnahme des Chlorophyllgehaltes (Chlorophyll a ca. 23 %, Chlorophyll b ca. 25 %) in den Blättern. Durch die Zugabe von 0,2  $\mu\text{g/ml}$  Ge lässt sich eine weitere Abnahme des Chlorophyllgehaltes in den Blättern (Chlorophyll a ca. 57 %, Chlorophyll b ca. 62,5 %), im Vergleich zum Chlorophyllgehalt der unbehandelten *A. thaliana* Col-0 Keimlinge, feststellen.

**Tab. 3.14:** Chlorophyllbestimmung Germanium-(Ge)-behandelter *A. thaliana* Keimlinge

Chl ( $\mu\text{g/mg}$  FG), Versuchsdauer 10 d; Analyse spektrophotometrisch

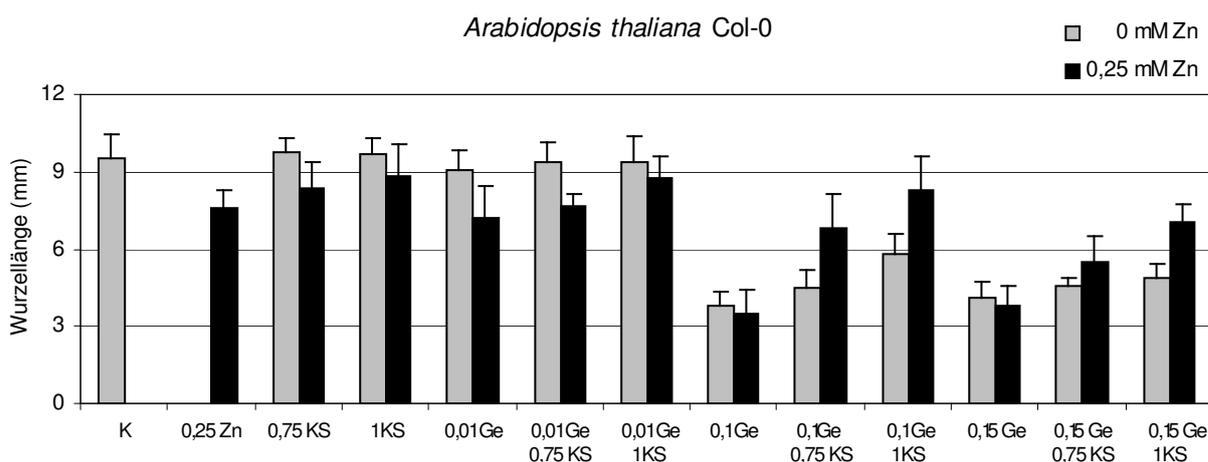
Chlorophyll	Kontrolle	0,01 $\mu\text{g/ml}$ Ge	0,05 $\mu\text{g/ml}$ Ge	0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ge	0,15 $\mu\text{g/ml}$ Ge	0,2 $\mu\text{g/ml}$ Ge
<b>Chl a</b>	0,30	0,31	0,29	0,29	0,23	0,13
<b>Chl b</b>	0,08	0,08	0,07	0,08	0,06	0,03

### 3.12.3 Einfluss von Kieselsäure auf das Wurzelwachstum nach Zink- und Germanium-Behandlung

Anhand geeigneter Konzentrationen von Zink und Germanium aus den unter Kap. 3.12.1 und Kap. 3.12.2 hervorgehenden Ergebnissen, konnte nun nach einem möglichen Einfluss von Kieselsäure gesucht werden.

Es wurden drei verschiedene Ge-Konzentrationen ausgewählt: 0,01 µg/ml Ge führte zur keiner Hemmung des Wurzellängen-Wachstums, 0,1 µg/ml Ge hemmte das Wurzellängen-Wachstum um ca. 20 % und 0,15 µg/ml Ge um ca. 31 % (Kap. 3.11.2). Außerdem wurde eine Zn-Konzentration (0,25 mM Zn<sup>2+</sup>) ausgewählt, welche ebenfalls zu einer Reduktion der Wurzellängen führt (Kap. 3.11.1). Kieselsäure wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,75 mM KS, 1 mM KS) appliziert.

Die durch 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> beobachtete Hemmung des Wurzelwachstums, wird durch zusätzliche Applikation von Kieselsäure zum Teil aufgehoben (Abb. 3.29). Die gemeinsame Applikation von 0,01 µg/ml Ge und 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> bewirkt ebenfalls eine Reduktion der Wurzellängen, welche durch zusätzliche Applikation von Kieselsäure teilweise aufgehoben werden kann. Eine besonders starke Hemmung des Wurzelwachstums (ca. 60 %) wurde durch die Applikation von 0,1 µg/ml Ge bzw. 0,1 µg/ml Ge und 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> erreicht. Der Einfluss der Kieselsäure unter diesen Versuchsbedingungen wird hier besonders deutlich. Durch Applikation von 0,75 mM KS wurde eine Verlängerung der Wurzeln um ca. 22 % nach Applikation von 0,1 µg/ml Ge bzw. um ca. 96 % nach Applikation von 0,1 µg/ml Ge und 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> beobachtet. 1 mM KS verringert die durch 0,1 µg/ml Ge hervorgerufene Hemmung um ca. 59 % und nach Applikation von 0,1 µg/ml Ge, 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> und 1 mM KS wurde sogar eine Verlängerung der Wurzeln um ca. 128 % gemessen. 0,15 µg/ml Ge bzw. 0,15 µg/ml Ge und 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> führen ebenfalls zu einer deutlichen Wachstumshemmung der Wurzeln (ca. 58-60 %). Der Einfluss der Kieselsäure auf das Wurzellängen-Wachstum ist deutlich geringer als nach Applikation von 0,1 µg/ml Ge (Abb. 3.29).



**Abb. 3.29:** Wurzellängen-Wachstum von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen unter Einfluss von Zink (Zn), Germanium (Ge) und Kieselsäure (KS)

Zn bzw. KS (mM), Ge (µg/ml); Versuchsdauer 10 d; n > 25, MW ± SE

### 3.13 Hemmung der Aufnahme von Kieselsäure und Zink in *Arabidopsis*-Spezies

Über die Aufnahme von Silizium ist relativ wenig bekannt. Aus Diatomeen wurden spezifische Si-Transporter isoliert (Hildebrand et al. 1998), die in Höheren Pflanzen aber nicht vorkommen. Es gibt aus Hemmversuchen mit 2,4-Dinitrophenol und NaCN Hinweise, dass die Aufnahme von Silizium (z.B. in Reis) ein aktiver, energieabhängiger Prozess ist (Okuda & Takahashi, 1962b).

Die Untersuchungen zur Hemmung der Aufnahme von Kieselsäure und Zink in *A. thaliana* und *A. halleri* wurden mit zwei verschiedenen Hemmstoffen vorgenommen. Die Inhibitoren 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP) und Kaliumcyanid (KCN) wirken als Atmungsketten-Entkoppler, welche den Elektronentransport von Cytochrom c auf die Cytochrom-Oxidase blockieren und somit den Aufbau eines Protonengradienten verhindern. Mit Hilfe der beiden Hemmstoffe sollte herausgefunden werden, ob Zink und Kieselsäure energieabhängig in *Arabidopsis*-Pflanzen aufgenommen werden.

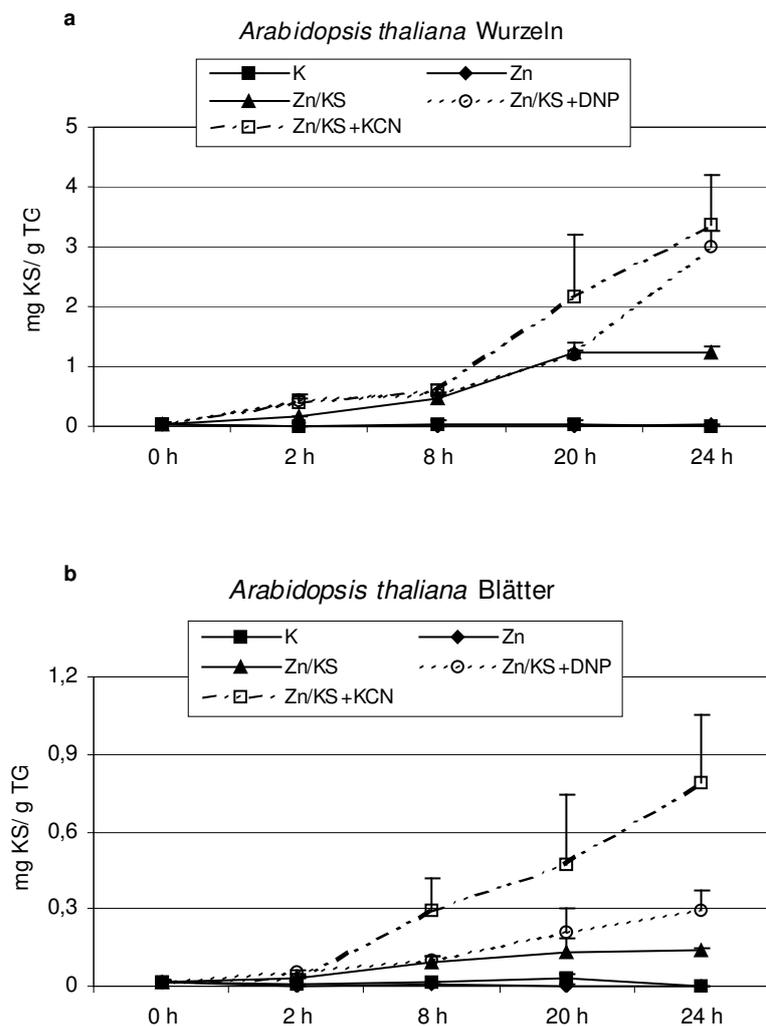
Die Applikation der Hemmstoffe 2,4-DNP und KCN erfolgte in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M über das Medium. Die Aufnahme von Kieselsäure und Zink wurde an unbehandelten Pflanzen, an Pflanzen, welche mit 0,05 mM  $Zn^{2+}$  gefüttert wurden und an Pflanzen, welche mit 0,05 mM  $Zn^{2+}$  und 0,25 mM KS behandelt wurden, untersucht. Neben diesen drei Versuchsansätzen, wurden außerdem Pflanzen mit 0,05 mM  $Zn^{2+}$  und 0,25 mM KS (Zn/KS) und zudem  $10^{-4}$  M 2,4-DNP oder  $10^{-4}$  M KCN behandelt. Der Versuch wurde über einen Zeitraum von 24 h durchgeführt. Nach je 2 h, 8 h, 20 h und 24 h wurden pro Versuchsansatz drei Pflanzen geerntet, Wurzeln und Blätter voneinander getrennt und auf die Menge an Zink und Kieselsäure untersucht.

#### 3.13.1 *Arabidopsis thaliana*

Innerhalb der ersten 8 h wurden in den Wurzeln von *A. thaliana* aller fünf Versuchsreihen nahezu gleiche KS-Konzentration gemessen. Nach 20 h ist die KS-Konzentration in den Wurzeln der 2,4-DNP bzw. KCN gefütterten *A. thaliana* Pflanzen deutlich höher im Vergleich zu den Kontrollen (K) und den Zn-behandelten Pflanzen. Auch in den Wurzeln der Zn/KS-behandelten Pflanzen wurden nach 20 h erhöhte KS-Werte nachgewiesen. Nach 24 h enthielten die Wurzeln, welche mit den Hemmstoffen 2,4-DNP und KCN behandelt wurden, die höchsten KS-Konzentrationen (Abb. 3.30 a).

Auch in den Blättern von *A. thaliana* wurden unter Einfluss von 2,4-DNP bzw. KCN deutlich höhere KS-Werte, als in Abwesenheit dieser Hemmstoffe, nachgewiesen (Abb. 3.30 b). Pflanzen, die mit KCN behandelt wurden, zeigen nach 8 h eine stetig steigende KS-

Zunahme in den Blättern während der restlichen Versuchsdauer. Nach 20 h waren außerdem erhöhte KS-Konzentrationen in den Blättern der 2,4-DNP-behandelten Pflanzen messbar. Dabei ist der KS-Gehalt im Vergleich zu den unbehandelten und den Zn-behandelten Pflanzen deutlich höher. Die KS-Werte der KCN-behandelten Kultur waren allerdings signifikant höher als die der 2,4-DNP-behandelten Kultur. Die KS-Konzentration in den Blättern der unbehandelten und Zn-behandelten Pflanzen bleibt innerhalb der 24 h unverändert. Eine geringe Zunahme von Kieselsäure wurde in den Blättern der Zn/KS-behandelten Pflanzen zwischen 8 h und 24 h gemessen.



**Abb. 3.30 a, b:** Kieselsäure-(KS)-Konzentration in *Arabidopsis thaliana* nach Applikation von 2,4-DNP und KCN

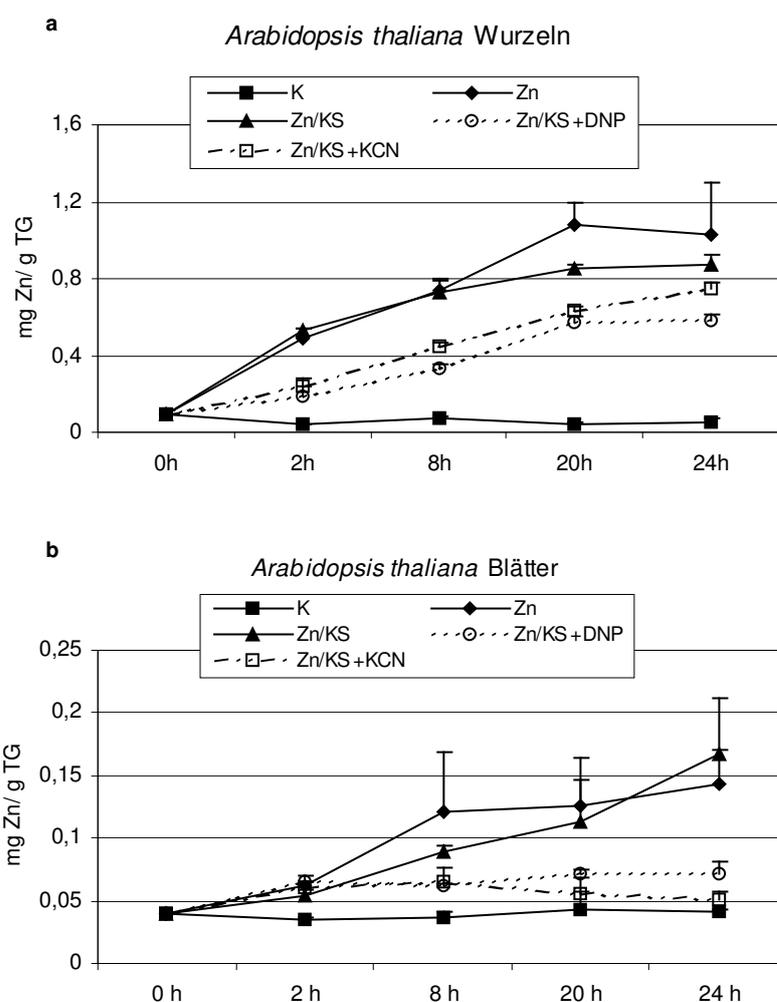
Die unter **Abb. 3.30 a** und **b** dargestellten Werte für die Kontrolle und die Werte nach Zn-Applikation liegen aufgrund der geringen Messdaten übereinander.

K - Kontrolle; Zn - 0,05 mM  $Zn^{2+}$ ; Zn/KS - 0,05 mM  $Zn^{2+}$  und 0,25 mM KS; DNP -  $10^{-4}$  M 2,4-Dinitrophenol;

KCN -  $10^{-4}$  M Kaliumcyanid; h - Stunden; KS-Messung photometrisch, n = 3, MW  $\pm$  SE

Im Gegensatz zur Aufnahme von Kieselsäure wird die Zn-Aufnahme durch  $10^{-4}$  M 2,4-DNP oder  $10^{-4}$  M KCN deutlich gehemmt. Bereits nach 2 h wurde in den hemmstoff-behandelten Wurzeln von *A. thaliana* deutlich weniger Zink gemessen, als in den Wurzeln Zn- bzw. Zn/KS-behandelter Pflanzen (Abb. 3.31 a). Über den gesamten Versuchszeitraum von 24 h sind die Zn-Konzentrationen in den Wurzeln der Zn- und Zn/KS-behandelten Pflanzen gegenüber den mit Hemmstoff zugesetzten Kulturen signifikant höher. Dabei ist nach Applikation von  $10^{-4}$  M 2,4-DNP oder  $10^{-4}$  M KCN keine vollständige Hemmung der Zn-Aufnahme in den Wurzeln beobachtet worden (Vergleich mit Kontrolle)

Zudem sind die Zn-Konzentrationen in den Blättern der 2,4-DNP und KCN-behandelten Pflanzen deutlich reduziert im Vergleich zu den Blättern der Pflanzen, die mit Zn oder Zn/KS behandelt wurden (Abb. 3.31 b). Wie auch für die Wurzeln nachgewiesen wurde, bewirkt eine Applikation von  $10^{-4}$  M 2,4-DNP oder  $10^{-4}$  M KCN keine totale Hemmung des Zn-Transportes in die Blätter. Die Zn-Werte sind im Vergleich zu den unbehandelten Blättern deutlich höher.



**Abb. 3.31 a, b:** Zink-(Zn)-Konzentration in *Arabidopsis thaliana* Hydrokulturen nach Applikation von 2,4-DNP und KCN

K - Kontrolle; Zn - 0,05 mM  $Zn^{2+}$ ; Zn/KS - 0,05 mM  $Zn^{2+}$  und 0,25 mM KS; DNP -  $10^{-4}$  M 2,4-Dinitrophenol; KCN -  $10^{-4}$  M Kaliumcyanid; h - Stunden; Zn-Messung mittels AAS; n = 3, MW  $\pm$  SE

3.13.2 *Arabidopsis halleri*

In *A. halleri* führen die Applikationen von  $10^{-4}$  M 2,4-DNP oder  $10^{-4}$  M KCN nach 8 h ähnlich wie in *A. thaliana* zu einer Erhöhung der KS-Konzentration in den Wurzeln (Abb. 3.32 a). Nach 20 h und 24 h steigt der Gehalt an Kieselsäure in den Wurzeln weiter an. In den Wurzeln der Zn/KS-behandelten Pflanzen steigt der KS-Gehalt ebenfalls 8 h und erreicht nach 24 h ähnlich hohe KS-Konzentrationen wie die Pflanzen, denen zudem noch einer der beiden Hemmstoffe appliziert wurde. Die Wurzeln der unbehandelten bzw. Zn-behandelten Pflanzen zeigen über den gleichen Zeitraum keine Veränderung in ihrem KS-Gehalt.

In den Blättern von *A. halleri* bewirkt nur der Hemmstoff 2,4-DNP bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M eine Zunahme der KS-Konzentration. Alle anderen Behandlungen zeigen innerhalb von 24 h nach Applikation keine signifikante Änderung ihres KS-Gehaltes (Abb. 3.32 b).

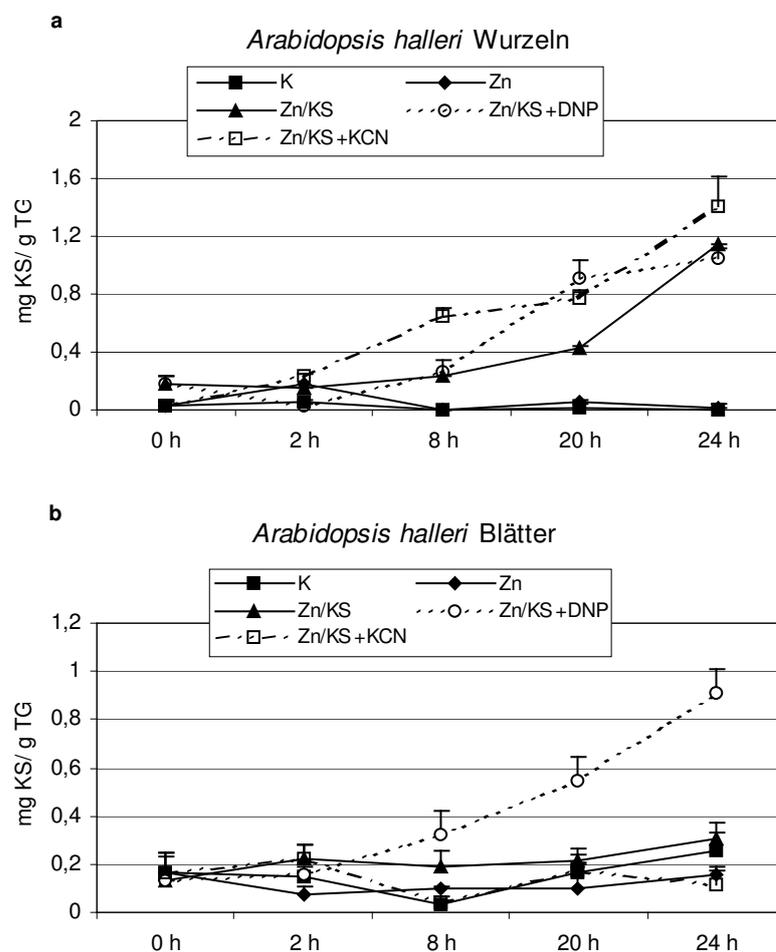


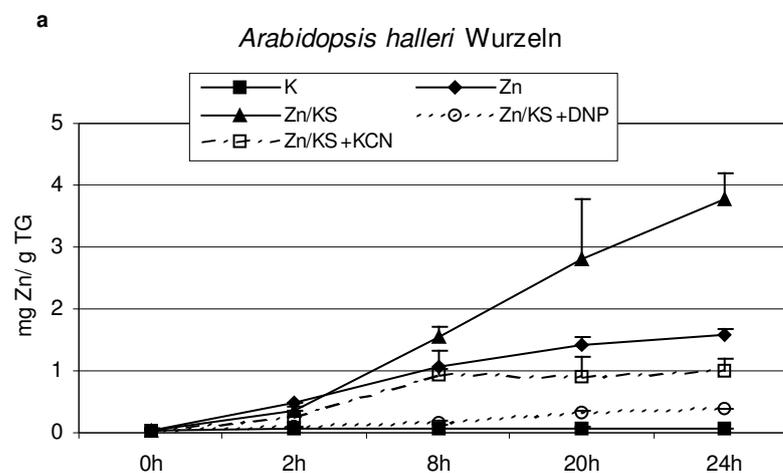
Abb. 3.32 a, b: Kieselsäure-(KS)-Konzentration in *Arabidopsis halleri* nach Applikation von 2,4-DNP und KCN

Die unter Abb. 3.32 a dargestellten Werte für die Kontrolle und die Werte nach Zn-Applikation liegen aufgrund der geringen Messdaten übereinander.

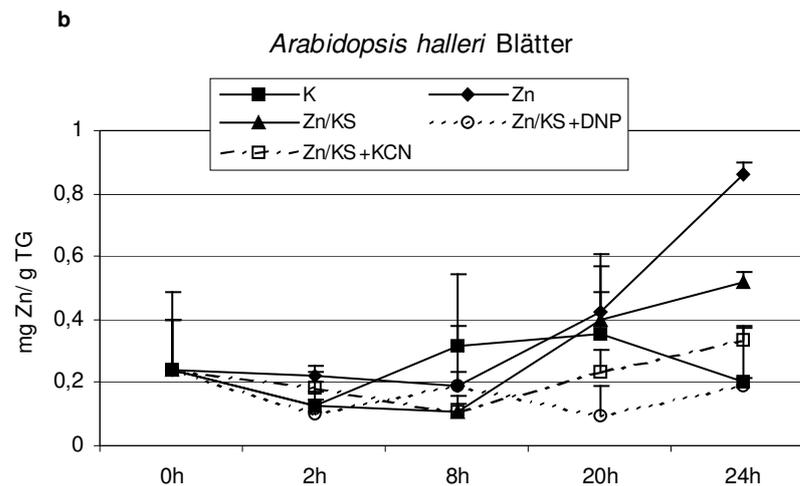
K- Kontrolle; Zn- 0,05 mM  $Zn^{2+}$ ; Zn/KS- 0,05 mM  $Zn^{2+}$  und 0,25 mM KS; DNP-  $10^{-4}$  M 2,4-Dinitrophenol; KCN -  $10^{-4}$  M Kaliumcyanid; h - Stunden; KS-Bestimmung photometrisch; n = 3, MW  $\pm$  SE

Ähnlich wie auch bei *A. thaliana* wird die Aufnahme von Zink durch  $10^{-4}$  M 2,4-DNP oder  $10^{-4}$  M KCN in *A. halleri* signifikant gehemmt. (Abb. 3.33 a). Die Applikation von Zn/KS führt zu einem Anstieg der Zn-Konzentration in den Wurzeln von *A. halleri* Pflanzen in Abhängigkeit von der Zeit. Der Anstieg der Zn-Konzentration in den Wurzeln nach Einzelapplikation von Zink ist ebenfalls zeitabhängig. Zudem enthalten diese Wurzeln deutlich weniger Zink, als nach Applikation von Zn/KS. 2,4-DNP und KCN bewirken eine eindeutige Hemmung der Zn-Aufnahme. Wie auch bei *A. thaliana* beobachtet wurde, erfolgt keine vollständige Hemmung der Zn-Aufnahme (Vergleich mit Kontrolle).

In den Blättern von *A. halleri* wird erst nach einer Inkubation von 20 h ein Unterschied zwischen den verschiedenen behandelten Pflanzen deutlich (Abb. 3.33 b). Nach 20 h liegen die Zn-Werte in den Pflanzen, die mit 2,4-DNP oder KCN behandelt wurden, sogar unter den Zn-Konzentrationen der Kontrollen. Nach 24 h sind eindeutig höhere Zn-Werte in den Blättern der Zn und Zn/KS-behandelten Pflanzen nachweisbar, als in den Blättern der Pflanzen, die zusätzlich noch mit 2,4-DNP oder KCN behandelt wurden. Die Zn-Konzentrationen in den Blättern der KCN-behandelten Pflanzen ist wieder höher, als die der unbehandelten Pflanzen. Nach 24 h waren die Zn-Werte in den Blättern der DNP-behandelten Pflanzen ebenfalls gegenüber dem 20 h Wert leicht erhöht. DNP-behandelte und unbehandelte Pflanzen enthalten nach 24 h ähnlich hohe Zn-Konzentrationen in den Blättern.



**Abb. 3.33 a:** Zink-(Zn)-Konzentration in *Arabidopsis halleri* nach Applikation von 2,4-DNP und KCN  
 K- Kontrolle; Zn- 0,05 mM  $Zn^{2+}$ ; Zn/KS- 0,05 mM  $Zn^{2+}$  und 0,25 mM KS; DNP-  $10^{-4}$  M 2,4-Dinitrophenol;  
 KCN -  $10^{-4}$  M Kaliumcyanid; h - Stunden; Zn-Messung mittels AAS; n = 3, MW  $\pm$  SE

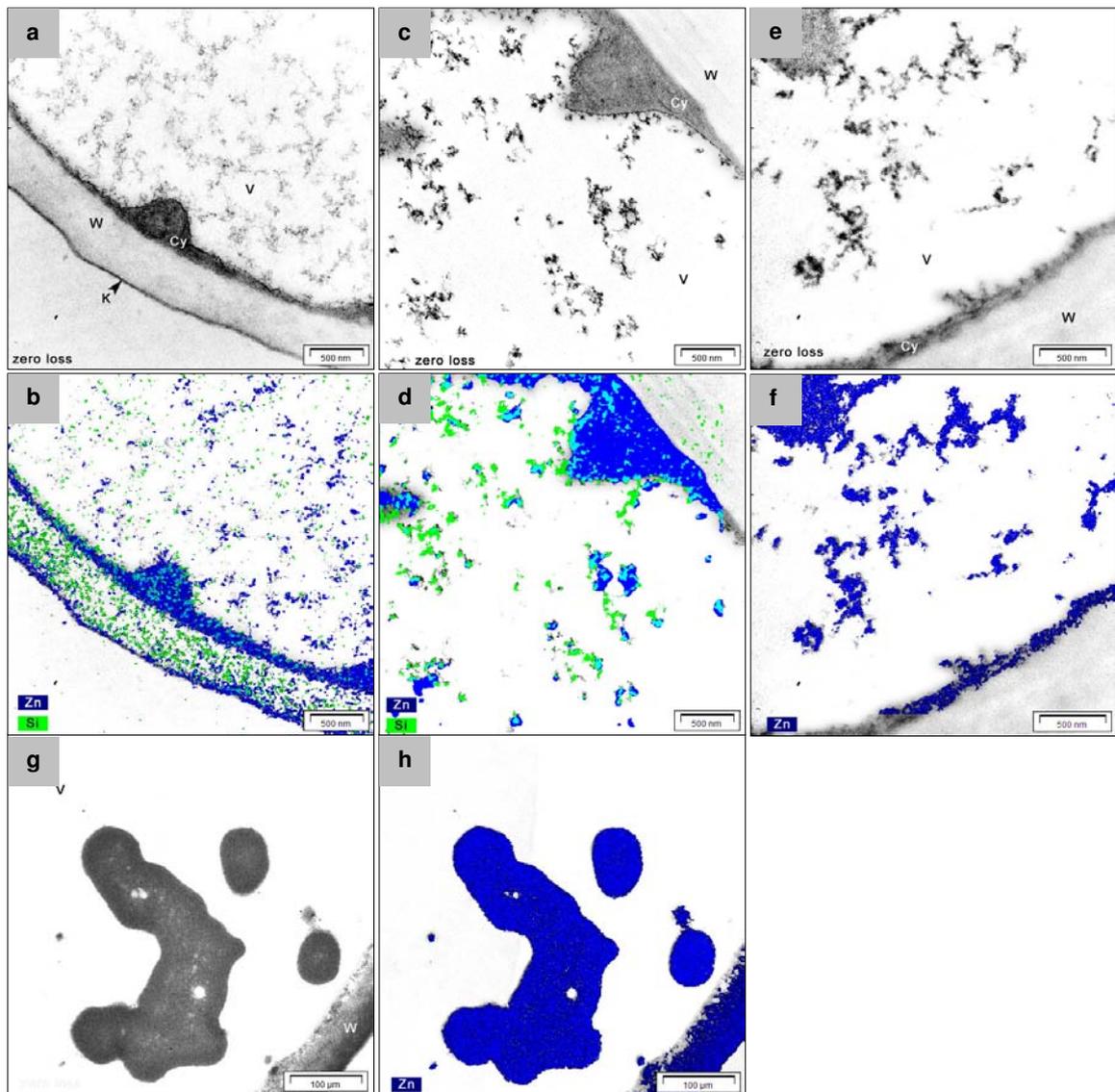


**Abb. 3.33 b:** Zink-(Zn)-Konzentration in *Arabidopsis halleri* nach Applikation von 2,4-DNP und KCN  
 K- Kontrolle; Zn- 0,05 mM  $Zn^{2+}$ ; Zn/KS- 0,05 mM  $Zn^{2+}$  und 0,25 mM KS; DNP-  $10^{-4}$  M 2,4-Dinitrophenol;  
 KCN -  $10^{-4}$  M Kaliumcyanid; h - Stunden; Zn-Messung mittels AAS; n = 3, MW  $\pm$  SE

### 3.14 Speicherung von Zink in *A. thaliana* Ökotyp Ler-1 WT und der Mutante tt4

ESI-Bilder zeigen nach Zn-Stress in *A. thaliana* Col-0 (Abb. 3.34 a, b) und besonders in *A. halleri* (Abb. 3.34 g, h) große Zn-Ablagerungen in den Vakuolen. Die Bindungspartner dieser Zn-Ablagerungen sind bisher nicht bekannt. In den Vakuolen der Cu-toleranten *Armeria maritima* dienen phenolische Verbindungen zur Komplexbildung hoher Cu-Konzentrationen (Neumann et al., 1995). Daher war es von Interesse, ob Flavonole an dieser Zn-Bindung in den Vakuolen von *A. thaliana* Col-0 und *A. halleri* beteiligt sind. Die *A. thaliana* Ler-1 Mutante tt4 ist nicht in der Lage Flavonole zu bilden und eignet sich daher zum Nachweis solcher Ablagerungen in den Vakuolen.

Es wurden Hydrokulturen von Ler-1 WT und Ler-1 Mutante tt4 mit 0,05 mM  $Zn^{2+}$  behandelt und elektronenmikroskopisch untersucht. Wie die Abb. 3.34 c, d (Ler-1 WT) bzw. die Abb. 3.34 e, f (Ler-1 Mutante tt4) zeigen, finden sich in beiden Ler-1 Typen Zn-Ablagerungen in der Vakuole, die sich in der Größe und Anzahl der in *A. thaliana* Col-0 auftretenden Ablagerung nicht unterscheiden. Während sowohl in *A. halleri* (Abb. 3.34 g, h) als auch in der Ler-1 Mutante tt4 nur Zink gefunden wurde, finden sich vor allem im Wildtyp von Ler-1 auch große Mengen an Silizium. In *A. thaliana* Col-0 sind Si-Vorkommen vorwiegend in der Zellwand und nur vereinzelt in der Vakuole, zu sehen.



**Abb. 3.34 a-h: Verteilung von Zink (Zn) und Silizium (Si) in *Arabidopsis thaliana* und *A. halleri* Blättern**

a - zero loss-Bild von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0

b - ESI-Bild zur Verteilung von Zn und Si

Lokalisation von Zn (blau) in der Vakuole (V) und im Cytoplasma (Cy)

Lokalisation von Si (grün) in der Vakuole (V) und der Zellwand (W), K: Kutikula

c - zero loss-Bild von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Ler-1

d - ESI-Bild zur Verteilung von Zn und Si

Lokalisation von Zn (blau) in der Vakuole (V) und im Cytoplasma (Cy)

Lokalisation von Si (grün) in der Vakuole (V) und der Zellwand (W)

e - zero loss-Bild von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Ler-1 Mutante tt4

f - ESI-Bild zeigt die Verteilung von Zn

Lokalisation von Zn (blau) in der Vakuole (V) und im Cytoplasma (Cy)

g - zero loss-Bild von *Arabidopsis halleri*

h - ESI-Bild zeigt die Verteilung von Zn

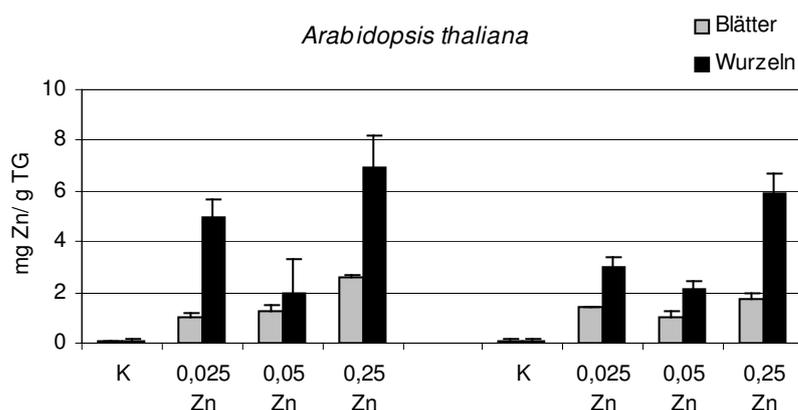
Lokalisation von Zn (blau) in der Vakuole (V), im Cytoplasma (Cy) und in der Zellwand (W)

### 3.14.1 Aufnahme von Zink in *A. thaliana* Ökotyp Ler-1 WT und der Mutante tt4

Neben den elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Ablagerung von Zink in der Vakuole wurde auch die Aufnahme von Zink der hydroponisch angezogenen *A. thaliana* Pflanzen des Ökotyps Ler-1 Wildtyp und der tt4 Mutante untersucht. Die Untersuchungen sollten Rückschlüsse geben, ob die Fähigkeit zur Bildung von flavonolischen Verbindungen im Zusammenhang mit einer erhöhten Zn-Aufnahme steht.

In einer aufsteigenden Zn-Reihe (bis 0,25 mM Zn<sup>2+</sup>) nimmt der Wildtyp eindeutig höheren Mengen Zink auf (Abb. 3.35). So enthalten die Wurzeln des Wildtyps nach 0,025 mM Zn<sup>2+</sup>-Applikation 5 mg Zn / g TG und die Wurzeln der Mutante nur 3 mg Zn / g TG. Nach Applikation von 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> wurden in den Wurzeln des Wildtyps 6,9 mg Zn / g TG und in der Mutante 5,9 mg Zn / g TG gemessen. Während nach 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> die Mutante doppelt soviel Zink aufnimmt wie nach Applikation von nur 0,025 mM Zn<sup>2+</sup>, liegt der Faktor beim Wildtyp bei 1,4.

Die Blätter enthalten sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante tt4 weniger Zink als deren Wurzeln. Für den Wildtyp wurden erhöhte Zn-Konzentrationen in den Blättern in Abhängigkeit der Medienkonzentration gemessen. Bei der Mutante zeigen die Blätter nach Applikation von 0,05 mM Zn<sup>2+</sup> den geringsten Zn-Wert. Dabei fällt auf, dass nach dieser Applikation auch die Wurzeln beider Linien deutlich weniger Zink enthalten, als die Wurzeln nach Applikation von 0,025 mM Zn<sup>2+</sup> (Abb. 3.35).



**Abb. 3.35:** Zink-(Zn)-Konzentration in *Arabidopsis thaliana* Ler-1 Wildtyp und Linie tt4 Pflanzen  
K - Kontrolle, Zn (mM); Versuchsdauer 7 d; Zn-Messung mittels AAS; n = 3, MW ± SE

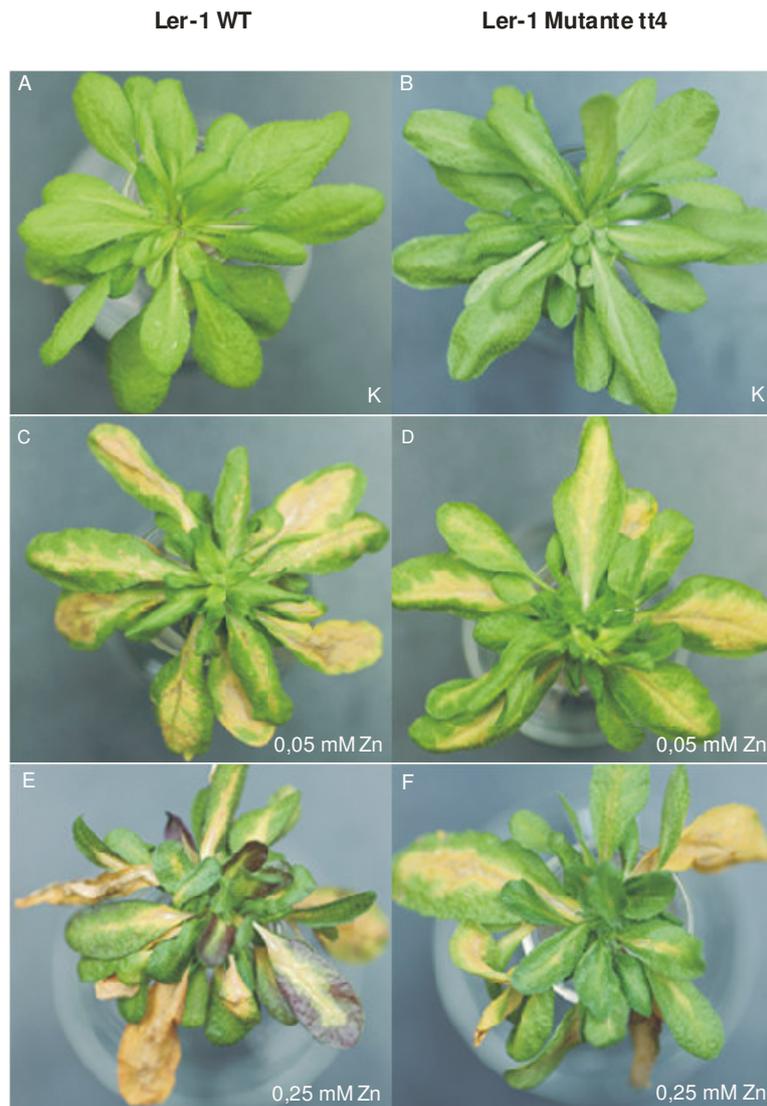
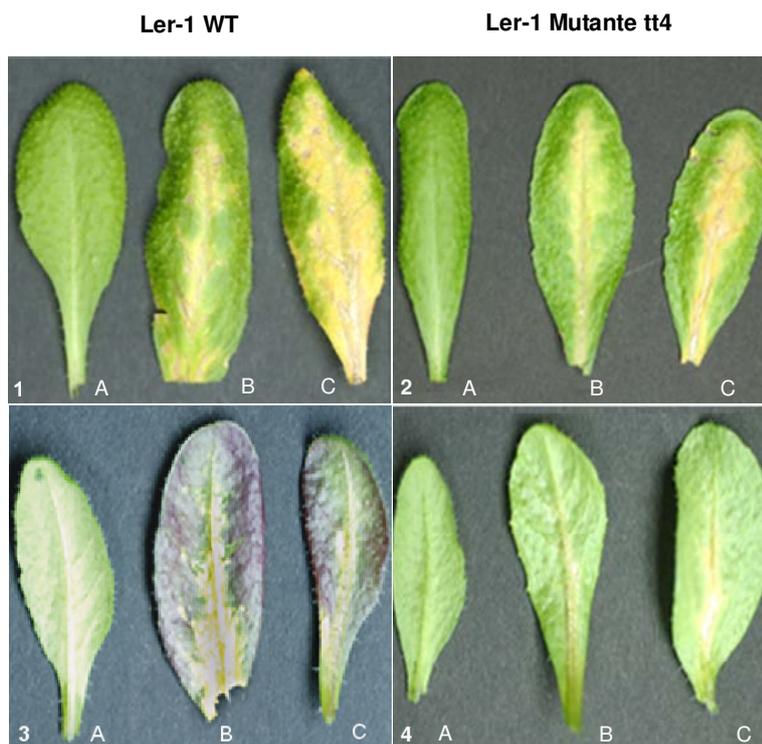


Abb. 3.36 A-F: *Arabidopsis thaliana* Hydrokulturen nach Applikation von Zink (Zn)

A: Ler 1 Wildtyp Kontrolle (K),    B: Ler 1- Mutante tt4 Kontrolle (K)  
 C: Ler 1 Wildtyp 0,05 mM Zn,    D: Ler 1- Mutante tt4 0,05 mM Zn  
 E: Ler 1 Wildtyp 0,25 mM Zn,    F: Ler 1 Mutante tt4 0,25 mM Zn

In den Abb. 3.36 A-F ist dem *A. thaliana* Ler-1 Wildtyp (links) die Ler-1 Mutante tt4 (rechts) gegenübergestellt. A und B zeigen die unbehandelten Pflanzen, C und D die mit 0,05 mM  $Zn^{2+}$  und E und F die mit 0,25 mM  $Zn^{2+}$  behandelten Pflanzen. Unbehandelte Pflanzen des Ler-1 Wildtyps und der Ler-1 Mutante tt4 zeigen keine makroskopischen Unterschiede. Nach Applikation von 0,05 mM  $Zn^{2+}$  sind starke Nekrosen auf den Blättern beider Ler-1 Typen zu erkennen. Die Zugabe von 0,25 mM  $Zn^{2+}$  zum Medium führt zur weiteren Verstärkung der Nekrosen auf den Blättern beider Pflanzen. Die älteren Blätter sind bereits vertrocknet und abgestorben. Auf der Unterseite der Blätter des Wildtyps tritt nach Zn-Behandlung Anthocyanfärbung auf. Die Blätter der Mutante tt4 zeigen nach Zn-Applikation auf ihrer Unterseite keine Anthocyanfärbung (Abb. 3.37 1-4).



**Abb. 3.37 1-4: *A. thaliana* Ler-1 Wildtyp und Mutante tt4 Blätter nach Applikation von Zink**

1 - Blattoberseite Ler-1 WT

3 - Blattunterseite Ler-1 WT

2 - Blattoberseite Ler-1 Mutante tt4

4 - Blattunterseite Ler-1 Mutante tt4

A - Kontrolle, B - 0,05 mM Zn, C - 0,25 mM Zn

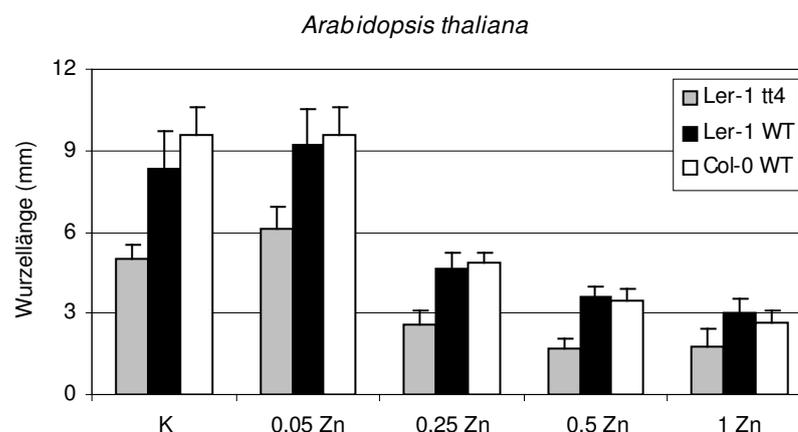
In Abb. 3.37 1-4 sind einzelne Blätter des Ler-1 Wildtyps und der Mutante tt4 nach Zn-Behandlung dargestellt. Die Oberseite und Unterseite von Blättern des Wildtyps und der Mutante tt4 zeigen unter normalen Wachstumsbedingungen keine makroskopischen Unterschiede (1A und 2A, 3A und 4A). Nach Applikation von 0,05 mM  $Zn^{2+}$  (B) ist die Unterseite des Ler-1 Wildtyps (3B) anthocyanfarben und auf der Oberseite (1B) erkennt man Nekrosen, die sich die Blatthauptader entlang ziehen. Bei der tt4-Mutante sind unter den gleichen Bedingungen auf der Unterseite (4B) keine Verfärbungen sichtbar. Die Blattoberseite (2B) ist besonders an der Hauptblattader stark nekrotisiert. Nach Zugabe von 0,25 mM  $Zn^{2+}$  (C) zum Medium treten auf den Blattoberseiten (1C, 3C) beider Ler-1 Typen verstärkte nekrotische Reaktionen auf. Dabei ist das Blatt vom Ler-1 WT fast vollständig nekrotisiert. Die Unterseite des Blattes der Ler-1 Mutante (4C) zeigt keine Anzeichen einer Anthocyanbildung im Gegensatz zur Blattunterseite des Wildtyps (2C).

### 3.14.2 Einfluss von Zink auf das Wurzellängen-Wachstum von *A. thaliana* Ler-1 WT und deren Mutante tt4

Aufgrund der Beobachtungen in der Aufnahme und Verteilung von Zink (Kap. 3.12.1) und der unterschiedlichen Reaktionen der Blätter nach Applikation von Zink sollte anhand von Wurzel-Wachstums-Assays untersucht werden, ob sich das unterschiedliche Verhalten zwischen der Ler-1 Mutante tt4 und deren Wildtyp auch auf die Wurzellängen auswirkt.

Anhand verschiedener Zn-Konzentrationen im Medium, wurden die Wurzellängen von 10 d alten *A. thaliana* Keimlingen bestimmt. Neben *A. thaliana* Ler-1 WT und deren Mutante tt4, wurden auch der Ökotyp Col-0 zum Vergleich herangezogen.

Bereits unter Kontrollbedingungen betragen die Wurzellängen der Mutante tt4 nur ca. 60 % der Wurzellängen des Ler-1 Wildtyps (Abb. 3.38). Die Wurzeln des Col-0 WT und des Ler-1 WT zeigen unter den gegebenen Zn-Applikationen nahezu gleiches Längenwachstum. Das Längenverhältnis der Wurzeln unter Kontrollbedingungen zwischen der Ler-1 Mutante tt4 und des Wildtyps ändert sich nach Applikationen verschiedener Zn-Konzentrationen zum Medium wie folgt. Nach Applikation von 0,05 mM Zn<sup>2+</sup> werden ca. 66 %, nach Zugabe von 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> ca. 55 %, nach Zugabe von 0,5 mM Zn<sup>2+</sup> ca. 47 % und nach Applikation von 1 mM Zn<sup>2+</sup> ca. 60 % der Wurzellänge des Wildtyps im Vergleich zur Mutante erreicht. Während 0,05 mM Zn<sup>2+</sup> das Wurzelwachstum aller drei Linien fördert, bewirken 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> eine Reduktion der Wurzellängen um ca. 50 %. Nach einer Applikation von 0,5 mM Zn<sup>2+</sup> ist das Wurzelwachstum über ca. 50 % reduziert und nach 1 mM Zn<sup>2+</sup>-Behandlung sind die Wurzeln von Col-0 und Ler-1 WT kaum noch länger als die Wurzeln der Mutante tt4.

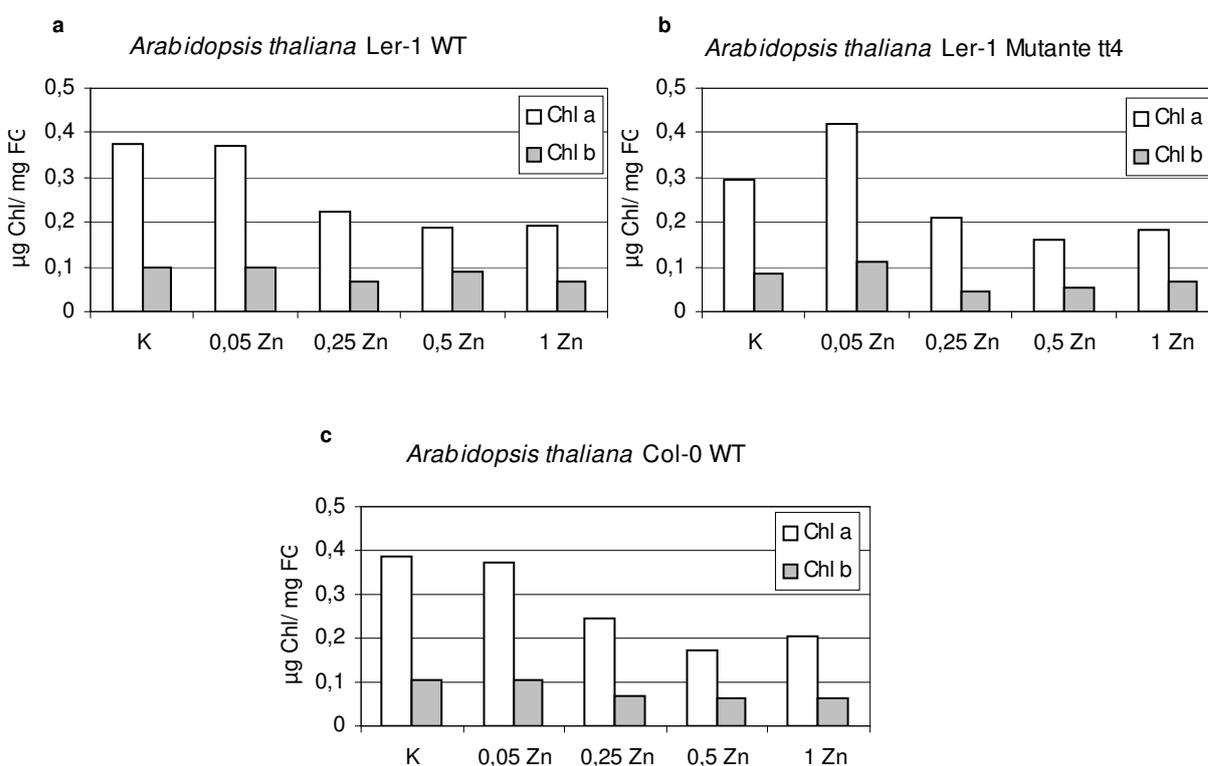


**Abb. 3.38:** Wurzellängen-Wachstum von *Arabidopsis thaliana* Col-0, Ler-1 WT und Ler-1 Linie tt4 Keimlingen unter Einfluss von Zink (Zn)

K - Kontrolle, Zn (mM); Versuchsdauer 10 d; n > 25, MW ± SE

### 3.14.2.1 Chlorophyllbestimmung

Außerdem wurde der Gesamtchlorophyllgehalt der Blätter, der auf einer Platte gewachsenen Keimlinge, bestimmt. Dabei enthielten die Blattextrakte der Wildtypen von Col-0 und Ler-1 deutlich höhere Chlorophyllwerte als die Blattextrakte der Ler-1 Mutante tt4 (Abb. 3.39). Nach Behandlung der Keimlinge mit 0,05 mM  $Zn^{2+}$  steigt der Chlorophyllgehalt der Mutante gegenüber den unbehandelten Keimlingen deutlich an, während der Chlorophyllgehalt der beiden Wildtypen nahezu unverändert ist. Nach Applikation von 0,25 mM  $Zn^{2+}$  konnte für alle drei Linien eine Abnahme von Chlorophyll a /b nachgewiesen werden.



**Abb. 3.39 a-c:** Chlorophyllbestimmung von Blattextrakten von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen nach Zugabe von Zink (Zn)

a - Ler-1 WT

b - Ler-1 Linie tt4

c - Col-0 WT

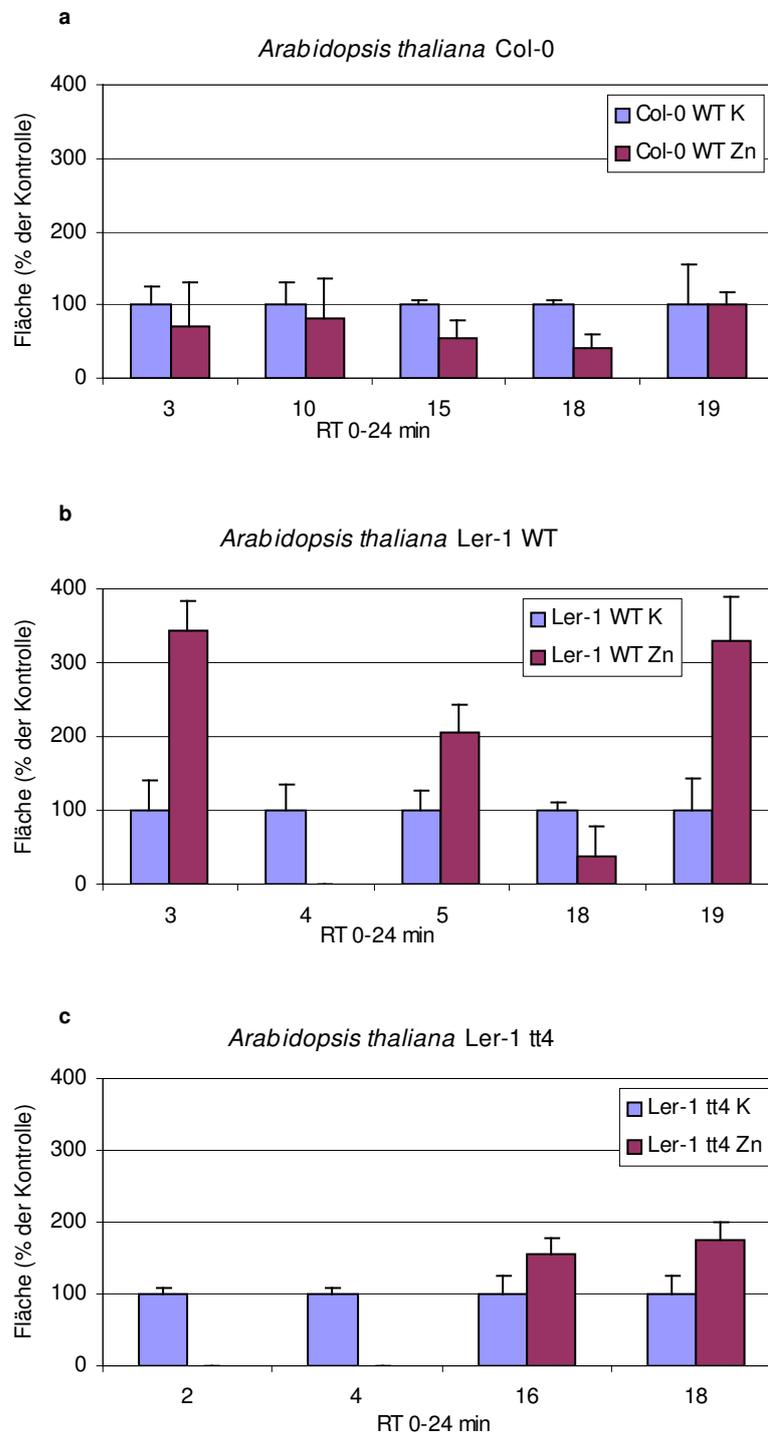
K - Kontrolle, Zn (mM); Zeitraum 10 d

### 3.14.3 Vorkommen und Akkumulation phenolischer Verbindungen nach Zink-Stress

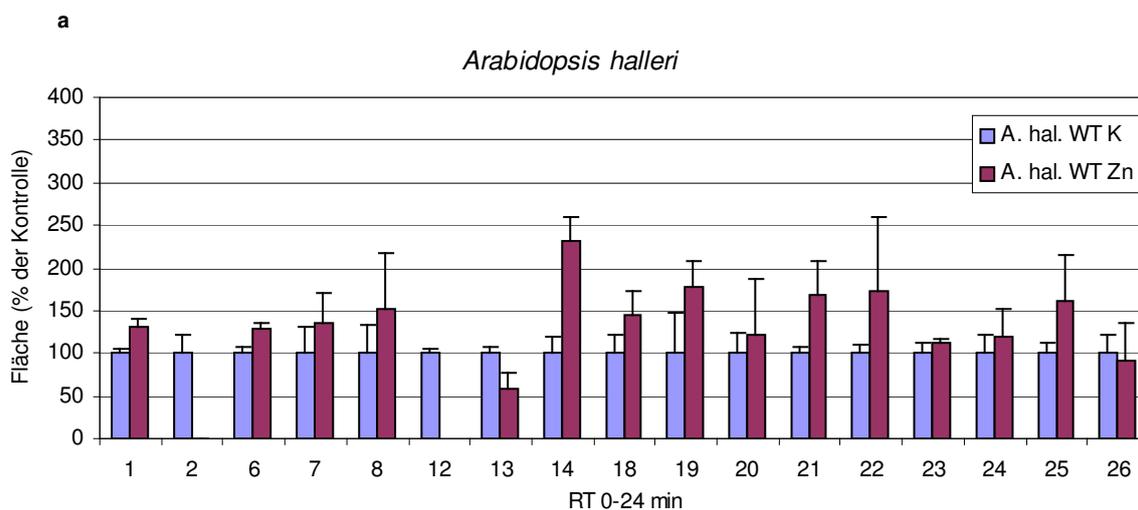
Das Auftreten von Zn-Präzipitaten in der Vakuole verschiedener *Arabidopsis*-Ökotypen könnte teilweise durch die Bindung von Zink mit Flavonolen erfolgen (Abb. 3.34 a-h). Für die *A. thaliana* Ler-1 Mutante tt4 ist bekannt, dass sie keine Flavonole synthetisieren kann (Koornneef 1990; Shirley et al., 1995).

Aus diesem Grund wurden Blattextrakte von *Arabidopsis thaliana* Ökotypen Col-0, Ler-1 WT und der Mutante tt4 bzw. von *Arabidopsis halleri* auf das Vorkommen von phenolischen Verbindungen untersucht. Von jedem Ökotyp wurden Blattextrakte unbehandelter Pflanzen und von Pflanzen, die mit 0,05 mM Zn<sup>2+</sup> behandelt wurden, hergestellt. Die Flavonoide wurden an Hand ihrer UV-Spektren identifiziert. Eine Aufklärung der chemischen Struktur wurde nicht vorgenommen. Auf den ersten Blick fällt auf, dass das Auftreten phenolischer Verbindungen in den Extrakten von *A. halleri* dominiert (Abb. 3.40 a-d). Die unter 6, 7, 8 und 13 aufgeführten phenolischen Verbindungen wurden nur in *A. halleri* Extrakten gefunden (Abb. 3.40 d). Zudem sind die unter 20-26 aufgeführten Flavonoidkonjugate ausschließlich Verbindungen, die nur in den Blattextrakten von *A. halleri* detektiert wurden. Dabei ist der Gehalt der jeweiligen phenolischen Verbindung, bis auf zwei Ausnahmen (13 - Flavonoid, 26 - Flavonoidkonjugat), stets höher in den Extrakten Zn-behandelter *A. halleri* Blätter als in den unbehandelten Blättern (Abb. 3.40 d). Wie bereits angenommen, wurden für die *A. thaliana* Ler-1 tt4-Mutante ausschließlich Sinapinsäureester-Verbindungen gefunden (Abb. 3.40 c). Das Spektrum dieser Verbindungen ist sehr klein. Es wurden nur vier Sinapinsäureester-Verbindungen detektiert, die der Ler-1 tt4-Mutante zugeordnet werden konnten ((2 - Sinapinsäureester, 4 - Sinapinsäureester, 16 - x, 18 - Sinapoylmalat (Abb. 3.40 c)). Dabei wurden die unter 2 und 4 aufgeführten Verbindungen nur in den unbehandelten Extrakten gefunden. Die unter 16 und 18 dargestellten Sinapinsäureester-Verbindungen sind hingegen nach Zn-Applikation im Vergleich zu den unbehandelten Extrakten erhöht. Die Anzahl der Flavonoide aus *A. thaliana* Ler-1 WT Blattextrakten (Abb. 3.40 b), sowie aus Extrakten des Ökotyps Col-0 WT (Abb. 3.40 a) sind im Vergleich zu *A. halleri* (Abb. 3.40 d) klein. Im Gegensatz dazu waren aber die Blattextrakte, die aus Zn-behandelten Blättern gewonnen wurden beim Ökotyp Ler-1 WT stets höher als deren unbehandelte Extrakte. Beim Ökotyp Col-0 WT war das nicht der Fall. Das Flavonoid (3) bei einer Retentionszeit (RT) von 12,32, das Flavonoid (10) bei einer RT von 15,792 und das Flavonoid (19) bei einer RT von 18,735 sind nach Zn-Applikation entweder gleich stark ausgeprägt oder sogar etwas kleiner. Bemerkenswert ist das gemeinsame aber unterschiedlich starke Auftreten des Sinapoylmalats (18) bei einer RT von 18,029 (Abb. 3.40 e). In den unbehandelten Extrakten der *A. thaliana* Ökotypen Col-0 und Ler-1 trat diese Verbindung stärker auf als in den Extrakten, deren Blätter mit Zink behandelt wurden. Genau umgekehrt ist das Verhältnis der Extrakte von *A. halleri* und der Ler-1 Mutante tt4. Hier enthalten die Extrakte, die aus Zn-behandelten Blättern gewonnen wurden eindeutig mehr Sinapoylmalat. Von Interesse ist auch das Flavonoid (19), welches bei einer RT von 18,735 auftrat (Abb. 3.40 e). Wie erwartet, kommt diese Verbindung in der Mutante nicht vor. Bei *A. thaliana* Col-0 löst die Zn-Applikation keine Veränderung im Gehalt dieses Flavonoids aus. Extrakte aus unbehandelten und aus Zn-gefütterten Blättern enthalten gleich hohe

Konzentrationen. Bei *A. halleri* und dem Wildtyp von Ler-1 tritt dagegen nach Behandlung der Blätter mit Zink eine deutliche Erhöhung der Konzentration dieses Flavonoids im Vergleich zu deren unbehandelten Blättern auf (Abb. 3.40 e).

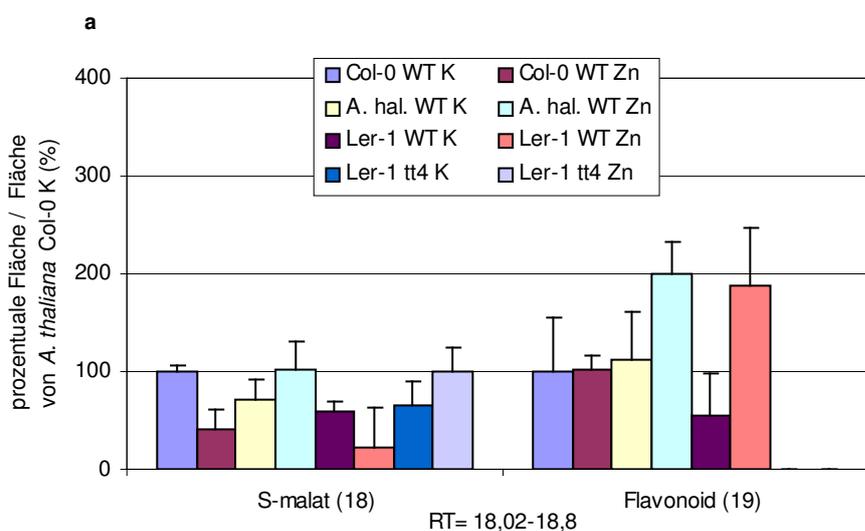


**Abb. 3.40 a-c:** Vorkommen phenolischer Verbindungen in unbehandelten und Zink-(Zn)-behandelten Blattextrakten von *A. thaliana* Col-0, Ler-1 WT bzw. deren Mutante tt4  
n = 3, MW ± SE, RT - Retentionszeit; (RT: 2 - 11.31 (Sinapinsäureester), 3 - 12.32 (Flavonoid), 4 - 12.994 (Sinapinsäureester), 5 - 13.736 (Flavonoidkonjugat), 10 - 15.792 (Flavonoid), 15 - 17.626 (Sinapinsäureester), 16 - 17.732 (x), 18 - 18.029 (Sinapoylmalat), 19 - 18.735 (Flavonoid))



**Abb. 3.40 d:** Vorkommen phenolischer Verbindungen in unbehandelten und Zink-(Zn)-behandelten Blattextrakten von *A. halleri*

n = 3, MW ± SE, RT- Retentionszeit; (RT: **1** - 9.46 (Flavonoidkonjugat), **2** - 11.31 (Sinapinsäureester), **6** - 13.764 (Flavonoid), **7** - 14.709 (Flavonoidkonjugat), **8** - 15.539 (Sinapinsäureester), **12** - 16.293 (Sinapinsäureester), **13** - 16.516 (Flavonoid), **14** - 17.172 (Flavonoid), **18** - 18.029 (Sinapoylmalat), **19** - 18.735 (Flavonoid), **20** - 18.938 (Flavonoidkonjugat), **21** - 19.629 (Flavonoidkonjugat), **22** - 19.923 (Flavonoidkonjugat), **23** - 20.335 (Flavonoidkonjugat), **24** - 21.197 (Flavonoidkonjugat), **25** - 21.395 (Flavonoidkonjugat), **26** - 23.507 (Flavonoidkonjugat))



**Abb. 3.40 e:** Vorkommen phenolischer Verbindungen in unbehandelten und Zink-(Zn)-behandelten Blattextrakten von *A. thaliana* Col-0 WT, Ler-1 WT bzw. deren Mutante tt4 und *A. halleri*

n = 3, MW ± SE; RT- Retentionszeit; S – Sinapinsäureester; (RT: **18** - 18.029, **19** - 18.735)

## 4 Diskussion

Einige Pflanzen haben durch eine Reihe verschiedener Mechanismen, wie verminderte Aufnahme, Bindung an Bestandteile der Zellwand, extrazelluläre Exudate, aktive und passive Ausscheidung über die Blätter und Komplexierung in der Vakuole, die Fähigkeit entwickelt, sich vor hohen SM-Konzentrationen im Boden zu schützen. Die Fähigkeit zur erhöhten Toleranz gegenüber Metall-Ionen ist von den biochemischen Besonderheiten einer Spezies und dem Metall abhängig (Verkleij & Schat, 1990). Neben diesen Mechanismen zur Metall-Detoxifizierung, wird zunehmend auch das ubiquitär vorkommende Element Silizium in Zusammenhang mit der Schwermetall-(SM)-Toleranz gebracht (Barceló et al., 1993; Hammond et al., 1995; Horst et al., 1999; Neumann et al., 1999). In schwermetall-toleranten *Silene cucubalus* Pflanzen wurden kristalline Einschlüsse von SiO<sub>2</sub> in den Interzellularen des Blattparenchyms, zwischen Zellwand und Plasmamembran sowie in der Vakuole gefunden (Neumann et al., 1997a). In schwermetall-toleranten *Arabidopsis halleri* Pflanzen, die auf Zn-belasteten Böden wachsen, enthält das Cytoplasma Zink und Silizium, die mittels EELS-Analyse als Zn-Silikate identifiziert wurden (Neumann & zur Nieden, 2001).

Silizium wird in der Regel nicht als essentielles Element für höhere Pflanzen angesehen (Marschner, 1995). Es gibt aber eine Reihe physiologischer Prozesse in denen Silizium involviert ist (Hodson & Evans, 1995; Epstein, 1999). Zudem konnte in einer Reihe von Untersuchungen gezeigt werden, dass Silizium die Metall-Toleranz in verschiedenen Pflanzenarten beeinflusst. Toxizitätsmildernde Effekte des Siliziums wurden z.B. in *Oryza* (Horiguchi, 1988), in *Zea mays* (Barceló et al., 1993), in *Hordeum* (Hammond et al., 1995) und in *Vigna unguiculata* (Horst et al., 1999) beobachtet. Dabei ist die Bildung extrazellulärer unlöslicher Metall/Si-Verbindungen in einigen Fällen für den beobachteten Effekt des Silizium verantwortlich (Hodson & Sangster, 1993). Die Bildung von Metall/Si-Verbindungen scheint aber nicht der einzige Effekt des Siliziums zu sein, um die Metall-Toxizität in Pflanzen zu mildern. Obwohl Dikotyledonen nicht gerade zu den Si-Akkumulierern gehören, gibt es einige Arten wie *Minuartia verna*, *Silene vulgaris*, *Thlaspi caerulescens* oder *Viola calaminaria* in denen Si-Ablagerungen nicht nur in den Zellwänden und Interzellulären Räumen vorkommen, sondern auch im Cytoplasma und in den Vakuolen (Neumann et al., 1997a; Bringezu et al., 1999). Diese Pflanzen gelten als schwermetall-tolerant.

Der Annahme folgend, dass ein Zusammenhang zwischen der Toleranz von Pflanzen gegenüber Schwermetallen und ihrer Fähigkeit hohe Si-Konzentrationen aufzunehmen besteht, wurden im Rahmen dieser Arbeit physiologische und biochemische Grundlagen einer Si-abhängigen SM-Toleranz untersucht. Als Testsysteme wurden Zellkulturen

unterschiedlich schwermetall-toleranter *Silene*-Spezies (*S. cucubalus*, *S. jensseensis*) und *Arabidopsis*-Pflanzen (*A. thaliana*, *A. halleri*) verwendet.

### 4.1 Einfluss von Silizium auf die Toleranz von *Silene*-Spezies gegenüber Zink oder Kupfer

Zink und Kupfer sind essentielle Spurenelemente für alle Organismen. Sie sind ein Bestandteil verschiedener Enzyme und Proteine und für das normale Wachstum notwendig. Toxische Konzentrationen von Zink führen aber u.a. zur Hemmung von Enzymen des Photosyntheseapparates wie dem wasserspaltenden Enzym und der Carboxylase (Van Assche & Clijsters, 1990). Die Aufnahme hoher Cu-Konzentrationen in der Pflanze führt u.a. zur Beeinträchtigung der Plasmamembranfunktion. Dabei scheinen vor allem metall-sensitive Enzyme wie ATPasen betroffen zu sein (De Vos et al., 1991). Zudem katalysiert Kupfer die Bildung freier Radikale und ist an der Peroxidation ungesättigter Fettsäuren beteiligt (Van Assche & Clijsters, 1990; Dietz et al., 1999).

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen von *Silene cucubalus* und *Silene jensseensis* zeigen deutlich unterschiedliche Wachstumsparameter in Gegenwart von Zink oder Kupfer. Ein direkter Vergleich der beiden Kulturen lässt den Schluss zu, dass die Zellkultur von *S. jensseensis* weitaus toleranter als die Zellkultur von *S. cucubalus* auf Applikationen von Zink oder Kupfer reagiert. Anhand der Trockengewichtsbestimmung wurde bei *S. cucubalus* bereits nach Zugabe von 0,2 mM Cu<sup>2+</sup> bzw. 0,25 mM Zn<sup>2+</sup> eine deutliche Wachstumsreduktion festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigte die Zellkultur von *S. jensseensis* erst nach Applikation von 1 mM Zn<sup>2+</sup> messbare Wachstumsbeeinträchtigungen. Bis zu einer Konzentration von 0,5 mM Cu<sup>2+</sup> konnte bei *S. jensseensis* keine Veränderung des Trockengewichtes festgestellt werden.

Die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Silizium zu Zellkulturen, deren Wachstum durch Zink (*S. cucubalus* 0,25 mM Zn<sup>2+</sup>, *S. jensseensis* 1 mM Zn<sup>2+</sup>) beeinträchtigt war, zeigt weder auf das Zellwachstum noch auf die Aufnahme von Zink einen Einfluss (Abb. 3.1 b, Abb. 3.2 a, b). Im Gegensatz dazu bewirkt die Anwesenheit von Silizium in Gegenwart von Kupfer in Konzentrationen (*S. cucubalus* 0,15 mM Cu<sup>2+</sup>, *S. jensseensis* 0,3 mM Cu<sup>2+</sup>), die das Wachstum der beiden Zellkulturen beeinträchtigen, eine Erhöhung des Trockengewichtes und demzufolge eine Wachstumssteigerung (Abb. 3.1 a). Diese Beobachtungen sind offenbar auf die reduzierte Aufnahme von Cu-Ionen zurückzuführen (Abb. 3.2 a, b). Die verminderte Aufnahme von Cu-Ionen in den beiden Zellkultur-Spezies könnte auf einer Cu-Silikat-Bildung im Medium beruhen. Einige Ökotypen von *S. cucubalus* sind tolerant gegenüber Kupfer (Ernst, 1974, De Vos et al., 1991). Die reduzierte Aufnahme

von Kupfer in diesen Pflanzen wird als ein möglicher Mechanismus der Toleranz diskutiert (De Vos et al., 1991). Zudem könnten Si-Ablagerungen an und in der Zellwand die Aufnahme von SM-Ionen wie z.B.  $\text{Cu}^{2+}$  in die Zelle beeinflussen (Iwasaki et al., 2002a, b). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass bei der hier verwendeten *S. cucubalus* Zellkultur, nach Applikation von Zink und Silizium, nur Zink im Cytoplasma nachweisbar ist. In den Zellen der toleranten *S. jenseensis* wurden dagegen sowohl Zink als auch Silizium in Niederschlägen des Cytoplasmas gemessen. Dabei liegen beide Elemente meist colokalisiert vor. Mittels EELS-Analyse wurden diese Niederschläge als Zn-Silikate identifiziert. Der für Silikate typische Peak in den EEL-Spektren bei  $\sim 95$  eV zeigt im Vergleich zu entsprechenden Standards ungewöhnlich geringe Peakhöhen. Vergleiche der EEL-Spektren von Zn-Silikat Standards mit unterschiedlichem Zn-Gehalt zeigen, dass die Höhe dieses Peaks vom Zn-Gehalt abhängig ist. Pflanzliche Zn-Silikate enthalten offenbar relativ wenig Zink. Solche nicht vollständig substituierten Silikate sind instabil, sie zerfallen spontan unter Bildung des thermodynamisch stabileren  $\text{SiO}_2$  (Schwieger et al., 1987). Dieses Umwandlungsprodukt konnte durch EELS-Analyse im Cytoplasma, den Mitochondrien und im extrazellulären Raum nachgewiesen werden. Das dabei freiwerdende Zink wird wahrscheinlich unmittelbar durch andere bisher unbekannte Bindungspartner wieder komplexiert. Im Gegensatz zur *S. cucubalus* Zellkultur besitzt die Zellkultur von *S. jenseensis* offenbar die Fähigkeit Silizium in Gegenwart von Zink in die Zelle aufzunehmen. Ungeklärt ist die Frage, ob beide Ionen getrennt oder als Zn-Silikat, das im extrazellulären Raum gebildet worden ist, aufgenommen werden. Das Vorkommen von  $\text{SiO}_2$  in den Zellwänden könnte ein Hinweis für die Bildung und den Zerfall von Zn-Silikat im extrazellulären Raum sein. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Präzipitation von Zink als zunächst unlösliches Zn-Silikat im Cytoplasma zur Detoxifizierung von freien Zn-Ionen beitragen kann. Die Fähigkeit zum Transport von Silizium durch die Plasmamembran, könnte ein Grund für die Zn-Toleranz von *S. jenseensis* sein. Silizium in Form von Silikat fungiert möglicherweise als vorübergehender Bindungspartner von Metall-Ionen im Cytoplasma und den Organellen und verhindert so toxische Metall-Konzentrationen. Die Silikate zersetzen sich langsam zu  $\text{SiO}_2$  und die freiwerdenden Metall-Ionen werden in die Vakuole transportiert und dort akkumuliert (Neumann & zur Nieden, 2001). Auf der anderen Seite könnten die freigewordenen Metalle, wie in diesem Fall Zink, anschließend auch Enzymen oder Proteinen zur Verfügung stehen, die u.a. in den Mitochondrien lokalisiert sind. Für die Aufnahme von Zink und Silizium wurde ein weiterer möglicher Aufnahmemechanismus gefunden. In den Zellkulturen von *S. jenseensis* wurden häufig ungewöhnliche Membran-Invaginationen beobachtet, die von der Plasmamembran und dem Tonoplasten gebildet werden (Abb. 3.3 e). In den Vakuolen dieser Zellen kommen Vesikel vor, die ebenfalls von zwei Membranen umgeben sind. Das ist insofern ungewöhnlich, da an

Exkretionsvorgängen in die Vakuole im allgemeinen nur der Tonoplast beteiligt ist. In diesen Invaginationen und den vakuolären Vesikeln konnte durch ESI Zink und Silizium nachgewiesen werden, die aus dem extrazellulären Raum stammen. Auf diesem Wege könnten beide Elemente ohne Membran- und Plasmapassage in die Vakuole gelangen, was möglicherweise ein weiterer Faktor im Toleranz-Mechanismus von *S. jenseensis* ist.

Sowohl Kupfer als auch Silizium wurden in den Suspensionskulturen von *S. cucubalus* und *S. jenseensis* im Cytoplasma detektiert. In beiden Spezies liegt das Silizium in Gegenwart von Kupfer homogen verteilt im Cytoplasma vor, und Kupfer ist in höheren Konzentrationen in den Plastiden lokalisiert. Allerdings konnten kaum Colokalisierungen von Kupfer und Silizium beobachtet noch Cu-Silikate nachgewiesen werden. Die Lokalisation von Silizium im Cytoplasma von *S. cucubalus* und *S. jenseensis* Zellen ist daher nicht entscheidend für die höhere Cu-Toleranz der *S. jenseensis* Zellkultur. Die erhöhte Toleranz der *S. jenseensis* Zellkultur gegenüber Kupfer im Vergleich zur Zellkultur von *S. cucubalus* könnte auf Toleranz-Mechanismen, wie z.B. der Bildung von Metallothioneinen oder anderen metallbindenden Verbindungen beruhen (Meharg, 1993; Van Hoof et al., 2001).

### Phytochelatine in *Silene*-Spezies

Zahlreiche Beispiele in der Literatur sprechen für eine Rolle der Phytochelatine bei der SM-Toleranz. So können Cd-sensitive *Arabidopsis*-Mutanten, die keine Phytochelatine bilden, im Gegensatz zu den Wildtypen, bereits bei einer Konzentration von 0,6  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  nicht mehr wachsen (Howden et al., 1995). Andere Untersuchungen zeigen, dass Phytochelatine nicht in allen Pflanzen-Spezies an der SM-Toleranz beteiligt sein müssen. So bildet die sensitive *Silene vulgaris* unter Cu- und Zn-Exposition deutlich mehr Phytochelatine, als tolerante Pflanzen (De Vos et al., 1992; Schat & Kalff, 1992; Harmens et al., 1993).

Untersuchungen zum Vorkommen bzw. zur Induktion von Phytochelatinen nach Metall-Exposition in den beiden *Silene*-Spezies ergaben, dass der Gehalt an PC2 in den unbehandelten Zellkulturen von *S. cucubalus* und *S. jenseensis* am höchsten ist. Phytochelatine werden bereits durch eine Erneuerung des Kulturmediums und der damit verbundenen Zuführung geringster SM-Konzentrationen als Spurenelemente induziert. Das ergaben Untersuchungen an verschiedensten Zellkultur-Spezies (Grill et al., 1988b). Das würde die hohen PC2-Konzentrationen in den Kontrollen erklären, nicht aber die Reduktion des PC2-Gehaltes nach Zn-Exposition. Während der PC2-Gehalt abnimmt, steigt der GSH-Gehalt in der toleranten *S. jenseensis* nach Zn-Applikation deutlich an. Auch die Applikation von Kupfer führt zu einem Anstieg der GSH-Konzentration bei einer gleichzeitigen Abnahme des PC2-Gehaltes. In der sensitiven *S. cucubalus* wurde nach Zn-

Applikation ebenfalls eine PC2-Reduktion beobachtet. Im Gegensatz zur *S. jensseensis* Zellkultur wurde aber außerdem eine Verminderung des GSH-Gehaltes festgestellt. Die Applikation von Kupfer bewirkte keine Veränderung des PC2-Gehaltes und nur eine leichte Erhöhung der GSH-Konzentration.

Nach Applikation von Silizium wurde in den unbehandelten Zellen beider Zellkultur-Spezies eine Abnahme des PC2-Gehaltes festgestellt. Der GSH-Gehalt steigt nach Silizium-Applikation nur in *S. jensseensis* Zellen an. Der PC2-Gehalt und der GSH-Gehalt in *S. cucubalus* werden nach Metall-Exposition und gleichzeitiger Si-Applikation weiter reduziert. In der *S. jensseensis* Zellkultur wurden dagegen unter den gleichen Bedingungen keine signifikanten Veränderungen der PC2- und GSH-Konzentration beobachtet. Silizium könnte möglicherweise durch die Bildung von Metall-Silikaten, indirekt die PC-Synthese der beiden *Silene*-Zellkulturen hemmen.

Die beobachtete Abnahme des PC2-Gehaltes nach Cu-Exposition in der *S. jensseensis* Zellkultur deutet daraufhin, dass die SM-Toleranz in dieser Spezies wahrscheinlich nicht auf eine erhöhte Synthese von Phytochelatinen zurückzuführen ist. Untersuchungen von De Vos und Mitarbeitern (1992) zeigten, dass vermutlich die Toleranz gegenüber Kupfer in *S. cucubalus* Wurzeln darauf beruht, den GSH-Spiegel aufrechtzuerhalten. Allerdings beobachteten sie auch einen Anstieg der PC-Konzentration. Es wird vermutet, dass die Wirkung des Glutathion als Antioxidans indirekt den durch Kupfer induzierten oxidativen Stress verhindert (De Vos et al., 1992). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete *S. cucubalus* Zellkultur zeigte keine durch Cu-induzierte PC2-Produktion. Das ist vermutlich auf andere Versuchsbedingungen, unterschiedliche Konzentrationen und die Verwendung von Zellkulturen anstatt von Pflanzen zurückzuführen. Die beobachtete signifikante Erhöhung der GSH-Konzentration nach Cu- und Zn-Applikation in der schwermetall-toleranteren *S. jensseensis* Zellkultur könnte allerdings ein Hinweis darauf sein, dass Glutathion möglicherweise zur Toleranz gegenüber diesen beiden Metallen (z.B. durch Komplexierung im Cytoplasma) beitragen kann. Ein solcher Zusammenhang zwischen SM-Toleranz und GSH-Gehalt ist bisher nur für Pilze beschrieben. In dem Wassermoo *Fontinalis antipyretica* wurde ein positiver Zusammenhang zwischen Cd-Stress und GSH-Gehalt gefunden und EEL-Spektren belegen eine Komplexierung von Cadmium durch GSH im Cytoplasma des Pilzes (Bruns et al., 2001).

Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Menge an Phytochelatinen nicht für die Toleranz gegenüber toxischen Zn-Applikationen verantwortlich ist. Diese Ergebnisse stimmen mit Literaturdaten überein. Die Zn-Toleranz in *Silene vulgaris* ist ebenfalls nicht auf eine erhöhte PC-Synthese zurückzuführen. Der Vergleich von sensitiven und toleranten Pflanzen in Gegenwart hoher Zn-Konzentrationen zeigte eine höhere PC-Synthese in den sensitiveren Pflanzen (Harmens et al., 1993). Der Vergleich von schwermetall-resistenten *S. cucubalus*

und schwermetall-sensitiven *Acer pseudoplatanus*-Pflanzen, die auf den gleichen Zn-belasteten Böden wuchsen, ergab, dass auch hier der PC-Gehalt in den sensitiveren *Acer*-Pflanzen höher ist als in den toleranteren *Silene*-Pflanzen (Grill et al., 1988a).

### Organische Säuren und Aminosäuren in *Silene*-Spezies

Seit Mathys (1977) werden organische Säuren immer wieder als Komplexbildner für Schwermetalle diskutiert. Insbesondere die erhöhte Konzentration von Malat in Zn-toleranten Ökotypen von *Deschampsia caespitosa*, *Silene vulgaris* und anderen Arten wurden als Hinweis dafür benutzt, dass SM-Resistenz zumindest zum Teil durch organische Säuren vermittelt wird (Godbold et al., 1984; Harmens et al., 1994). Andere Untersuchungen sprechen gegen eine Rolle von Malat in der Zn-Toleranz (Tolrà et al., 1996; Shen et al., 1997). Malat ist aber nicht die einzige organische Säure, die im Zusammenhang mit der SM-Toleranz diskutiert wird. Citrat und Oxalat komplexieren ebenfalls toxische SM-Ionen wie  $Al^{3+}$  oder  $Ni^{2+}$  (Krämer et al., 2000; Ma et al., 2001c; Ryan et al., 2001). Außerdem können Aminosäuren wie Histidin oder Nicotianamin an der Komplexbildung von SM-Ionen beteiligt sein (Krämer et al., 1996; Pich & Scholz, 1996).

Neben den Untersuchungen zur möglichen Rolle von Silizium in der SM-Toleranz wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Untersuchungen zum Vorkommen ausgewählter organischer Säuren und Aminosäuren in den beiden Zellkulturen *S. cucubalus* und *S. jensenseensis* vorgenommen.

Die Zellkultur der metall-sensitiveren *S. cucubalus* zeigt unter den gleichen Wachstumsbedingungen wie die Zellkultur der metall-toleranteren *S. jensenseensis* prozentual höhere Konzentrationen von Malat, Citrat und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und einiger Aminosäuren wie Serin und Pipecolinat. Die Applikation von Zink zeigte kaum einen Einfluss auf den Säuregehalt der *S. cucubalus* Zellkultur. In der Zn-behandelten *S. jensenseensis* Zellkultur wurde dagegen im Vergleich zur unbehandelten Kultur ein deutlicher Konzentrationsanstieg von organischen Säuren wie Fumarat, Malat, Citrat und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), sowie der Aminosäuren Serin und Pipecolinsäure festgestellt. Es kann allerdings keine Aussage getroffen werden, ob und inwieweit diese Beobachtung eine Rolle bei der Zn-Toleranz spielt. Der direkte Nachweis von Metall/Säure Komplexen fehlt, wie auch bei allen bisher publizierten Versuchen. Allerdings zeigen eine Reihe physiologischer Untersuchungen, dass organische Säuren und Aminosäuren in verschiedenen Pflanzen-Spezies an der Zn-Toleranz beteiligt sein könnten. Obwohl in den Blättern von *Thlaspi caerulescens* die häufigste vorkommende organische Säure Malat ist, zeigen X-ray Analysen, dass etwa 40 % des Zinks durch Citrat komplexiert wird (Tolrà et al.,

1996; Salt et al., 1999). In den Blättern von *A. halleri* wiesen Sarret und Mitarbeiter (2002) mit der gleichen Methode überwiegend Zn-Malat-Komplexe nach. Die Wurzeln hydroponisch angezogener *A. halleri* Pflanzen enthalten dagegen nur Zn-Phosphat-Verbindungen. Nur in Wurzeln von Pflanzen, die auf Zn-kontaminierten Böden wuchsen, wurden neben Zn-Phosphat-Verbindungen auch Zn-Malat- und Zn-Citrat-Komplexe gefunden (Sarret et al., 2002). Wang und Mitarbeiter (1992) konnten anhand von Computer-Simulationsstudien zeigen, dass Citrat in *Nicotiana tabacum* wahrscheinlich der Hauptkomplexator von Zink ist. Klare Beweise für einen direkten Zusammenhang zwischen der Konzentration einer organischen Säure und dem Grad der Toleranz gegenüber einzelnen Metallen fehlen allerdings (Clemens, 2001).

Persans und Mitarbeiter (1999) zeigten, dass in der Ni-hyperakkumulierenden *Thlaspi goesingense* intrazelluläres Nickel vorwiegend als Ni-Histidin-Komplex in der Vakuole vorliegt. Histidin ist auch an der Bindung freier Zn-Ionen in den Wurzeln von *Thlaspi caerulescens* beteiligt (Salt et al., 1999). Die nicht proteinogene Aminosäure Nicotianamin scheint ebenfalls in die Zn-Homöostase beteiligt zu sein (Becher et al., 2004). Ein gewisser Teil der Zn-Toleranz in den in dieser Arbeit verwendeten *Silene*-Zellkulturen könnte demzufolge auf einer Komplexierung von Zink durch organische Säuren oder Aminosäuren beruhen.

Im Gegensatz zur Zn-Applikation konnten nach Behandlung der Zellkulturen mit Kupfer, bis auf eine leichte Erhöhung der GABA-Konzentration in beiden Zellkulturen und eine Erhöhung des Pipecolinat-Gehaltes in der *S. jenseensis* Zellkultur, keine erhöhten Vorkommen an den organischen Säuren Fumarat, Malat und Citrat bzw. der Aminosäure Serin beobachtet werden. Cu- und Zn-tolerante Zellkulturen von *Nicotiana plumbaginifolia* synthetisieren 3 -12fach höhere Citrat- und Malat-Konzentrationen im Vergleich zu nicht-toleranten Zellen (Kishinami & Widholm, 1987). Zudem korreliert die Cu-Toleranz verschiedener *Arabidopsis*-Ökotypen mit einem kurzzeitigem  $K^+$ -Ausstrom und einem gleichzeitig Cu-induzierten Citrat-Efflux (Murphy et al., 1999). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse sprechen eher dafür, dass organische Säuren und Aminosäuren keine Rolle bei der Cu-Toleranz der beiden *Silene*-Zellkulturen spielen. Die Detoxifizierung von Metallen durch organische Säuren oder Aminosäuren ist unumstritten. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um organische Säuren und Aminosäuren, die als Antwort auf die SM-Toleranz synthetisiert werden, zu quantifizieren, die entsprechenden Metall-komplexe nachzuweisen und die Verbreitung dieser Mechanismen in verschiedenen Pflanzen-Spezies mit unterschiedlichen Metallen zu testen.

### 4.2 Aufnahme von Silizium und deren Einfluss auf die SM-Toleranz in *Arabidopsis*

Zellkulturen sind Modellobjekte für Aufnahmestudien auf zellulärer Ebene. Sie können aber Studien an intakten Pflanzen nicht ersetzen, weil z.B. die Aufnahme durch das Wurzelsystem oder die Xylembeladung nicht simuliert werden können. Die Verwendung intakter Pflanzen von *S. cucubalus* und *S. jensseensis*, als Fortführung der Versuche an den entsprechenden Zellkulturen, war nicht möglich, da das entsprechende Samenmaterial nicht zur Verfügung stand.

In der Literatur sind eine Reihe von nahe verwandten Arten beschrieben, die sich in ihrer SM-Toleranz unterscheiden, darunter die sensitive *Arabidopsis thaliana* und die tolerante *Arabidopsis halleri* (Koch et al., 1999). *A. halleri* (früher *Cardaminopsis halleri*) ist schon seit langem als  $Zn^{2+}$ -Hyperakkumulator bekannt (Baker & Brooks, 1989; Macnair et al., 1999; Bert et al., 2000; Zhao et al., 2000; Sarret et al. 2002). Sie wächst auf Cu/Zn-belasteten Standorten (Ernst; 1974). Da die Toleranz gegenüber Schwermetallen unter anderem von der untersuchten Spezies abhängig ist, müssen die Ergebnisse der *Arabidopsis*-Spezies nicht unbedingt mit den Daten der *Silene*-Zellkulturen übereinstimmen.

#### 4.2.1 Mechanismen der Siliziumaufnahme

Über die Aufnahme von Silizium ist relativ wenig bekannt. Aus *Diatomeen* wurden spezifische Si-Transporter isoliert (Hildebrand et al. 1993, 1997, 1998), die in höheren Pflanzen aber nicht vorkommen. Es gibt aus Hemmversuchen mit Phlorizidin, NaF, 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP) und NaCN Hinweise, dass die Aufnahme von Silizium (z.B. in Reis) ein aktiver, energieabhängiger Prozess ist. So wird die Si-Aufnahme durch 2,4-DNP und NaCN am effektivsten gehemmt (Okuda & Takahashi, 1962b).

Germanium (Ge) ist dem Silizium chemisch gesehen sehr ähnlich. Es besitzt keine funktionellen Eigenschaften in der Pflanze und wirkt erst in höheren Konzentrationen toxisch. Deshalb wird Germanium häufig als Modellsubstanz für die Aufnahme von Silizium benutzt (Werner, 1967a). Ma und Mitarbeiter nutzten die Eigenschaft des Germaniums zur Isolierung der Reis-Mutante GR1, die Silizium nicht aktiv aufnehmen kann (Ma et al., 2002). Zudem konnte mit Hilfe von Ge-Aufnahmestudien gezeigt werden, dass die Seitenwurzeln und nicht die Wurzelhaare von Reispflanzen an der Aufnahme von Silizium beteiligt sind (Ma et al., 2001b). Ein Vergleich zwischen Si-akkumulierenden Reispflanzen und nicht Si-akkumulierenden Tomatenpflanzen unterstützt die Annahme, dass Germanium als Germaniumsäure in ähnlicher Art und Weise wie Kieselsäure (KS) von den Pflanzen aufgenommen wird (Okuda & Takahashi, 1962a; Takahashi et al., 1990).

Untersuchungen zur Aufnahme von Silizium in *A. thaliana* und *A. halleri* ergaben, dass 2,4-DNP und KCN zwar deutlich die Zn-Aufnahme hemmen, die Aufnahme von Silizium dagegen fördern. Dies steht im Widerspruch zu den Untersuchungen von Okuda & Takahashi (1962a), die eine Hemmung der Si-Aufnahme in Reis durch 2,4-DNP und NaCN fanden. Die Speicherung von Silizium ist im Pflanzenreich sehr unterschiedlich ausgeprägt. Man spricht von Si-akkumulierenden Pflanzen (Cyperaceen und einige Gräser, Si-Gehalt 10-15% des Trockengewichtes) und nicht Si-akkumulierenden Pflanzen (die meisten Dikotylen, Si-Gehalt < 0,5% des Trockengewichtes). Diese verschiedenen Typen scheinen unterschiedliche Aufnahmemechanismen für Silizium zu haben. *Ipomoea nil* Pflanzen, die zu den nicht akkumulierenden Pflanzen gehören, zeigen in Gegenwart von ATPase-Inhibitoren ein ähnliches Aufnahmeverhalten wie es bei *A. thaliana* und *A. halleri* beobachtet wurde. Während die Zugabe von  $10^{-4}$  M 2,4-DNP oder  $10^{-3}$  M NaCN in Si-akkumulierenden Reispflanzen zu einer deutlichen Hemmung der Ge-Absorption führt, zeigten die *Ipomoea nil* Pflanzen unter den gleichen Bedingungen eine Förderung der Ge-Aufnahme. (Takahashi et al., 1976a).

Die Aufnahme von Silizium in die Wurzeln von *A. thaliana* und *A. halleri* scheint ähnlich wie in *Cucumis* Pflanzen beobachtet, passiv über den Transpirationsstrom zu erfolgen (Okuda & Takahashi, 1962a). ICP-MS-Messungen zur Analyse von Germanium in den Wurzeln und Blättern beider *Arabidopsis*-Arten ergaben in Abhängigkeit von der applizierten Ge-Konzentration eine lineare Zunahme sowohl in den Wurzeln als auch in den Blättern. Durch zusätzliche Applikation von Silizium, konnte die Aufnahme von Germanium in die Wurzeln reduziert werden. Diese Beobachtung deutet auf einen ähnlichen Aufnahmemechanismus beider Elemente hin (Takahashi et al., 1990).

Messungen zur Aufnahme von Silizium in den beiden *Arabidopsis*-Spezies bestätigen, dass mit zunehmender Ge-Konzentration im Medium eine Abnahme der Si-Aufnahme erfolgt.

Bemerkenswert ist, dass die Ge-Konzentration in den Blättern von *A. halleri* nach Applikation von Ge bzw. Ge/KS höher ist als in deren Wurzeln. In Gegenwart von Ge/Zn, bzw. Ge/Zn/KS wird aber deutlich mehr Germanium in den Wurzeln zurückgehalten. Zink behindert vermutlich den Transport von Germanium in die Blätter. Bei *A. thaliana* ändert sich das Verhältnis von Germanium in den Wurzeln und Blättern nach Applikation von Ge/Zn und Ge/Zn/KS nicht. Durch Kieselsäure wird in *A. halleri* die Konzentration von Zink in den Wurzeln erhöht und gleichzeitig der Transport in die oberirdischen Pflanzenteile gehemmt. Das deutet auf die Bildung von unlöslichem Zn-Silikat in den Wurzeln hin. Erhöhungen der Ge-Konzentration führten zu einer signifikanten Abnahme von Zink in den Wurzeln und einer Zunahme in den Blättern. Da Germanium Zink offenbar nicht binden kann, steht mehr Zink für den Transport in die oberirdischen Teile der Pflanze zur Verfügung. Da diese Ergebnisse für die schwermetall-sensitive *A. thaliana* nicht erhalten wurden, kann man annehmen, dass

Silizium in den Wurzeln von *A. halleri* an Toleranzmechanismen beteiligt sein könnte. So bewirkt Kieselsäure in *A. thaliana*, im Gegensatz zu *A. halleri*, unter Einfluss erhöhter Zn-Mengen keine Abnahme von Zink in den Blättern und keine Erhöhung der Zn-Konzentration in den Wurzeln. Auch die Änderung des Verhältnisses der Ge-Konzentration in den Blättern und Wurzeln von *A. halleri* in Gegenwart von Ge/Zn oder Ge/Zn/KS spricht für eine Beteiligung von Silizium an der Zn-Toleranz in *A. halleri*.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durch Germanium verminderte Si-Aufnahme in die Wurzeln auf die antagonistische Wirkung des Germaniums zurückzuführen ist. Die Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass der Transport von Silizium in die Blätter wahrscheinlich nicht durch Germanium beeinflusst wird. Vermutlich gelangen auch in *Arabidopsis* Germanium und Silizium auf dem gleichen Weg in die Pflanze. 2,4-DNP und KCN bewirken keine Hemmung der Si-Aufnahme. Das spricht gegen einen energieabhängigen Transport. Die Änderung des Sproß-Wurzel-Verhältnisses von Germanium in *A. halleri* nach Applikation von Zn/Ge bzw. Zn/Ge/KS im Gegensatz zu *A. thaliana* deutet auf eine Wechselwirkung zwischen Zink und Kieselsäure in den Wurzeln von *A. halleri* hin, der im Zusammenhang mit der Zn-Toleranz stehen könnte. Die Hemmung der Zn-Aufnahme durch metabolische Inhibitoren weist auf eine aktive Aufnahme des Elementes hin. Die Zunahme von Zink in den Wurzeln von *A. thaliana* und die Abnahme der Zn-Konzentration in den Wurzeln von *A. halleri* nach Applikation ansteigender Ge-Konzentrationen und Gegenwart gleicher Si-Konzentrationen deuten daraufhin, dass Silizium, im Gegensatz zu Germanium, Zink effektiv in den Wurzeln zurückhalten kann, was auf die Bildung von instabilem, aber zunächst schwer löslichem Zn-Silikat zurückzuführen sein könnte. Germanium ist offenbar nicht zu einer Komplexierung von Zink befähigt. Bei *A. thaliana* spielen diese Prozesse offenbar keine oder nur eine untergeordnete Rolle, ohne dass die Gründe dafür geklärt werden konnten.

### 4.2.2 Einfluss von Silizium auf die Toleranz gegenüber Kupfer und Zink

*A. thaliana* und *A. halleri* zeigen unter Einfluss von Silizium Unterschiede in der Zn-Konzentration sowohl in den Wurzeln, als auch in den Blättern. Während in *A. thaliana* die Gegenwart von Silizium offenbar zu keinen Veränderungen der Zink-Konzentration in den Wurzeln und Blättern führt, konnte für *A. halleri* durch AAS-Messungen gezeigt werden, dass ein verminderter Transport von Zink in die Blätter stattfindet. Die Gegenwart von Silizium bewirkt eine Reduktion der Zn-Konzentration in den Blättern von *A. halleri* um ca. 70 %. Gleichzeitig steigt die Konzentration von Zink in den Wurzeln auf das 2,5fache an. Das Verhältnis von Zink zwischen Blättern und Wurzeln ändert sich durch die gleichzeitige

Applikation von Silizium wie folgt. Bis zu einer Konzentration von 0,3 mM  $Zn^{2+}$  in der Nährlösung beträgt es 2:1. Bei höheren Metall-Konzentrationen nimmt das Verhältnis zu Gunsten der Wurzeln ab (4:3 bei 0,5 mM und 1mM  $Zn^{2+}$ ). Im Gegensatz dazu wurden zwischen den Blättern und Wurzeln der *A. thaliana* Hydrokultur folgende Zn-Verhältnisse festgestellt: 1:4 bei einer Applikation von 0,2 mM  $Zn^{2+}$ , 1:2,5 nach Zugabe von 0,25 mM  $Zn^{2+}$ , 1:2 in Gegenwart von 0,3 mM  $Zn^{2+}$  und 1:1,7 nach Applikation von 0,5 mM  $Zn^{2+}$  bzw. 1mM  $Zn^{2+}$ . Daher liegt es nahe, dass Silizium Zink bereits vor der Xylembeladung in den Wurzeln von *A. halleri* bindet. Die Bildung von Zn-Silikat in den Wurzeln konnte aber in *A. halleri* nicht nachgewiesen werden. Dass dieser Mechanismus aber offenbar möglich ist, zeigt die Colokalisation von Silizium mit Aluminium in den Wurzeln von Weizen, wenngleich der Nachweis der entsprechenden Al-Silikate aussteht (Cocker et al., 1998). Der verminderte Transport von Zink in die Blätter in Gegenwart von Silizium könnte zur erhöhten Toleranz gegenüber Zink in *A. halleri* beitragen.

Der Annahme folgend, dass die Akkumulation von Zink in *A. halleri* eine konstitutive Eigenschaft ist (Bert et al., 2000; 2002), bleibt die Frage ungeklärt, warum *A. halleri* im Gegensatz zu *A. thaliana* in Gegenwart erhöhter Si-Konzentrationen weniger Zink in die Blätter transportiert. Da die Toleranz gegenüber erhöhten SM-Ionen ein komplexes Netzwerk ist, kann man annehmen, dass sowohl der erhöhte Transport von Zink in die Blätter und die anschließende Akkumulation in den Vakuolen als auch eine frühzeitige Präzipitation von Zink in den Wurzeln zur erhöhten Zn-Toleranz in *A. halleri* beitragen können.

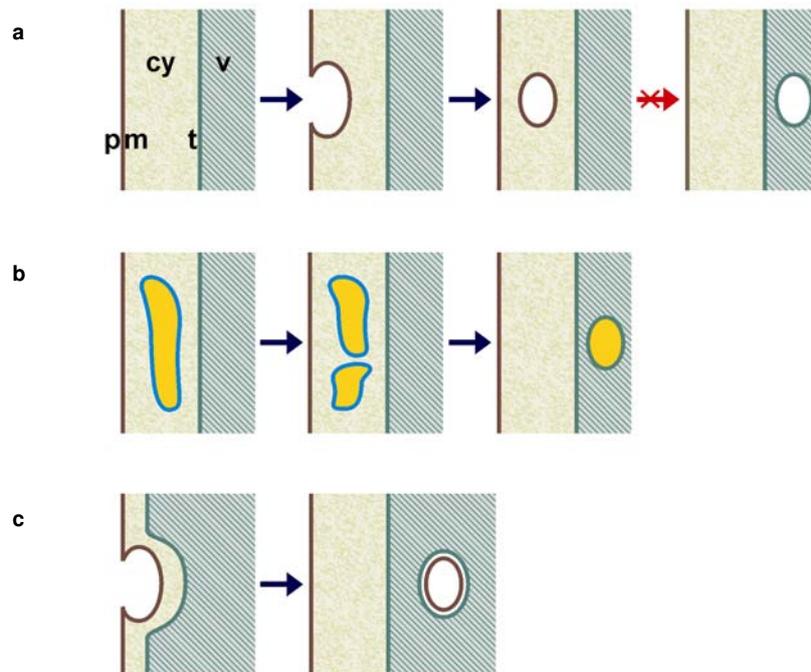
Einige frühere Untersuchungen deuten daraufhin, dass Zink in den Wurzeln einiger Pflanzen bevorzugt mit Phosphor präzipitiert. Dabei scheint Silizium indirekt involviert zu sein. In den Wurzeln von *A. halleri* wurde Zink bevorzugt im Apoplasten an der Rhizodermiszellwand gefunden. Mittels EDXA konnte gezeigt werden, dass dort Zink mit Phosphor präzipitiert (Küpper et al., 2000). Auch Sarret und Mitarbeiter (2002) wiesen in den Wurzeln hydroponisch angezogener *Arabidopsis*-Pflanzen Zn-Phosphat-Präzipitate nach. „Beneficial effects“ von Silizium unter P-Mangel wurden in Pflanzen mehrfach beobachtet. Die Zugabe von Silizium zu Nährlösungen mit sehr geringen Phosphor-Konzentrationen führt zu einer deutlichen Erhöhung des Trockengewichts von Reispflanzen (Ma & Takahashi, 1990a). Die früher angenommene Fähigkeit des Siliziums Phosphor teilweise auszutauschen bzw. die Phosphor-Verfügbarkeit in der Erde zu erhöhen, konnte allerdings nicht bestätigt werden (Ma & Takahashi, 1990b). Mittlerweile wird angenommen, dass der indirekte Effekt des Siliziums auf die Reduktion der Mangan- und Eisen-Aufnahme zurückzuführen ist, was aufgrund der hohen Affinität des Phosphors zu Eisen und Mangan eine Erhöhung der internen Phosphor-Translokation bewirkt (Ma, 2004). Eine Translokation von Phosphor in die Apoplasten des Wurzelsystems könnte dort eine Präzipitation von Zink bewirken (Küpper et al., 2000; Sarret et al., 2002). Silizium könnte natürlich auch direkt an der Detoxifizierung von Zink in *A. halleri*

beteiligt sein. So scheint Silizium in *Vigna unguiculata* direkt an der Mn-Toleranz beteiligt zu sein (Iwasaki et al., 2002a, b).

Der Transport der Metall-Ionen in die Blätter erfolgt über das Xylem. Von einigen Autoren wird angenommen, dass die Aufnahme von gelösten Substanzen über die Wurzeln in das Xylem auf symplastischen Weg erfolgt (Tester & Leigh, 2001; Clemens et al., 2002). Das würde an der Endodermis eine Aufnahme in die Zelle und eine erneute Exkretion in den freien Raum erfordern. Es gibt bisher keinen Beweis dafür, dass in Höheren Pflanzen ein aktiver Efflux von Ionen über die Plasmamembran in den apoplastischen Raum stattfinden kann (Heumann, 2002). Spezielle Durchlasszellen in der Endodermis, die keine Casparyschen Streifen enthalten, gestatten einen begrenzten apoplastischen Transport in das Xylem. Die Hauptmenge an SM-Ionen gelangt aber offenbar apoplastisch über die Nebenwurzeln in das Xylem. Bei der Bildung der Nebenwurzeln aus dem Zentralzylinder wird die Kontinuität der Endodermis durchbrochen, was einen Transport im freien Raum der Nebenwurzeln bis in das Xylem ermöglicht. In *Minuartia* konnte gezeigt werden, dass im Apoplasten der Nebenwurzeln die höchsten Cu-Konzentrationen messbar sind (Neumann, pers. Mitteilung) und stark hydrophile Verbindungen, wie der Fluoreszenzfarbstoff PTS, gelangen ebenfalls apoplastisch über die Nebenwurzeln in das Xylem (Peterson et al. 1981). In beiden *Arabidopsis*-Spezies wurden im Lumen der Xylemgefäße Niederschläge gefunden, in denen Zink und Silizium colokalisiert sind. Durch EEL-Spektren wurden diese Präzipitate als Zn-Silikat identifiziert. Zink scheint zumindest zum Teil als Silikat in die Blätter von *Arabidopsis* transportiert zu werden. Auch in den Blättern liegt es zum Teil als Silikat in den Interzellularen vor. Von dort wird das Zink in die Zellen aufgenommen und da gibt es deutliche Unterschiede zwischen *A. thaliana* und *A. halleri*. Während in *A. thaliana* die Zellwände noch Zink und Silizium enthalten, ist in der Zelle Zink nur noch im Cytoplasma und den Mitochondrien zu finden. Die Bindungspartner des Zinks sind nicht bekannt. Vollkommen anders ist das Bild bei *A. halleri*. Hier liegt Zink als Zn-Silikat im Plasma und im Kern vor. Dieser Unterschied könnte ein Teil der Zn-Toleranz von *A. halleri* sein. Diese nicht vollständig substituierten Zn-Silikate zerfallen langsam unter Bildung von  $\text{SiO}_2$  und Zn-Ionen. Sie stellen vermutlich einen Puffer für das Metall dar, der toxische Zn-Konzentrationen im Plasma verhindert. Die dabei freiwerdenden Zn-Ionen werden unmittelbar wieder an bisher unbekannte Partner gebunden. Ein Hinweis auf die Bindung durch thiolhaltige Verbindungen könnte der Anstieg von GSH in *Silene jensseensis* nach Cu- und Zn-Behandlung sein. Für die Aufnahme von Zink in die Zelle sind spezielle Transporter beschrieben, deren Spezifität und Lokalisation aber im Einzelnen nicht eindeutig geklärt sind (Fox & Guerinot, 1998; Grotz et al., 1998). Ob in *A. halleri* Zn-Ionen oder Zn-Silikat aus dem freien Raum aufgenommen wird, ist nicht bekannt. Denkbar wäre auch, dass bisher unbekannte Transporter für die Aufnahme verantwortlich sind.

Neben der Aufnahme von Zink über membranständige Transporter, gibt es offenbar einen weiteren Weg für die Zn-Aufnahme in die Zelle, der einen Kontakt mit dem Plasma ausschließt. Wie schon für *Silene* beschrieben, wurden auch in *Arabidopsis* Invaginationen gefunden, die von Plasmalemma und Tonoplasten gebildet werden und einen schmalen Saum Cytoplasma einschließen. In den gleichen Zellen gibt es in den Vakuolen zahlreiche Vesikel, die offenbar von den gleichen Membranen umgeben sind und vermutlich aus solchen Invaginationen entstanden sind. Das ist insofern ungewöhnlich, als das eine Exkretion in die Vakuole immer mit einer Verschmelzung cytoplasmatischer Membranen (ER, cytoplasmatische Vesikel) verbunden ist. Eine Beteiligung des Plasmalemmas an solchen Vorgängen ist bisher nicht beobachtet worden (Abb. 4.1a-c). ESI-Bilder zeigen, das sowohl die Invaginationen, als auch die vakuolären Vesikel Zink und Silizium, zum Teil colokalisiert, enthalten. Für die Aufnahme von Zink bedeutet es, dass Zink aus dem freien Raum aufgenommen werden kann, ohne das Cytoplasma der Zelle zu passieren. Invaginationen („bulbs“) mit einer Doppelmembran wurden bereits früher in Vakuolen von *Arabidopsis thaliana* beobachtet (Saito et al., 2002). Durch den Nachweis von  $\gamma$ -TIP (*tonoplast intrinsic protein*), einem Marker für lytische Vakuolen, konnte gezeigt werden, dass diese vom Tonoplasten stammen. Invaginationen, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit beobachtet wurden, zeigen auf elektronenmikroskopischer Ebene eindeutig, dass sie von Plasma- und Tonoplastenmembran gebildet werden. Der endgültige Beweis zur Herkunft der beiden Membranen durch Markierung mit Tonoplasten- bzw. Plasmamembran-spezifischen Antikörpern steht noch aus.

Hauptspeicherort für Zink sind in beiden *Arabidopsis*-Spezies die Vakuolen. EDX-Messungen geben keinen Hinweis auf einen anorganischen Bindungspartner in den Vakuolen von *Arabidopsis*, sodass von einem organischen Bindungspartner ausgegangen werden muss. In diesem Zusammenhang werden häufig organische Säuren diskutiert (Rauser, 1999; Clemens, 2001). In den Vakuolen von *A. halleri* komplexiert Zink wahrscheinlich bevorzugt als Zn-Malat (Sarret et al., 2002). Es kommen aber auch andere organische Verbindungen als Komplexbildner für Zink in Frage. In *Armeria maritima* wird Kupfer in den Vakuolen der Blätter durch Flavonoide gebunden (Neumann et al., 1995). In Modellversuchen mit Testsubstanzen sind diese Verbindungen auch in der Lage Zink zu komplexieren. In der unteren Epidermis und 1-2 Zellschichten des Schwammparenchyms von *A. halleri* gibt es nach Zn-Applikation elektronendichte Niederschläge, die nur Zink enthalten. Außerdem zeigt das Phenolspektrum unter diesen Bedingungen eine deutliche Zunahme an Flavonoiden. In den Vakuolen dieser Zellen wird Zink durch Flavonoide komplexiert.



**Abb. 4.1 a-c: Entstehung pinocytotischer Vesikel**

**Abb. a:** Pinocytotische Vesikel, welche sich im Cytoplasma befinden, entstehen durch das Abschnüren der Plasmamembran. Sie enthalten apoplastische Zell-Bestandteile. Ein Transport dieser Bestandteile in die Vakuole ist nicht beschrieben.

**Abb. b:** Cytoplasmatische Vesikel (ER, Golgi) können mit dem Tonoplasten verschmelzen und so in die Vakuole gelangen

**Abb. c:** In der Metall-toleranten *Arabidopsis halleri* und der Metall-toleranten *Silene jenseensis* wurden häufig Vesikel beobachtet, die sowohl von der Plasmamembran als auch von der Tonoplastenmembran umschlossen werden. Diese Vesikel können toxische Ionen aus dem apoplastischen Raum unter Umgehung des Cytoplasmas direkt in die Vakuole transportieren.

Diese Fähigkeit könnte ein weiterer Teil des offenbar komplexen Systems der SM-Toleranz von *A. halleri* sein. Diese Annahme wird durch Untersuchungen an Mutanten gestützt, die keine Flavonoide synthetisieren. *Transparent testa (tt)* Mutanten von *A. thaliana* Ler-1 sind in der Bildung brauner Pigmente der Samenhülle gestört (Koornneef, 1990). Das betroffene Gen ist für die Synthese von Flavonoiden verantwortlich. Bei der Mutante *tt4* ist das Chalconsynthase-Gen gestört. Die Chalconsynthase gehört zu einer Gruppe von sieben Enzymen, die für die Bildung des Grundgerüsts der Flavonole verantwortlich sind (Shirley et al., 1995). Die *A. thaliana* Ler-1 Mutante *tt4* eignet sich deshalb für die Prüfung der Funktion von Flavonolen bei der Präzipitation von Zink in den Vakuolen von *A. halleri* und *A. thaliana* Col-0. AAS-Messungen zur Aufnahme und zur Verteilung von Zink ergaben keine relevanten

Unterschiede zwischen dem *A. thaliana* Ler-1 Wildtyp (WT) und der Ler-1 Mutante *tt4*. Wurzeln und Blätter enthalten nach dieser Applikation vergleichbar hohe Zn-Werte wie *A. thaliana* Col-0. *A. halleri* besitzt dagegen unter den gleichen Bedingungen eine 8fach höhere Zn-Konzentrationen in den Blättern. Obwohl offenbar die Zn-Aufnahme und Verteilung in den Wurzeln und Blättern von Ler-1 WT und Mutante *tt4*, unter den gleichen Bedingungen, ähnlich der Zn-Aufnahme von Col-0 ist, unterscheiden sie sich deutlich vom Ökotyp Col-0. Während eine Applikation von 0,05 mM Zn<sup>2+</sup> bei Ler-1 Mutante *tt4* und Wildtyp zu starkem Verwelken und Austrocknen der Blätter führt, werden bei Col-0 keine Seneszenzerscheinungen sichtbar. Der Vergleich elektronenmikroskopischer Bilder der Vakuolen von *A. thaliana* Col-0 WT, Ler-1 WT, Ler-1 Mutante *tt4* und *A. halleri* nach Zn-Applikation ergab, dass Flavonole nicht die einzigen Verbindungen sind, welche Zink in den Vakuolen komplexieren können. Die Vakuolen der Ler-1 Mutante *tt4* enthalten elektronendichte Präzipitate, die sich in ihrer Struktur deutlich von den Flavonol-Zn-Präzipitaten unterscheiden. Es handelt sich dabei offenbar um Zn-Präzipitate, an denen Flavonole nicht beteiligt sind. Untersuchungen von Sinapoylsäure-Derivaten, die aufgrund der fehlenden Flavonoid-Synthese in großen Mengen in der Ler-1 Mutante *tt4* auftreten, ergaben, dass Sinapoylsäure-Derivate Zink nicht komplexieren können (Daten nicht gezeigt). Flavonole sind sicher nicht die einzigen Verbindungen, die entscheidend für die höhere Zn-Toleranz von *A. halleri* sind. Dafür spricht schon die relativ geringe Anzahl von Zellen, in denen sie gebildet werden. Neben Flavonolen scheinen vor allem Chelatoren wie organische Säuren (z.B. Malat) für die Zn-Bindung in der Vakuole verantwortlich zu sein (Sarret et al., 2002). Silizium spielt offenbar bei der Komplexierung von Zink in der Vakuole keine Rolle. Es konnte zwar Silizium in den Vakuolen von *A. thaliana* Col-0 WT und Ler-1 WT gemessen werden, allerdings wurden keine Colokalisationen mit Zink nachgewiesen.

Während zwischen der Zn-Toleranz und der Gegenwart von Silizium vermutlich ein Zusammenhang besteht, konnte das für Kupfer in beiden *Arabidopsis*-Spezies nicht gefunden werden. Extrazelluläre Lokalisationen von Kupfer wurden in den Zellwandverdickungen des Xylems, in den Zellwänden und zwischen den Zellwänden und dem Cytoplasma gefunden. Im Lumen der Xylemgefäße wurde neben Kupfer auch Silizium gefunden, es gibt aber keinen Hinweis auf die Bildung von Cu-Silikat. Im Gegensatz zu Zink wird Kupfer offenbar nicht als Silikat transportiert. Der Grund dafür ist nicht bekannt. Möglicherweise sind die Voraussetzungen (z.B. der pH-Wert) für die Bildung von Cu-Silikat nicht gegeben. Obwohl unter dem Einfluss von Kupfer mehr Silizium in die Pflanze aufgenommen wird, bleibt Silizium extrazellulär. In der Zelle, speziell den Chloroplasten, kann Kupfer immer nur allein nachgewiesen werden. In den Blättern von *A. thaliana* ist Silizium ebenfalls extrazellulär lokalisiert. Offenbar fehlt ein Aufnahmemechanismus für Silizium oder es liegt in einer Form vor, in der es nicht transportiert werden kann. Vermutlich

ändert Kupfer die Plasmamembraneigenschaften, sodass Silizium diese Barriere nicht mehr passieren kann.

Die Cu-Toleranz in *Armeria maritima* beruht unter anderem auf der Exkretion von Kupfer über Salzdrüsen (Neumann et al., 1995). Das Vermeiden hoher Cu-Konzentrationen in *Minuartia verna*, welche auf SM-belasteten Böden wächst, erfolgt durch Ausscheidung über Hydathoden (Neumann et al., 1997b). Eine Exkretion von Kupfer scheint auch bei *A. halleri* stattzufinden. Neumann & zur Nieden (2001) konnten in *A. halleri* Pflanzen von einem Cu-belasteten Standort Cu-Präzipitate auf der Blattoberfläche nachweisen. Wie groß die Bedeutung solcher Ausscheidungsprozesse für die Toleranz einer Pflanze ist, kann man nur schwer abschätzen. Die Menge an ausgeschiedenen Metallen ist stark von den klimatischen Verhältnissen bzw. den Versuchsbedingungen im Labor abhängig und nicht zu quantifizieren.

Die Toleranz gegenüber Zink in *Silene jensseensis* und *Arabidopsis halleri* ist offenbar ein komplexer Prozess, an dem mehrere Mechanismen beteiligt sind:

1. Ein Teil des in die Wurzeln aufgenommenen Zinks wird dort vermutlich in Form von Zn-Silikat vorübergehend festgelegt und könnte verzögert nach langsamen Zerfall des Silikates über das Xylem in die Blätter transportiert werden. Auf diese Weise könnten toxische Konzentrationen in die Blätter verhindert werden.
2. Ein Teil des in den Spross transportierten Zinks bleibt extrazellulär in den Zellwänden, Interzellularen und zwischen Zellwänden und Plasmalemma und wird vermutlich über Spaltöffnungen ausgeschieden.
3. Die Aufnahme von Zn in die Zellen ist energieabhängig. Im Cytoplasma wird das Schwermetall zumindest teilweise zunächst als Silikat festgelegt werden. Dieses könnte wie in den Wurzeln als Puffer dienen und toxische Konzentrationen von Zink im Cytoplasma verhindern. Die beim Zerfall des Zn-Silikates frei werdenden Zn-Ionen werden durch bisher unbekannte Partner gebunden und über den Tonoplasten in die Vakuole transportiert.
4. Hauptspeicherort für Zink ist die Vakuole. In spezialisierten Zellen der unteren Blattepidermis wird es an Flavonole gebunden. In den übrigen Blättern spielen wahrscheinlich organische Säuren und/oder Phosphate eine Rolle.
5. Über einen anderen Mechanismus könnte Zink auch direkt in die Vakuole gelangen, ohne das Cytoplasma zu passieren. Endozytotische Vesikel, die von Plasmamembran und Tonoplast umgeben sind, können Zink direkt aus dem extrazellulären Raum in die Vakuolen transportieren.

6. Silizium ist offenbar nicht direkt an der endgültigen Speicherung von Zink beteiligt. Es trägt vermutlich durch Bildung von Zn-Silikat, das als Puffer wirkt, dazu bei, dass toxische SM-Konzentrationen in sensiblen Kompartimenten verhindert werden. Dieser Mechanismus beruht auf der Stabilität des in den Pflanzen gebildeten Zn-Silikates, in dem nicht alle OH-Gruppen durch Zink substituiert sind. Solche nicht vollständig substituierten Silikate sind instabil, sie zerfallen spontan und langsam unter Freisetzung von Zn-Ionen in das thermodynamisch stabilere  $\text{SiO}_2$ .

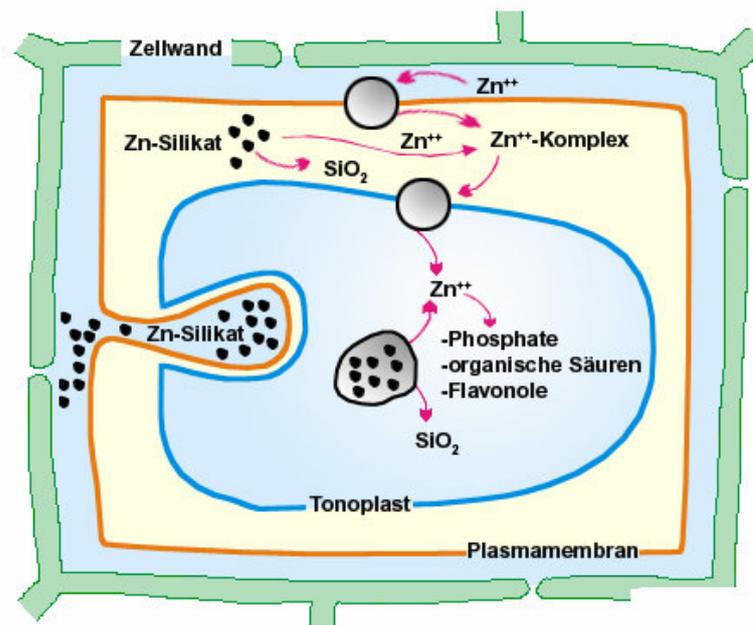


Abb. 4.2: Mögliche Detoxifizierung von Zink in der Zelle

Das die Toleranz-Mechanismen schwermetall-abhängig sind, zeigt die Toleranz von *Silene jennisensis* und *Arabidopsis halleri* gegenüber Kupfer:

1. Tolerante und sensitive Pflanzen zeigen ein ähnliches Verhalten. Die Gegenwart von Silizium bewirkt eine reduzierte Cu-Aufnahme und die zelluläre Verteilung der Schwermetalle ist identisch.
2. Es gibt keine nachweisbare Bildung von Cu-Silikat. Einen Einfluss von Silizium auf die Cu-Toleranz konnte nicht gezeigt werden.
3. Phytochelatine und organische Säuren scheinen nicht an der Cu-Toleranz beteiligt zu sein.
4. Für die Cu-Toleranz scheint die Komplexbildung des Schwermetalls im Cytoplasma und in der Vakuole durch bisher unbekannte Mechanismen von entscheidender Bedeutung zu sein.

## 5 Zusammenfassung

Im Laufe der Evolution haben Höhere Pflanzen eine Vielzahl verschiedener Mechanismen entwickelt, um das Leben und den Fortbestand der Art zu schützen. Ein Teil dieser Mechanismen ist für die Aufnahme und den Transport essentieller Mikroelemente, zu denen auch eine Reihe von Schwermetallen gehören, verantwortlich. Deren Konzentration in der Zelle ist streng kontrolliert, um auf der einen Seite die notwendigen Konzentrationen für den Stoffwechsel zu garantieren und auf der anderen Seite toxische Konzentrationen in sensiblen Kompartimenten zu vermeiden. Silizium ist eines der Elemente, über dessen Rolle in der Pflanze bisher nur sehr wenig bekannt ist. Anhand von schwermetall-sensitiven und schwermetall-toleranten Zellkulturen und Pflanzen sollte die mögliche Bedeutung von Silizium für die SM-Toleranz charakterisiert werden.

- Zellkulturen von *Silene cucubalus* zeigen ab 0,15 mM  $\text{Cu}^{2+}$  und 0,25 mM  $\text{Zn}^{2+}$  eine deutliche Wachstumshemmung.
- Das Wachstum von *Silene jensseensis*-Zellkulturen ist bei 0,5 mM  $\text{Cu}^{2+}$  noch nicht beeinflusst. Erst bei einer Konzentration von 1 mM  $\text{Zn}^{2+}$  bewirkt Zink eine messbare Wachstumshemmung.
- In *Silene cucubalus* ist die Aufnahme von Kupfer in Gegenwart von 50  $\mu\text{g/ml}$  Si um ca. 35 % reduziert. In *Silene jensseensis* wird in Gegenwart von 50  $\mu\text{g/ml}$  Si ca. 45 % weniger Kupfer aufgenommen. Auf die Aufnahme von Zink haben 50  $\mu\text{g/ml}$  Si nur einen sehr geringen Einfluss.
- Die Zellen von *Silene cucubalus* zeigen in ihrer Ultrastruktur keine Besonderheiten.
- Die Zellen von *Silene jensseensis* enthalten im Cytoplasma und den Mitochondrien elektronendichte Niederschläge. Häufig sind Invaginationen zu beobachten, die höchstwahrscheinlich von Plasmalemma und Tonoplast gebildet werden und einen schmalen Saum Cytoplasma einschließen. In den Vakuolen gibt es Vesikel, die ebenfalls von diesen beiden Membranen umschlossen sind. Der endgültige Beweis zur Herkunft der beiden Membranen durch die Markierung mit spezifischen Antikörpern steht noch aus.
- Die Zellwände beider *Silene*-Zellkulturen binden nur geringe Mengen an Kupfer oder Zink.
- In *Silene cucubalus* findet sich in den Zellen, speziell in Mitochondrien, im Endoplasmatischen Retikulum und den Diktyosomen nur Zink. Silizium wird nicht in die Zellen aufgenommen.

## Zusammenfassung

- Die cytoplasmatischen und mitochondrialen elektronendichten Niederschläge in Zellen von *Silene jensseensis* enthalten Zink und Silizium. EEL-Spektren charakterisieren sie als Zn-Silikat mit niedrigem Zn-Gehalt.
- Nicht vollständig substituierte Silikate sind instabil. Das Abbauprodukt  $\text{SiO}_2$  wurde durch ESI und EELS in den Zellen nachgewiesen.
- In beiden *Silene*-Spezies wurde Kupfer im Cytoplasma und den Mitochondrien gefunden. Silizium kommt im Cytoplasma, vereinzelt colokalisiert mit Kupfer, vor. Cu-Silikat konnte aber nicht nachgewiesen werden.
- Beide Spezies enthalten unter Standard-Kulturbedingungen Phytochelatine. Cu- oder Zn-Applikation führte nicht zu einer Erhöhung der Phytochelatin-Konzentration.
- *Silene jensseensis* zeigt nach Cu- oder Zn-Belastung eine erhöhte GSH-Konzentration.
- *Silene cucubalus* zeigt nach Cu-Stress eine Abnahme der gemessenen organischen Säuren und Aminosäuren, mit Ausnahme von Pipecolinsäure und  $\gamma$ -Aminobuttersäure. Zink bewirkt einen leichten Anstieg der Citrat- und  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Konzentration.
- In *Silene jensseensis* kann nach Zn-Applikation ein Anstieg von Fumarat, Malat, Citrat, Serin und Pipecolinat gemessen werden. Kupfer bewirkt nur eine leichte Erhöhung der  $\gamma$ -Aminobuttersäure- und der Pipecolinsäure-Konzentration.
- In *Arabidopsis thaliana* (schwermetall-sensitiv) und *Arabidopsis halleri* (schwermetall-tolerant) wird Zink im Xylem unter anderem als Silikat transportiert.
- In beiden Spezies bleibt ein Teil des Zinks extrazellulär in den Interzellularen und zwischen Zellwand und Plasmalemma.
- Im Cytoplasma und den Kernen von *Arabidopsis halleri* sind 20-30 nm große elektronendichte Partikel zu beobachten, die Zink und Silizium enthalten und als Zn-Silikat charakterisiert wurden.
- Kupfer wird in beiden Spezies ebenfalls im Xylem transportiert.
- In den Zellen ist Kupfer vorwiegend in Plastiden und Mitochondrien nachweisbar.
- *Arabidopsis halleri* Hydrokulturen nehmen deutlich mehr Zink und Kupfer auf als Hydrokulturen von *Arabidopsis thaliana*.
- Externe Cu-Konzentrationen fördern die Aufnahme von Silizium in beiden *Arabidopsis*-Spezies.
- Die Si-Aufnahme ist durch externe Zn-Konzentrationen nur leicht erhöht.
- In *Arabidopsis halleri* bewirkt Silizium eine 2,5fache Erhöhung der Zn-Konzentration in den Wurzeln. Gleichzeitig wird in Gegenwart von Silizium die Zn-Konzentration in den Blättern um ca. 70 % reduziert.

- In *A. thaliana* wird Zink durch Silizium kaum beeinflusst.
- Germanium reduziert die Aufnahme von Kieselsäure in beiden Spezies. Die Kieselsäure-Konzentration in den Blättern wird durch Germanium nicht beeinflusst.
- Germanium reduziert die Zn-Konzentration in den Wurzeln von *Arabidopsis halleri* und erhöht sie in den Wurzeln von *Arabidopsis thaliana*.
- Zink beeinflusst den Transport von Germanium in die Blätter von *Arabidopsis halleri*.
- Das Wurzelwachstum von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen wird ab einer Konzentration von 0,1 mM  $Zn^{2+}$  und 0,1  $\mu g/ml$   $GeO_2$  gehemmt. Durch Silizium kann diese Hemmung teilweise aufgehoben werden.
- Die Hemmstoffe 2,4-DNP und KCN erhöhen fördern die Aufnahme von Silizium in beiden *Arabidopsis*-Spezies. Die gleichen Hemmstoffe bewirken eine Reduktion der Zn-Aufnahme in *Arabidopsis thaliana* und *Arabidopsis halleri*.
- Die Vakuolen der unteren Epidermis von *Arabidopsis halleri* und *Arabidopsis thaliana* enthalten elektronendichte Niederschläge, die Zink binden.
- In den Vakuolen von Epidermiszellen der *Arabidopsis thaliana* Mutante tt4 vom Ökotyp Ler-1 sind ebenfalls Niederschläge nachweisbar, die Zink binden.
- Die Ler-1 Mutante tt4 von *Arabidopsis thaliana* speichert weniger Zink als der entsprechende Wildtyp.
- *Arabidopsis thaliana* Keimlinge der Mutante tt4 besitzen unter normalen Wachstumsbedingungen 60 % Wurzellänge gegenüber dem Ler-1 Wildtyp und dem Col-0 Wildtyp.
- Zink bewirkt eine gleiche prozentuale Reduktion der Wurzellänge aller Keimlingstypen.
- Die Phenolfraktion der Blätter von *Arabidopsis halleri* enthält eine Reihe von Flavonolen, die in *Arabidopsis thaliana* Col-0, Ler-1 und Ler-1 Mutante tt4 nicht nachweisbar sind. Der Gehalt dieser Flavonole nimmt nach Zn-Applikation deutlich zu.

## 6. Literaturverzeichnis

**Arnon, D.I., & Stout, P.R.** (1939). "The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper." *Plant Physiology* **14**: 371-375.

**Baker, A.J.M., & Brooks, R.R.** (1989). "Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - A review of their distribution, ecology and phytochemistry." *Biorecovery* **1**: 81-126.

**Barceló, J., Guevara, P. & Poschenreider, C.** (1993). "Silicon amelioration of aluminium toxicity in teosinte (*Zea mays* L. ssp. *mexicana*)." *Plant and Soil* **154**: 249-255.

**Baylis, A.D., Gragopoulou, C., Davidson, K.J. & Birchall, J.D.** (1994). "Effect of silicon on the toxicity of aluminium to soybean." *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **25**: 537-546.

**Becher, M., Talke, I.N., Krall, L. & Krämer, U.** (2004). "Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*." *The Plant Journal* **37**: 261-268.

**Bert, V., Macnair, M.R., De Laguérie, P., Saumitou-Laprade, P. & Petit, D.** (2000). "Zinc tolerance and accumulation in metallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae)." *New Phytologist* **146**: 225-233.

**Bert, V., Bonnin, I., Saumitou-Laprade, P., De Laguérie, P. & Petit, D.** (2002). "Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations?" *New Phytologist* **155**: 47-57.

**Bringezu, K., Lichtenberger, O., Leopold, I. & Neumann, D.** (1999). "Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris*." *Journal of Plant Physiology* **154**: 536-546.

**Brune, A., Urbach, W. & Dietz, K.-J.** (1994). "Compartmentation and transport of zinc in barley primary leaves as basic mechanisms involved in zinc tolerance." *Plant, Cell and Environment* **17**: 153-162.

- Brune, A., Urbach, W. & Dietz, K.-J.** (1995). "Differential toxicity of heavy metals is partly related to a loss of preferential extraplasmic compartmentation: a comparison of Cd-, Mo-, Ni- and Zn-stress." *New Phytologist* **129**: 403-409.
- Bruns, I., Sutter, K., Menge, S., Neumann, D. & Krauss, G.-J.** (2001). "Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes." *Journal of Plant Physiology* **158**: 79-89.
- Cakmak, I., Erenoglu, B., Gulut, K.Y., Derici, R. & Römheld, V.** (1998). "Light mediated release of phytosiderophores in wheat and barley under iron or zinc deficiency." *Plant and Soil* **202**: 309-315.
- Chaney, R.L.** (1988). "Plants can utilize iron from Fe-N,N'-di-(2-hydroxybenzoyl)-ethylenediamine- N,N'-diacetic acid, a ferric chelate with  $10^6$  greater formation constant than Fe-EDDHA." *Journal of Plant Nutrition* **11**: 1033-1050.
- Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S. & Baker, A.J.M.** (1997). "Phytoremediation of soil metals." *Current Opinion in Biotechnology* **8**: 279-284.
- Chang, S.J., Tzeng, D.D. & Li, C.C.** (2002). "Effect of silicon nutrient on bacterial blight resistance of rice (*Oryza sativa* L.)." Abstract of Second Silicon in Agriculture Conference: 31-33.
- Chardonnens, A.N., Koevoets, P.L.M., Van Zanten, A., Schat, H. & Verkleij, J.A.C.** (1999). "Properties of Enhanced Tonoplast Zinc Transport in Naturally Selected Zinc-Tolerant *Silene vulgaris*." *Plant Physiology* **120**: 779-786.
- Clarke, N.D., & Berg, J.M.** (1998). "Zinc fingers in *Caenorhabditis elegans*: finding families and probing pathways." *Science* **282**: 2018-2022.
- Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D. & Schroeder, J.I.** (1999). "Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast." *Journal of the European Molecular Biology Organization* **18**: 3325-3333.
- Clemens, S.** (2001). "Molecular mechanisms of plant metal homeostasis and tolerance." *Planta* **212**: 475-486.

- Clemens, S., Schroeder, J.I. & Degenkolb, T.** (2001). "*Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase." *European Journal of Biochemistry* **268**: 3640-3643.
- Clemens, S., Palmgren, M.G. & Krämer, U.** (2002). "A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation." *Trends in Plant Science* **7**: 309-315.
- Cobbett, C.S.** (2000). "Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification." *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 211-216.
- Cobbett, C.S., & Goldsbrough, P.** (2002). "Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis." *Annual Review of Plant Biology* **53**: 159-182.
- Cocker, K.M., Evans, D.E. & Hodson, M.J.** (1998). "The amelioration of aluminium toxicity by silicon in wheat (*Triticum aestivum* L.): malate exudation as evidence for an *in planta* mechanism." *Planta* **204**: 318-323.
- Corrales, I., Poschenrieder, C. & Barceló, J.** (1997). "Influence of silicon pretreatment on aluminium toxicity in maize roots." *Plant and Soil* **190**: 203-209.
- Crowley, D.E., Wang, Y.C., Reid, C.P.P. & Szaniszlo, P.J.** (1991). "Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants." *Plant and Soil* **130**: 179-198.
- De Vos, C.H.R., Schat, H., Vooijs, R. & Ernst, W.H.O.** (1989). "Copper-induced damage to the permeability barrier in the roots of *Silene cucubalus*." *Journal of Plant Physiology* **135**: 164-169.
- De Vos, C.H.R., Schat, H., De Waal, M.A.M., Vooijs, R. & Ernst, W.H.O.** (1991). "Increased resistance to copper-induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*." *Physiologia Plantarum* **82**: 523-528.
- De Vos, C.H.R., Vonk, M.J., Vooijs, R. & Schat, H.** (1992). "Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*." *Plant Physiology* **98**: 853-858.
- Delhaize, E., Hebb, D.M., Richards, K.D., Lin, J.-M., Ryan, P.R. & Gardner, R.C.** (1999). "Cloning and expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphatidylserine synthase cDNA." *Journal of Biological Chemistry* **274**: 7082-7088.

**Dengenhardt, J., Larsen, P.B., Howell, S.H. & Kochian, L.V.** (1998). "Aluminium resistance in the *Arabidopsis* mutant *alr-104* is caused by an aluminium-induced increase in rhizosphere pH." *Plant Physiology* **117**: 19-27.

**Dietz, K.-J., Baier, M. & Krämer, U.** (1999). "Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad, M.N.V., Heavy metal stress in plants: Molecules to Ecosystem." Springer Verlag, Berlin: 73-97.

**Epstein, E.** (1994). "The anomaly of silicon in plant biology." *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **91**: 11-17.

**Epstein, E.** (1999). "Silicon." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 641-664.

**Ernst, W.H.O.** (1974). "Schwermetallvegetation der Erde." Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

**Ernst, W.H.O.** (1990). "Mine vegetation in Europe. In: Shaw, A.J., ed. Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects." CRC Press: 21-36.

**Ernst, W.H.O., Verkleij, J.A.C. & Schat, H.** (1992). "Metal tolerance in plants." *Acta Botanica Neerlandica* **41**: 229-248.

**Fahey, R.C., Newton, G.L., Dorian, R. & Kosower, E.M.** (1981). "Analysis of biological thiols: quantitative determination of thiols at the picomole level based upon derivatization with monobromobimane and separation by cation-exchange chromatography." *Analytical Biochemistry* **111**: 357-365.

**Fodor, E., Szabó-Nagy, A. & Erdei, L.** (1995). "The effects of cadmium on the fluidity and H<sup>+</sup>-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots." *Journal of Plant Physiology* **147**: 87-92.

**Fox, T.C., & Guerinot, M.L.** (1998). "Molecular biology of cation transport in plants." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 669-696.

**Godbold, D.L., Horst, W.J., Collins, J.C., Thurman, D.A. & Marschner, H.** (1984). "Accumulation of zinc and organic acids in roots of zinc tolerant and non-tolerant ecotypes of *Deschampsia caespitosa*." *Journal of Plant Physiology* **116**: 59-69.

**Goldsbrough, P.** (2000). "Metal tolerance in plants: the role of phytochelatins and metallothioneins. In: Terry, N. & Banuelos, G., eds. *Phytoremediation of contaminated soil and water*." CRC Press: 221-233.

**Gries, G.E., & Wagner, G.J.** (1998). "Association of nickel versus transport of cadmium and calcium in tonoplast vesicles of oat roots." *Planta* **204**: 390-396.

**Grill, E., Winnacker, E.-L. & Zenk, M.H.** (1985). "Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants." *Science* **230**: 674-676.

**Grill, E., Winnacker, E.-L. & Zenk, M.H.** (1987). "Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins." *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **84**: 439-443.

**Grill, E., Winnacker, E.-L. & Zenk, M.H.** (1988a). "Occurrence of heavy metal binding phytochelatin in plants growing in a mining refuse area." *Experientia* **44**: 539-540.

**Grill, E., Thumann, J., Winnacker, E.-L. & Zenk, M.H.** (1988b). "Induction of heavy-metal binding phytochelatin by inoculation of cell cultures in standard media." *Plant Cell Reports* **7**: 375-378.

**Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.-L. & Zenk, M.H.** (1989). "Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase)." *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **86**: 6838-6842.

**Grotz, N., Fox, T.C., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M.L. & Eide, D.** (1998). "Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency." *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **95**: 7220-7224.

**Ha, S.B., Smith, A.P., Howden, R., Dietrich, W.M., Bugg, S., O'Connell, M.J., Goldsbrough, P.B. & Cobbett, C.S.** (1999). "Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *The Plant Cell* **11**: 1153-1163.

- Hall, J.L.** (2002). "Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance." *Journal of Experimental Botany* **53**: 1-11.
- Hamer, D.H.** (1986). "Metallothionein." *Annual Review of Biochemistry* **55**: 913-951.
- Hammerschmidt, R., & Kuc, J.** (1982). "Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber." *Physiological Plant Pathology* **20**: 61-71.
- Hammond, K.E., Evans, D.E. & Hodson, M.J.** (1995). "Aluminium/silicon interactions in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings." *Plant and Soil* **173**: 89-95.
- Harmens, H., Den Hartog, P.R., Bookum, W.M.T. & Verkleij, J.A.C.** (1993). "Increased Zinc Tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke Is Not Due to Increased Production of Phytochelatins." *Plant Physiology* **103**: 1305-1309.
- Harmens, H., Koevoets, P.L.M., Verkleij, J.A.C. & Ernst, W.H.O.** (1994). "The role of low molecular weight organic acids in the mechanism of increased Zn tolerance in *Silene vulgaris* (Moench.) Garcke." *New Phytologist* **126**: 615-621.
- Heumann, H.-G.** (2002). "Ultrastructural localization of zinc in zinc-tolerant *Armeria maritima* ssp. *halleri* by autometallography." *Journal of Plant Physiology* **159**: 191-203.
- Hildebrand, M., Higgins, D.R., Busser, K. & Volcani, B.E.** (1993). "Silicon-responsive cDNA clones isolated from the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis*." *Gene* **132**: 213-218.
- Hildebrand, M., Volcani, B.E., Gassmann, W. & Schroeder, J.I.** (1997). "A gene family of silicon transporters." *Nature* **385**: 688-689.
- Hildebrand, M., Dahlin, K. & Volcani, B.E.** (1998). "Characterization of a silicon transporter gene family in *Cylindrotheca fusiformis*: Sequences, expression analysis, and identification of homologs in other diatoms." *Molecular and General Genetics* **260**: 480-486.
- Hoagland, D.R., & Arnon, D.I.** (1938). "The water culture method for growing plants without soil." *California Agricultural Experiment Station Circular 347*, College of Agriculture, University of California, Berkeley: 1-39.

- Hodson, M.J., & Sangster, A.G.** (1993). "The interaction between silicon and aluminium in *Sorghum bicolor* (L.) Moench: Growth analysis and x-ray microanalysis." *Annals of Botany* **72**: 389-400.
- Hodson, M.J., & Evans, D.E.** (1995). "Aluminium/silicon interactions in higher plants." *Journal of Experimental Botany* **46**: 161-171.
- Hodson, M.J., & Sangster, A.G.** (1998). "Mineral deposition in the needles of white spruce [*Picea glauca* (Moench.) Voss]." *Annals of Botany* **82**: 375-385.
- Horiguchi, T.** (1988). "Mechanism of manganese toxicity and tolerance of plants. IV. Effects of silicon on alleviation of manganese toxicity of rice plants." *Japan Journal of Soil Science and Plant Nutrition* **34**: 65-73.
- Horst, W.J., Fecht, M., Naumann, A., Wissemeier, A.H. & Maier, P.** (1999). "Physiology of manganese toxicity and tolerance in *Vigna unguiculata* (L.) Walp." *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **162**: 263-274.
- Howden, R., Goldsbrough, P.B., Andersen, C.R. & Cobbett, C.S.** (1995). "Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient." *Plant Physiology* **107**: 1059-1066.
- Iwasaki, K., Maier, P., Fecht, M. & Horst, W.J.** (2002a). "Effects of silicon supply on apoplastic manganese concentrations in leaves and their relation to manganese tolerance in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)." *Plant and Soil* **238**: 281-288.
- Iwasaki, K., Maier, P., Fecht, M. & Horst, W.J.** (2002b). "Leaf apoplastic silicon enhances manganese tolerance of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)." *Journal of Plant Physiology* **159**: 167-173.
- Jones, L.H.P., & Handreck, K.A.** (1967). "Silica in soils, plants, and animals." *Advances in Agronomy* **19**: 107-149.
- Kanto, T.** (2002). "Research of silicate for improvement of plant defense against pathogens in Japan." *Abstract of Second Silicon in Agriculture Conference*: 22-26.

- Kauss, H., Seehaus, K., Franke, R., Gilbert, S., Dietrich, R.A. & Kröger, N.** (2003). "Silica deposition by a strongly cationic proline-rich protein from systemically resistant cucumber plants." *The Plant Journal* **33**: 87-95.
- Kerkeb, L., & Krämer, U.** (2003). "The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*." *Plant Physiology* **131**: 716-724.
- Kidd, P.S., Llugany, M., Poschenrieder, C., Gunsé, B. & Barceló, J.** (2001). "The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.)." *Journal of Experimental Botany* **52**: 1339-1352.
- Kishinami, I., & Widholm, J.M.** (1987). "Characterization of Cu and Zn resistant *Nicotiana plumbaginifolia* suspension cultures." *Plant and Cell Physiology* **28**: 203-210.
- Koch, M., Bishop, J. & Mitchell-Olds, T.** (1999). "Molecular systematics and evolution of *Arabidopsis* and *Arabis*." *Plant Biology* **1**: 529-537.
- Kollmeier, M., Dietrich, P., Bauer, C.S., Horst, W.J. & Hedrich, R.** (2001). "Aluminium activates a citrate-permeable anion channel in the Al-sensitive zone of the maize root apex: a comparison between an Al-sensitive and an Al-tolerant cultivar." *Plant Physiology* **126**: 397-410.
- Koornneef, M.** (1990). "Mutations affecting the testa color in *Arabidopsis*." *Arabidopsis Information Service* **28**: 1-4.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M. & Smith, J.A.C.** (1996). "Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel." *Nature* **379**: 635-638.
- Krämer, U., Pickering, I.J., Prince, R.C., Raskin, I. & Salt, D.E.** (2000). "Subcellular Localization and Speciation of Nickel in Hyperaccumulator and Non-Accumulator *Thlaspi* Species." *Plant Physiology* **122**: 1343-1354.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.J. & McGrath, S.P.** (2000). "Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*." *Planta* **212**: 75-84.

- Lane, B., Kajioka, R. & Kennedy, T.** (1987). "The wheat-germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein." *Biochemistry and Cell Biology* **65**: 1001-1005.
- Lewis, S., Handy, R.D., Cordi, B., Billingham, Z. & Depledge, M.H.** (1999). "Stress proteins (HSPs): methods of detection and their use as an environmental biomarker." *Ecotoxicology* **8**: 351-368.
- Liang, Y., Chen, Q., Zhang, W. & Ding, R.** (2002). "Exogenous silicon increases antioxidant enzyme activities and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.)." Abstract of Second Silicon in Agriculture Conference: 140-151.
- Lichtenthaler, H.K., & Wellburn, A.R.** (1983). "Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents." *Biochemical Society Transactions* **603**: 591-592.
- Linsmaier, E.M., & Skoog, F.** (1965). "Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures." *Physiologia Plantarum* **18**: 100-127.
- Ma, J.F., & Takahashi, E.** (1990a). "Effect of silicon on the growth and phosphorus uptake of rice." *Plant and Soil* **126**: 115-119.
- Ma, J.F., & Takahashi, E.** (1990b). "The effect of silicic acid on rice in a P-deficient soil." *Plant and Soil* **126**: 121-125.
- Ma, J.F., Hiradate, S., Nomoto, K., Iwashita, T. & Matsumoto, H.** (1997). "Internal detoxification mechanism of Al in Hydrangea (Identification of Al form in the leaves)." *Plant Physiology* **113**: 1033-1039.
- Ma, J.F., Hiradate, S. & Matsumoto, H.** (1998). "High aluminium resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminium internally." *Plant Physiology* **117**: 753-759.
- Ma, J.F., Miyake, Y. & Takahashi, E.** (2001a). "Silicon as a beneficial element for crop plants. In: *Silicon in Agriculture*, ed. Datnoff, I.E., Snyder, G.H. & Korndorfer, G.H." Elsevier Science Publishing, Amsterdam: 17-39.

**Ma, J.F., Goto, S., Tamai, K. & Ichii, M.** (2001b). "Role of Root Hairs and Lateral Roots in Silicon Uptake by Rice." *Plant Physiology* **127**: 1773-1780.

**Ma, J.F., Ryan, P.R. & Delhaize, E.** (2001c). "Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids." *Trends in Plant Science* **6**: 273-278.

**Ma, J.F., Tamai, K., Ichii, M. & Wu, K.** (2002). "A rice mutant defective in active Si uptake." *Plant Physiology* **130**: 2111-2117.

**Ma, J.F.** (2004). "Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses." *Soil Science and Plant Nutrition* **50**: 11-18.

**Macnair, M.R., Bert, V., Huitson, S.B., Saumitou-Laprade, P. & Petit, D.** (1999). "Zinc tolerance and hyperaccumulation are genetically independent characters." *Proceedings of the Royal Society, B.* **266**: 2175-2179.

**Macnair, M.R., Tilstone, G.H. & Smith, S.E.** (2000). "The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants: In *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, Terry, N. & Bañuelos, G. eds." CRC Press: 235-250.

**Marschner, H.** (1995). "Mineral Nutrition of Higher Plants." 2nd Ed. Academic Press, London.

**Mathys, W.** (1977). "The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc-resistance in herbage plants." *Physiologia Plantarum* **40**: 130-136.

**Meharg, A.A.** (1993). "The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms." *Physiologia Plantarum* **88**: 191-198.

**Miyake, Y., & Takahashi, E.** (1983). "Effect of silicon on the growth of solution-cultured cucumber plant." *Soil Science and Plant Nutrition* **29**: 71-83.

**Murphy, A., & Taiz, L.** (1995). "Comparison of Metallothionein Gene Expression and Nonprotein Thiols in Ten *Arabidopsis* Ecotypes (Correlation with Copper Tolerance)." *Plant Physiology* **109**: 945-954.

- Murphy, A., Eisinger, W.R., Shaff, J.E., Kochian, L.V. & Taiz, L.** (1999). "Early Copper-Induced Leakage of K<sup>+</sup> from *Arabidopsis* Seedlings Is Mediated by Ion Channels and Coupled to Citrate Efflux." *Plant Physiology* **121**: 1375-1382.
- Neumann, D., Lichtenberger, O., Günther, D., Tschiersch, K. & Nover, L.** (1994). "Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants." *Planta* **194**: 360-367.
- Neumann, D., Zur Nieden, U., Lichtenberger, O. & Leopold, I.** (1995). "How does *Armeria maritima* tolerate high heavy metal concentrations?" *Journal of Plant Physiology* **146**: 704-717.
- Neumann, D., Lichtenberger, O., Schwieger, W. & Zur Nieden, U.** (1997a). "Silicon storage in selected dicotyledons." *Botanica Acta* **110**: 282-290.
- Neumann, D., Zur Nieden, U., Schwieger, W., Leopold, I. & Lichtenberger, O.** (1997b). "Heavy metal tolerance of *Minuartia verna*." *Journal of Plant Physiology* **151**: 101-108.
- Neumann, D., Schwieger, W. & Lichtenberger, O.** (1999). "Accumulation of silicon in the monocotyledons *Deschampsia caespitosa*, *Festuca lemmanii* and *Schoenus nigricans*." *Plant Biology* **1**: 290-298.
- Neumann, D., & Zur Nieden, U.** (2001). "Silicon and heavy metal tolerance of higher plants." *Phytochemistry* **56**: 685-692.
- Okuda, A., & Takahashi, E.** (1962a). "Studies on the physiological role of silicon in crop plant: VIII. Some examination on the specific behavior of low land rice in silicon uptake." *Journal of the Science of Soil and Manure, Japan* **33**: 217-221.
- Okuda, A., & Takahashi, E.** (1962b). "Studies on the physiological role of silicon in crop plant: IX. Effect of various metabolic inhibitors on the silicon uptake by rice plant." *Journal of the Science of Soil and Manure, Japan* **33**: 453-455.
- Papernik, L.A., Bethea, A.S., Singleton, T.E., Magalhaes, J.V., Garvin, D.F. & Kochian, L.V.** (2001). "Physiological basis of reduced Al tolerance in ditelosomic lines of Chinese Spring wheat." *Planta* **212**: 829-834.

**Pellet, D.M., Papernik, L.A. & Kochian, L.V.** (1996). "Multiple aluminium-resistance mechanisms in wheat. Roles of root apical phosphate and malate exudation." *Plant Physiology* **112**: 591-597.

**Persans, M.W., Nieman, K. & Salt, D.E.** (2001). "Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*." *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**: 9995-10000.

**Peterson, C.A., Emanuel, M.E. & Humphrey, G.B.** (1981). "Pathway of movement of apoplastic fluorescent tracers through the endodermis at the site of secondary root formation in corn (*Zea mays*) and broad bean (*Vicia faba*)." *Canadian Journal of Botany* **59**: 618-625.

**Pich, A., & Scholz, I.** (1996). "Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem." *Journal of Experimental Botany* **47**: 41-47.

**Pineros, M., & Kochian, L.V.** (2001). "A patch clamp study on the physiology of aluminium toxicity and aluminium tolerance in *Zea mays*: identification and characterization of Al<sup>3+</sup>-induced anion channels." *Plant Physiology* **125**: 292-305.

**Prasad, M.N.V.** (1999). "Metallothioneins and metal binding complexes in plants. In: Prasad, M.N.V. & Hagemeyer, J., eds. *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*." Springer Verlag, Berlin: 51-72.

**Rausser, W.E.** (1995). "Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function." *Plant Physiology* **109**: 1141-1149.

**Rausser, W.E.** (1999). "Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins." *Cell Biochemistry and Biophysics* **32**: 19-48.

**Raven, J.A.** (2001). "Silicon transport at the cell and tissue level. In: Datnoff, L.E., Snyder, G.H. & Korndorfer, G.H. eds. *Silicon in Agriculture*." Elsevier Science Publishing, Amsterdam: 41-55.

- Rea, P.A., Li, Z.-S., Lu, Y.-P. & Drozdowicz, Y.M.** (1998). "From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 727-760.
- Reeves, R.D., & Baker, A.J.M.** (2000). "Metal-accumulating plants. In: Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment. ed. by Raskin, I. & Ensley, B.D." John Wiley & Sons Inc., NY, USA: 193-229.
- Rengel, Z., Römheld, V. & Marschner, H.** (1998). "Uptake of zinc and iron by wheat genotypes differing in tolerance to zinc deficiency." *Journal of Plant Physiology* **152**: 433-438.
- Reynolds, E.S.** (1963). "The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy." *Journal of Cell Biology* **17**: 208-212.
- Römheld, V.** (1991). "The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: An ecological approach." *Plant and Soil* **130**: 127-134.
- Ryan, P.R., Skerrett, M., Findlay, G.P., Delhaize, E. & Tyerman, S.** (1997). "Aluminium activates an anion channel in the apical cells of wheat roots." *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **94**: 6547-6552.
- Ryan, P.R., Delhaize, E., & Jones, D.L.** (2001). "Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 527-560.
- Saito, C., Ueda, T., Abe, H., Wada, Y., Kuroiwa, T., Hisada, A., Furuya, M. & Nakano, A.** (2002). "A complex and mobile structure forms a distinct subregion within the continuous vacuolar membrane in young cotyledons of *Arabidopsis*." *The Plant Journal* **29**: 245-255.
- Salt, D.E., & Rauser, W.E.** (1995). "MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots." *Plant Physiology* **107**: 1293-1301.
- Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J. & Raskin, I.** (1995). "Mechanisms of Cadmium Mobility and Accumulation in Indian Mustard." *Plant Physiology* **109**: 1427-1433.

**Salt, D.E., Prince, R.C., Baker, A.J.M., Raskin, I. & Pickering, I.J.** (1999). "Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy." *Environmental Science and Technology* **33**: 713-717.

**Salt, D.E., Kato, N., Krämer, U., Smith, R.D. & Raskin, I.** (2000). "The role of root exudates in Ni hyperaccumulation and tolerance in accumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. In: Phytoremediation of contaminated soil and water, Terry, N. & Bañuelos, G." CRC Press: 189-200.

**Samuels, A.L., Glass, A.D.M., Ehret, D.L. & Menzies, J.G.** (1991). "Mobility and deposition of silicon in cucumber plants." *Plant, Cell and Environment* **14**: 485-492.

**Sangster, A.G., & Hodson, M.J.** (1986). "Silica in higher plants." CIBA Foundation Symposium **121**: 90-111.

**Sarret, G., Saumitou-Laprade, P., Bert, V., Proux, O., Hazemann, J.-L., Traverse, A., Marcus, A.M. & Manceau, A.** (2002). "Forms of Zinc Accumulated in the Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*." *Plant Physiology* **130**: 1815-1826.

**Schat, H., & Kalff, M.M.A.** (1992). "Are phytochelatins involved in differential heavy metal tolerance or do they merely reflect metal-imposed strain?" *Plant Physiology* **99**: 1475-1480.

**Schat, H., Llugany, M. & Bernhard, R.** (2000). "Metal-specific patterns of tolerance, uptake, and transport of heavy metals in hyperaccumulating and non-hyperaccumulating metallophytes." In: Terry, N., Bañuelos, G., eds. *Phytoremediation of contaminated soils and water*. CRC Press: 171-188.

**Schwieger, W., Heyer, W., Wolf, F. & Bergk, K.-H.** (1987). "Zur Synthese von kristallinen Metallsilicathydraten mit Schichtstruktur." *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* **548**: 204-216.

**Senden, M.H.M.N., Van Paassen, F.J.M., Van der Meer, A.J.G.M., & Wolterbeek, H.T.** (1992). "Cadmium - citric acid - xylem cell wall interactions in tomato plants." *Plant, Cell and Environment* **15**: 71-79.

**Shen, Z.G., Zhao, F.J. & McGrath, S.P.** (1997). "Uptake and transport of zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and the non-hyperaccumulator *Thlaspi ochroleucum*." *Plant, Cell and Environment* **20**: 898-906.

**Shirley, B.W., Kubasek, W.L., Storz, G., Bruggemann, E., Koornneef, M., Ausubel, F.M. & Goodman, H.M.** (1995). "Analysis of *Arabidopsis* mutant deficient in flavonoid biosynthesis." *The Plant Journal* **8**: 659-671.

**Spurr, A.R.** (1969). "A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy." *Journal of Ultrastructure Research* **26**: 31-43.

**Stephan, U.W., Schmidke, I. & Pich, A.** (1994). "Phloem translocation of Fe, Cu, Mn and Zn in *Ricinus* seedlings in relation to the concentrations of nicotianamine, an endogenous chelator for divalent metal ions, in different seedling parts." *Plant and Soil* **165**: 181-188.

**Takahashi, E., Matsumoto, H., Syo, S. & Miyake, Y.** (1976a). "Effect of germanium on the growth of plants with special reference to the silicon nutrition (part 3)." *Journal of the Science of Soil and Manure, Japan* **47**: 217-221.

**Takahashi, E., Syo, S. & Miyake, Y.** (1976b). "Effect of germanium on the growth of plants with special reference to the silicon nutrition (part 1)." *Journal of the Science of Soil and Manure, Japan* **47**: 183-190.

**Takahashi, E., Syo, S. & Miyake, Y.** (1976c). "Effect of germanium on the growth of plants with special reference to the silicon nutrition (part 2)." *Journal of the Science of Soil and Manure, Japan* **47**: 191-197.

**Takahashi, E., Ma, J.F. & Miyake, Y.** (1990). "The possibility of silicon as an essential element for higher plants." *Comments in Journal of Agriculture and Food Chemistry* **2**: 99-122.

**Tester, M., & Leigh, R.A.** (2001). "Partitioning of nutrient transport processes in roots." *Journal of Experimental Botany* **52**: 445-457.

**Tolrà, R.P., Poschenrieder, C. & Barceló, J.** (1996). "Zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. II. Influence on organic acids." *Journal of Plant Nutrition* **19**: 1541-1550.

**Turner, R.G., & Marshall, C.** (1971). "The accumulation of  $^{65}\text{Zn}$  by root homogenates of zinc-tolerant and non-tolerant clones of *Agrostis tenuis* Sibth." *New Phytologist* **70**: 539-545.

**Van Assche, F., & Clijsters, H.** (1990). "Effects of metals on enzyme activity in plants." *Plant, Cell and Environment* **13**: 195-206.

**Van Hoof, N.A.L.M., Hassinen, V.H., Hakvoort, H.W.J., Ballintijn, K.F., Schat, H., Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H.O., Karenlampi, S.O. & Tervahauta, A.I.** (2001). "Enhanced Copper Tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke Populations from Copper Mines Is Associated with Increased Transcript Levels of a 2b-Type Metallothionein Gene." *Plant Physiology* **126**: 1519-1526.

**Van Steveninck, R.F.M., Barbare, A., Fernando, D.R. & Van Steveninck, M.E.** (1994). "The binding of zinc, but not cadmium, by phytic acid in roots of crop plants." *Plant and Soil* **167**: 157-164.

**Van Steveninck, R.F.M., Van Steveninck, M.E., Wells, A.J. & Fernando, D.R.** (1990). "Zinc tolerance and the binding of zinc as zinc phytate in *Lemna minor*. X-Ray microanalytical evidence." *Journal of Plant Physiology* **137**: 140-146.

**Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.-P. & Rea, P.A.** (1999). "AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution." *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96**: 7110-7115.

**Vatamaniuk, O.K., Bucher, E.A., Ward, J.T. & Rea, P.A.** (2001). "A new pathway for heavy metal detoxification in animals: phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*." *Journal of Biological Chemistry* **276**: 20187-20820.

**Verkleij, J.A.C., & Schat, H.** (1990). "Mechanisms of metal tolerance in higher plants. In: Shaw, A.J., ed. *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*." CRC Press: 179-193.

**Vierling, E.** (1991). "The roles of heat shock proteins in plants." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 579-620.

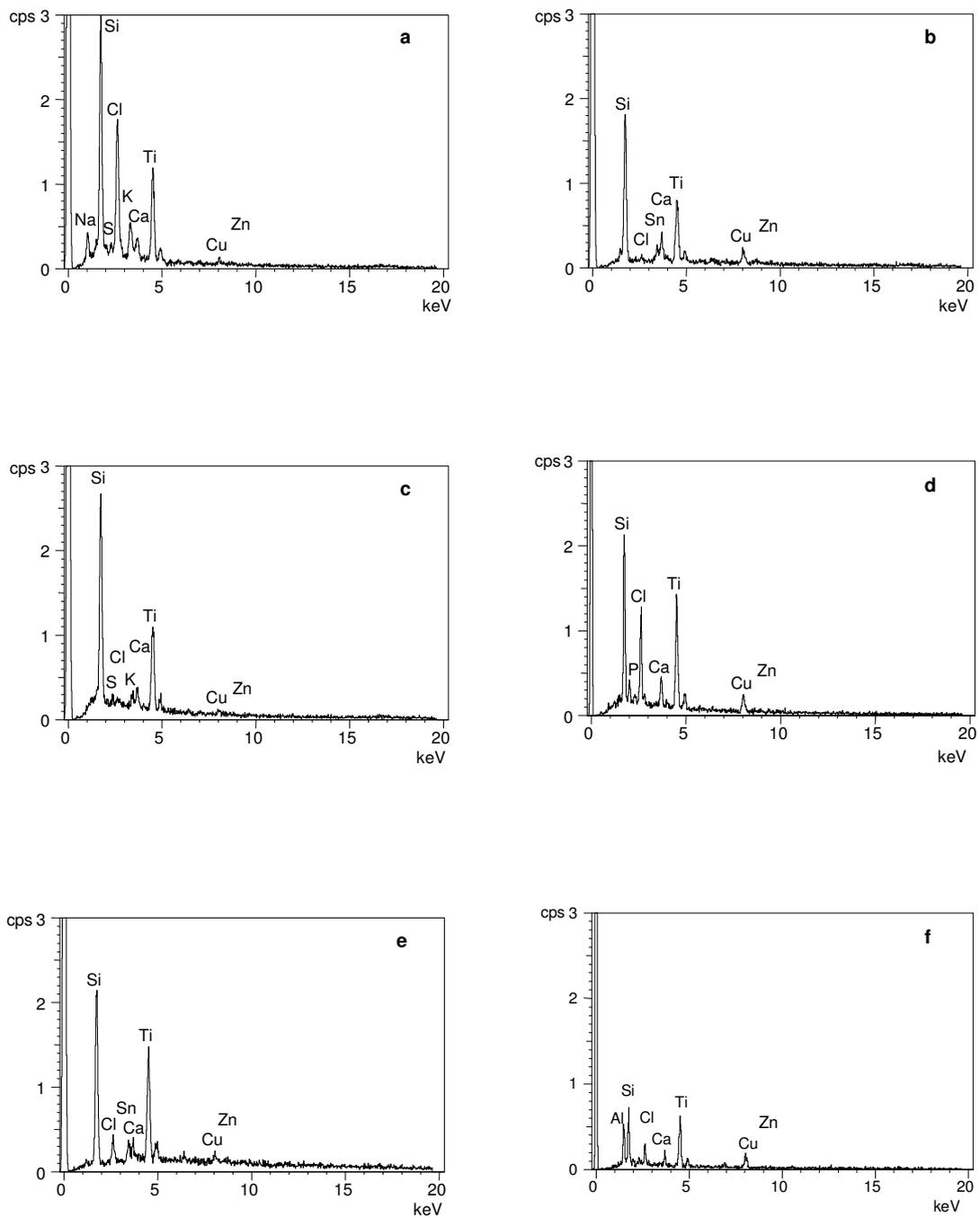
**Vögeli-Lange, R., & Wagner, G.J.** (1990). "Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves." *Plant Physiology* **92**: 1086-1093.

- Von Wiren, N., Marschner, H. & Römheld, V.** (1996). "Roots of Iron-Efficient Maize also Absorb Phytosiderophore-Chelated Zinc." *Plant Physiology* **111**: 1119-1125.
- Wang, J., Evangelou, B.P., Nielsen, M.T., Wagner, G.J.** (1992). "Computer simulated evaluation of possible mechanisms for sequestering metal ion activity in plant vacuoles. II. Zinc." *Plant Physiology* **99**: 621-626.
- Wang, Y., Stass, A. & Horst, W.J.** (2004). "Apoplastic Binding of Aluminium Is Involved in Silicon-Induced Amelioration of Aluminium Toxicity in Maize." *Plant Physiology* **136**: 3762-3770.
- Watanabe, T., Osaki, M., Yoshihara, T. & Tadano, T.** (1998). "Distribution and chemical speciation of aluminium in the Al accumulator plant, *Melastoma malabathricum* L." *Plant and Soil* **201**: 165-173.
- Weber, M., Harada, E., Vess, C., Von Roepenack-Lahaye E. & Clemens, S.** (2004). "Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors." *The Plant Journal* **37**: 269-281.
- Weiersbye-Witkowski, I.M., Przybylowicz, W.J., Straker, C.J. & Mesjasz-Przybylowicz, J.** (1997). "Elemental micro-PIXE mapping of hypersensitive lesions in *Lagenaria sphaerica* (Cucurbitaceae) resistant to *Sphaerotheca fuliginea* (powdery mildew)." *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B* **130**: 388-395.
- Werner, D.** (1967a). "Untersuchungen über die Rolle der Kieselsäure in der Entwicklung höherer Pflanzen. I. Analyse der Hemmung durch Germaniumsäure." *Planta* **76**: 25-36.
- Werner, D.** (1967b). "Hemmung der Chlorophyllsynthese und der NADP<sup>+</sup>-abhängigen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase durch Germaniumsäure bei *Cyclotella cryptica*." *Archiv für Mikrobiologie* **57**: 51-60.
- Wollgiehn, R., & Neumann, D.** (1999). "Metal stress response and tolerance of cultured cells from *Silene vulgaris* and *Lycopersicon peruvianum*: role of heat stress proteins." *Journal of Plant Physiology* **154**: 547-553.
- Zenk, M.H.** (1996). "Heavy metal detoxification in higher plants-a review." *Gene* **179**: 21-30.

**Zeyen, R.J.** (2002). "Silicon in plant cell defenses against cereal powdery mildew disease." Abstract of Second Silicon in Agriculture Conference: 15-21.

**Zhang, W.-H., Ryan, P.R. & Tyerman, S.** (2001). "Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminium in the apical cells of wheat roots." *Plant Physiology* **125**: 1459-1472.

**Zhao, F.J., Lombi, E., Breedon, T. & McGrath, S.P.** (2000). "Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*." *Plant, Cell and Environment* **23**: 507-514.



**Abb. 3.41 a-f: EDX-Spektren von der Zellwand**

- |                        |  |
|------------------------|--|
| a, b: - unbehandelt    | (a - <i>S. cucubalus</i> ; b - <i>S. jennisseensis</i> ) |
| c, d: - nach Cu-Stress | (c - <i>S. cucubalus</i> ; d - <i>S. jennisseensis</i> ) |
| e, f: - nach Zn-Stress | (e - <i>S. cucubalus</i> ; f - <i>S. jennisseensis</i> ) |

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die die Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Dierk Scheel danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die sehr guten Arbeitsbedingungen am Leibniz-IPB, sowie für die Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Dr. Dieter Neumann und Frau Dr. Uta zur Nieden für die Überlassung und Betreuung des interessanten Themas, die Diskussionsbereitschaft und die vielen Anregungen und Ideen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Dr. Stephan Clemens gilt mein Dank für die weiterführende Betreuung. Auch ihm danke ich für die Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen Tipps im letzten Drittel meiner Arbeit.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Mandy Birschwilks für die Arbeiten am Elektronenmikroskop.

Herrn Dr. Willibald Schliemann danke ich für Durchführung der GC/MS-Untersuchungen (Abteilung: Sekundärstoffwechsel).

Herrn Dr. Alfred Baumert danke ich für die Analysierung und Quantifizierung von phenolischen Verbindungen (Abteilung: Sekundärstoffwechsel).

Bei Herrn Dr. Hans-Joachim Stärk (UFZ Leipzig) und Frau Diana Becher (Fachbereich Geowissenschaften) bedanke ich mich für die Arbeiten am ICP-MS.

Gedankt sei an dieser Stelle auch allen Mitarbeitern der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie, insbesondere Frau Silvia Krüger.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich am Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle/Saale, 2. November 2005

Susan Wassersleben

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben**

Name: Susan Wassersleben  
Geburtsdatum 10.06.1974  
Geburtsort Salzwedel  
Nationalität deutsch

Anschrift Heinrich - Heine - Str. 7  
06114 Halle/Saale

### **Schulbildung**

1981 - 1990 Besuch der allgemeinbildenden Comenius POS in Salzwedel  
1990 - 1991 Besuch des Friedrich-Ludwig-Jahn-Gymnasiums in Salzwedel  
1990 - 1993 Besuch des Albert-Schweitzer-Gymnasiums in Salzwedel

### **Studium**

1993 - 2000 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg,  
Fachbereich Biologie

2000 Abschluss Diplom Biologie

Diplomarbeit am Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz der  
MLU Halle/Wittenberg  
Thema der Diplomarbeit:  
" "

### **Bisherige Tätigkeit**

seit 2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Leibniz-Institut für  
Pflanzenbiochemie in Halle/Saale, Abteilung Stress- und  
Entwicklungsbiologie und Anfertigung einer Promotionsarbeit unter  
Anleitung von Prof. Dr. D. Scheel und Dr. D. Neumann