

Technische Universität München  
und  
Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktionen  
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

Untersuchungen der Entgiftungskapazität verschiedener Pflanzenarten im  
Hinblick auf ihre Verwendung für die Phytoremediation unter  
Berücksichtigung von Schwermetallen

Lyudmila Slaveykova Lyubenova

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung  
des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

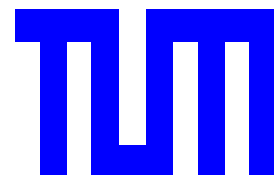
Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. Urs Schmidhalter  
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Peter Schröder  
2. Univ.- Prof. Dr. Arnulf Melzer

Die Dissertation wurde am 08.10.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung  
und Umwelt am 13.11.2007 angenommen.

Die vorliegende Doktorarbeit ist im Rahmen eines vom Freistaat Bayern finanzierten Forschungsstipendiums, vertreten durch das Bayerische Hochschulzentrum für Mittel-, Ost- und Südosteuropa (BAYHOST), entstanden. Das Forschungsvorhaben wurde am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Abteilung Mikrogen-Pflanzen Interaktionen bearbeitet.

Doktorvater: apl. Prof. Dr. Peter Schröder

Bearbeitungszeitraum: Januar 2005 - August 2007



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Doktorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe. Weiterhin erkläre ich, dass die digitalen Abbildungen, die als solche gekennzeichnet sind, nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall eine inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

München, den 08. Oktober 2007

Lyudmila Slaveykova Lyubenova

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Welche Metalle sind „schwer“?</b> .....	1
<b>1.2 Quellen der Umweltverschmutzung</b> .....	2
<b>1.3 Eigenschaften der verwendeten Schwermetalle</b> .....	3
1.3.1 Cadmium .....	3
1.3.2 Arsen .....	4
1.3.3 Blei .....	4
<b>1.4 Phytoremediation</b> .....	5
<b>1.5 Mechanismen für die Metallaufnahme in Pflanzen</b> .....	8
1.5.1 Faktoren, die die Metallaufnahme beeinflussen .....	8
1.5.2 Metalltransport im Sproß .....	9
1.5.3 Hyperakkumulatoren und Excluders .....	10
<b>1.6 Oxidativer Stress</b> .....	12
1.6.1 Wie wird oxidativer Stress in Gegenwart von Schwermetallen verursacht? .....	12
1.6.2 Ort der Aktivierung der Sauerstoffprodukte .....	12
1.6.3 Oxidative Schädigung der Lipide .....	13
1.6.4 Oxidativer Schaden an den Proteinen .....	14
<b>1.7 Abwehrmechanismen gegen den oxidativen Stress</b> .....	14
1.7.1 Superoxiddismutase .....	14
1.7.2 Katalase .....	15
1.7.3 Ascorbinsäure .....	15
1.7.4 Peroxidase .....	16
1.7.5 Glutathionreduktase .....	16
1.7.6 Glutathion .....	17
1.7.7 Glutathion S-Transferasen .....	17
1.7.8 Phytochelatine .....	18
1.7.9 Carotinoide .....	19
<b>1.8 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	20
<b>2. Material und Methoden</b> .....	21
<b>2.1. Beschreibung der verwendeten Pflanzenarten</b> .....	21
2.1.1 <i>Typha latifolia</i> .....	21
2.1.2 <i>Helianthus annuus</i> .....	21
2.1.3 <i>Nicotiana tabacum</i> .....	22
<b>2.2 Pflanzenbehandlungen</b> .....	23
2.2.1 Behandlungsreihe <i>Typha latifolia</i> .....	23
2.2.1.1 72 Stunden <i>in vivo</i> Behandlung von <i>Typha latifolia</i> .....	25
2.2.1.2 72 Tage <i>in vivo</i> Behandlung von <i>Typha latifolia</i> .....	25

---

2.2.2	Behandlungsreihe <i>Helianthus annuus</i> .....	26
2.2.3	Behandlungsreihe <i>Nicotiana tabacum</i> .....	28
<b>2.3</b>	<b>Aufarbeitung des Pflanzenmaterials (Enzymextraktion)</b> .....	<b>29</b>
<b>2.4</b>	<b>Bestimmung der Proteingehalte</b> .....	<b>30</b>
<b>2.5</b>	<b>Bestimmung der Enzymaktivitäten</b> .....	<b>31</b>
2.5.1	Glutathion S-Transferasen (GST)-Aktivität .....	31
2.5.2	Peroxidase-Aktivität.....	32
2.5.3	Ascorbatperoxidase-Aktivität .....	33
2.5.4	Monodehydroascorbatreduktase-Aktivität .....	34
2.5.5	Dehydroascorbatreduktase-Aktivität.....	34
2.5.6	Glutathionreduktase-Aktivität .....	35
2.5.7	Katalase-Aktivität .....	36
2.5.8	Superoxiddismutase-Aktivität.....	36
2.5.9	Glutathionperoxidase-Aktivität .....	37
<b>2.6</b>	<b>Berechnung der Aktivitäten</b> .....	<b>38</b>
<b>2.7</b>	<b>Nachweis von Malondialdehyd</b> .....	<b>39</b>
<b>2.8</b>	<b>Pigmentanalyse</b> .....	<b>41</b>
<b>2.9</b>	<b>Affinitätschromatographie</b> .....	<b>42</b>
<b>2.10</b>	<b>Fast Protein Liquid Chromatography</b> .....	<b>43</b>
<b>2.11</b>	<b>HPLC-Methode zur Bestimmung von GST-Untereinheiten</b> .....	<b>44</b>
<b>2.12</b>	<b>Blattflächenbestimmung von <i>Typha latifolia</i></b> .....	<b>45</b>
<b>2.13</b>	<b>Blattzahlbestimmung von <i>Typha latifolia</i></b> .....	<b>45</b>
<b>2.14</b>	<b>Bestimmung von Frisch- und Trockengewicht von <i>Typha latifolia</i></b> .....	<b>45</b>
<b>2.15</b>	<b>Schwermetallbestimmung</b> .....	<b>46</b>
2.15.1	Schwermetalle in <i>Typha latifolia</i> .....	46
2.15.2	Schwermetalle in <i>Helianthus annuus</i> und <i>Nicotiana tabacum</i> .....	46
<b>2.16</b>	<b>Thiolbestimmung mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</b> .....	<b>49</b>
<b>2.17</b>	<b>Bestimmung der Photosynthese und der Transpiration von <i>Typha latifolia</i></b> .....	<b>51</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>52</b>
<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse der <i>Typha latifolia</i>-Versuche</b> .....	<b>52</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Behandlung von <i>Typha latifolia</i> mit Cadmium, Arsen und Blei über 72 Stunden</b> .....	<b>52</b>
3.1.1.1	Metallgehalte in <i>Typha latifolia</i> nach der Behandlung.....	52
3.1.1.2	Pigmentanalyse der <i>Typha latifolia</i> - Pflanzenproben nach 72stündiger Cd-Behandlung.....	53
3.1.1.3	MDA-Konzentration in <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Cd-Behandlung .....	55
3.1.1.4	SOD-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Cd-Behandlung.....	56
3.1.1.5	CAT-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Cd-Behandlung .....	57
3.1.1.6	POX-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Cd-Behandlung .....	59
3.1.1.7	APOX-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Cd-Behandlung .....	60
3.1.1.8	MDHAR-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Cd-Behandlung .....	61

---

3.1.1.9 DHAR-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Cd-Behandlung .....	62
3.1.1.10 GPOX-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Cd-Behandlung .....	64
3.1.1.11 GR-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Cd-Behandlung .....	65
3.1.1.12 Glutathionhaushalt in <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Cd-Behandlung .....	66
3.1.1.13 Bestimmung der Enzymaktivitäten der GSTs nach 72stündiger Cd-Behandlung .....	69
3.1.1.13.1 CDNB-GST-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> .....	70
3.1.1.13.2 DCNB-GST-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> .....	73
3.1.1.13.3 NBC-GST-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> .....	73
3.1.1.13.4 NBoC-GST-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> .....	74
3.1.1.13.5 Fluorodifen-GST-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> .....	74
3.1.1.14 Vergleich aller Enzymaktivitäten nach 72stündiger Cd-, As- und Pb-Behandlung .....	75
<b>3.1.2 Behandlung der <i>Typha latifolia</i>-Pflanzen mit Cadmium über 72 Tage</b> .....	<b>79</b>
3.1.2.1 Bestimmung der Metallgehalte in <i>Typha latifolia</i> , behandelt mit Cd über 72 Tage .....	79
3.1.2.2 Pigmentanalyse in <i>Typha latifolia</i> , behandelt mit Cd über 72 Tage .....	81
3.1.2.3 Photosynthese, Transpiration und stomatäre Leitfähigkeit nach 72tägiger Behandlung .....	82
3.1.2.3.1 Netto Photosynthese .....	82
3.1.2.3.2 Transpiration und stomatäre Leitfähigkeit .....	83
3.1.2.4 Änderungen des FG und TG in <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung .....	86
3.1.2.5 Anzahl der Blätter bei <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung mit Cd .....	88
3.1.2.6 Untersuchung der Veränderung der Blattfläche in <i>T. latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung .....	90
3.1.2.7 MDA-Konzentration in <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung .....	92
3.1.2.8 SOD-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung .....	93
3.1.2.9 CAT-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung .....	94
3.1.2.10 POX-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung .....	95
3.1.2.11 APOX-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung .....	96
3.1.2.12 MDHAR-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung .....	97
3.1.2.13 DHAR-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung .....	98
3.1.2.14 GPOX-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung .....	98
3.1.2.15 GR-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung .....	99
3.1.2.16 Untersuchung der Glutathiongehalte in <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung .....	100
3.1.2.17 Bestimmung der Aktivitäten der Glutathion S-Transferase .....	103
3.1.2.18 FPLC (Mono Q) Reinigung der <i>Typha latifolia</i> GSTs .....	106
3.1.2.19 HPLC-Bestimmung der GST-Fraktionen von <i>T. latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung .....	107
3.1.2.20 Vergleich der Aktivitäten aller antioxidativen Enzyme und der GSTs .....	111
<b>3.2 Ergebnisse der Enzymmessungen in Sonnenblumen</b> .....	<b>113</b>
3.2.1 Pigmentanalyse .....	113
3.2.2 MDA-Konzentration der Sonnenblumenmutanten .....	117
3.2.3 SOD-Aktivität der Sonnenblumenmutanten .....	118
3.2.4 CAT-Aktivität der Sonnenblumenmutanten .....	119

---

3.2.5 POX-Aktivität der Sonnenblumenmutanten .....	120
3.2.6 APOX-Aktivität der Sonnenblumenmutanten .....	121
3.2.7 MDHAR-Aktivität der Sonnenblumenmutanten .....	122
3.2.8 DHAR-Aktivität der Sonnenblumenmutanten .....	123
3.2.9 GPOX-Aktivität der Sonnenblumenmutanten .....	124
3.2.10 GR-Aktivität der Sonnenblumenmutanten .....	125
3.2.11 Glutathionhaushalt der Sonnenblumenmutanten .....	127
3.2.12 Bestimmung der Enzymaktivitäten der GSTs .....	129
3.2.12.1 CDNB-GST-Aktivität der Sonnenblumenmutanten .....	129
3.2.12.2 NBoC-GST-Aktivität der Sonnenblumenmutanten .....	132
3.2.12.3 NBC-GST-Aktivität der Sonnenblumenmutanten.....	133
3.2.12.4 DCNB-GST-Aktivität der Sonnenblumenmutanten .....	133
3.2.12.5 Fluorodifen-GST-Aktivität der Sonnenblumenmutanten.....	134
3.2.12.6 Zusammenfassende Auswertung der Sonnenblumen-Versuche .....	134
<b>3.3 Ergebnisse der Enzymmessungen in Tabak</b> .....	140
3.3.1 Pigmentanalyse der Tabakklone.....	140
3.3.2 MDA-Konzentration der Tabakklone .....	142
3.3.3 SOD-Aktivität der Tabakklone.....	142
3.3.4 CAT-Aktivität der Tabakklone .....	143
3.3.5 POX-Aktivität der Tabakklone .....	144
3.3.6 APOX-Aktivität der Tabakklone .....	145
3.3.7 MDHAR-Aktivität der Tabakklone .....	147
3.3.8 DHAR-Aktivität der Tabakklone.....	148
3.3.9 GPOX-Aktivität der Tabakklone .....	149
3.3.10 GR-Aktivität der Tabakklone .....	150
3.3.11 Glutathiongehalte der Tabakklone.....	150
3.3.12 Bestimmung der Enzymaktivitäten der GSTs .....	152
3.3.12.1 CDNB-GST-Aktivität der Tabakklone .....	152
3.3.12.2 NBoC-GST-Aktivität der Tabakklone.....	153
3.3.12.3 NBC-GST-Aktivität der Tabakklone .....	154
3.3.12.4 DCNB-GST-Aktivität der Tabakklone .....	154
3.3.12.5 Fluorodifen-GST-Aktivität der Tabakklone .....	155
<b>4. Diskussion</b> .....	157
4.1 <i>Typha latifolia</i> .....	157
4.1.1 <i>Typha latifolia</i> 72stündiger Behandlung mit Cd, AS und Pb .....	159
4.1.2 <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung.....	167
4.2 <i>Helianthus annuus</i> .....	175
4.3 <i>Nicotiana tabacum</i> .....	181
4.4 Fazit .....	186

<b>5. Zusammenfassung</b> .....	189
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	191



**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 Verschiedene Wege der Phytoremediation in der Pflanze .....	7
Abbildung 2 Synthese und Degradierung von Ascorbinsäure.....	15
Abbildung 3 Halliwell-Asada Zyklus .....	16
Abbildung 4 Struktur eines $[Cd_3(PC_4)]$ Komplexes.....	18
Abbildung 5 Aktivierung der Phytochelatin-Synthese.....	19
Abbildung 6 <i>Typha latifolia</i> .....	21
Abbildung 7 <i>Helianthus annuus</i> .....	22
Abbildung 8 <i>Nicotiana tabacum</i> .....	23
Abbildung 9 <i>Typha latifolia</i> während der Behandlung mit Schwermetallen .....	24
Abbildung 10 Mutagenisierte <i>Helianthus annuus</i> auf dem Versuchsfeld Rafz .....	26
Abbildung 11 <i>Nicotiana tabacum</i> auf dem Versuchsfeld in der Ostschweiz .....	28
Abbildung 12 Formel zu Berechnung der benötigten Ammoniumsulfatmenge.....	29
Abbildung 13 Konjugation von CDNB mit GSH.....	31
Abbildung 14 Konjugation von DCNB mit GSH.....	31
Abbildung 15 Konjugation von NBC mit GSH .....	31
Abbildung 16 Konjugation von NBoC mit GSH .....	31
Abbildung 17 Reaktion des Herbizids Fluorodifen mit GSH.....	31
Abbildung 18 Reaktion von $H_2O_2$ mit dem Substrat Guajacol .....	33
Abbildung 19 Bildung von oxidiertem Glutathion und Ascorbat mittels GSH und DHAR.....	35
Abbildung 20 Formel zu Berechnung des Spezifischen Faktors.....	38
Abbildung 21 Formel zu Berechnung der Volumenaktivität von Enzymextrakten.....	38
Abbildung 22 Formel zu Berechnung der spezifischen Enzymaktivität .....	39
Abbildung 23 Formel zur Beschreibung der Frischgewichtaktivität.....	39
Abbildung 24 Entstehung von Malondialdehyd aus mehrfach ungesättigten Lipiden.....	40
Abbildung 25 Berechnung der Malondialdehydkonzentration .....	41
Abbildung 26 Formeln zur Berechnung von Pigment- und Carotinoidgehalten .....	41
Abbildung 27 Verlauf der Puffer „B“-Konzentrationen während des Mono Q FPLC Laufs .....	44
Abbildung 28 Kalibriergeraden zur Quantifizierung von GSH und GSSG.....	50
Abbildung 29 MDA-Konzentration von <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Behandlung .....	55
Abbildung 30 Hemmung der Adenochrombildung in <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Behandlung ....	57
Abbildung 31 CAT-Aktivität von <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Behandlung .....	58
Abbildung 32 POX-Aktivität von <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Behandlung .....	59
Abbildung 33 APOX-Aktivität von <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Behandlung .....	61
Abbildung 34 MDHAR-Aktivität von <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Behandlung .....	62
Abbildung 35 DHAR-Aktivität von <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Behandlung .....	63
Abbildung 36 GPOX-Aktivität von <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Behandlung.....	65
Abbildung 37 GR-Aktivität von <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Behandlung.....	66

---

Abbildung 38 GSH-Konzentration von <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Behandlung.....	67
Abbildung 39 GSSG-Konzentration von <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Behandlung.....	69
Abbildung 40 Korrelation zwischen Cd-Konzentration und Cd-Aufnahme.....	79
Abbildung 41 Korrelation zwischen Cd im Medium und Cd in den Rhizomen.....	80
Abbildung 42 Netto Photosynthese, Transpiration und stomatäre Leitfähigkeit von <i>Typha latifolia</i> ....	84
Abbildung 43 Verteilung des TGs von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung .....	87
Abbildung 44 Veränderung der Blattzahl von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung.....	88
Abbildung 45 Veränderung der Blattfläche von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung.....	91
Abbildung 46 MDA-Konzentration von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung .....	93
Abbildung 47 Hemmung der Adenochrombildung von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung .....	94
Abbildung 48 Spezifische CAT-Aktivität von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung.....	95
Abbildung 49 Spezifische POX-Aktivität von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung.....	95
Abbildung 50 Spezifische APOX-Aktivität von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung.....	96
Abbildung 51 Spezifische MDHAR-Aktivität von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung.....	97
Abbildung 52 Spezifische DHAR-Aktivität von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung .....	98
Abbildung 53 Spezifische GPOX-Aktivität von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung .....	99
Abbildung 54 Spezifische GR-Aktivität von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung .....	100
Abbildung 55 GSH-Konzentration von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung .....	102
Abbildung 56 GSSG-Konzentration von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung .....	102
Abbildung 57 Mono Q-Lauf von <i>Typha latifolia</i> -Rhizom-GSTs nach 72tägiger Cd-Behandlung .....	107
Abbildung 58 HPLC-Untersuchung der GST-Untereinheiten aus einem FPLC-Lauf .....	108
Abbildung 59 MDA-Konzentration der Sonnenblumenmutanten der IBL 04 und der Hybride Salut...	117
Abbildung 60 Hemmung der Adenochrombildung der Mutanten der IBL 04 und der Hybride Salut ..	118
Abbildung 61 Spezifische CAT-Aktivität der Mutanten der IBL 04 und der Hybride Salut.....	119
Abbildung 62 Spezifische POX-Aktivität der Mutanten der IBL 04 und der Hybride Salut.....	120
Abbildung 63 Spezifische APOX-Aktivität der Mutanten der IBL 04 und der Hybride Salut.....	121
Abbildung 64 Spezifische MDHAR-Aktivität der Mutanten der IBL 04 und der Hybride Salut.....	122
Abbildung 65 Spezifische DHAR-Aktivität der Mutanten der IBL 04 und der Hybride Salut .....	124
Abbildung 66 Spezifische GPOX-Aktivität der Mutanten der IBL 04 und der Hybride Salut .....	125
Abbildung 67 Spezifische GR-Aktivität der Mutanten der IBL 04 und der Hybride Salut .....	126
Abbildung 68 GSH-Konzentration der Mutanten der IBL 04 und der Hybride Salut .....	127
Abbildung 69 GSSG-Konzentration der Mutanten der IBL 04 und der Hybride Salut .....	128
Abbildung 70 GST-Aktivität für alle Modellsubstrate der Mutanten der IBL 04 und der Hybride Salut	132
Abbildung 71 MDA-Konzentration der Tabakkclone .....	142
Abbildung 72 Hemmung der Adenochrombildung der Tabakkclone.....	143
Abbildung 73 Spezifische CAT-Aktivität der Tabakkclone .....	144
Abbildung 74 Spezifische POX-Aktivität der Tabakkclone .....	145
Abbildung 75 Spezifische APOX-Aktivität der Tabakkclone .....	146
Abbildung 76 Spezifische MDHAR-Aktivität der Tabakkclone.....	147

---

Abbildung 77 Spezifische DHAR-Aktivität der Tabakklone .....	148
Abbildung 78 Spezifische GPOX-Aktivität der Tabakklone .....	149
Abbildung 79 Spezifische GR-Aktivität der Tabakklone .....	150
Abbildung 80 GSH-Konzentration der Tabakklone .....	151
Abbildung 81 GSSG-Konzentration der Tabakklone .....	152
Abbildung 82 Schematische Darstellung der antioxidativen Enzyme nach 72stündiger Behandlung.	163
Abbildung 83 Schematische Darstellung der antioxidativen Enzyme nach 72tägiger Cd-Behandlung	172

---

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Chemische Eigenschaften von Cadmium.....	3
Tabelle 2 Chemische Eigenschaften von Arsen .....	4
Tabelle 3 Chemische Eigenschaften von Blei .....	5
Tabelle 4 Normale Verteilung von Spurenelementen in der Pflanze .....	11
Tabelle 5 Nomenklatur der verschiedenen Sauerstoffspezies .....	12
Tabelle 6 Gewächshausbedingungen während des Behandlungszeitraums.....	23
Tabelle 7 Zusammensetzung des verwendeten Murashige & Skoog Mediums.....	24
Tabelle 8 Behandlungsreihe für den 72 h <i>in vivo</i> Versuch von <i>Typha latifolia</i> .....	25
Tabelle 9 Behandlungsreihe für den 72d <i>in vivo</i> Versuch von <i>Typha latifolia</i> .....	26
Tabelle 10 Chemische Zusammensetzung den Parabraunerde .....	27
Tabelle 11 Gesamt Metallkonzentrationen auf dem Versuchsfeld Rafz .....	27
Tabelle 12 Erläuterung der Funktion der im Aufarbeitungspuffer enthaltenen Pufferkomponenten ....	30
Tabelle 13 Parameter für die spektrophotometrische Bestimmung von GST-Aktivität .....	32
Tabelle 14 Ansatz für den Peroxidase-Test .....	33
Tabelle 15 Ansatz für den Ascorbat-Peroxidase-Test.....	33
Tabelle 16 Ansatz für die Monodehydroascorbatreduktase-Test .....	34
Tabelle 17 Ansatz für die Dehydroascorbatreduktase-Test.....	35
Tabelle 18 Ansatz für den Glutathionreduktase-Test .....	36
Tabelle 19 Ansatz für den Katalase-Test.....	36
Tabelle 20 Ansatz für den Superoxiddismutase-Test .....	37
Tabelle 21 Ansatz für den Glutathionperoxidase-Test.....	38
Tabelle 22 Pufferzusammensetzung und Puffervorbereitung für salzlose Affinitätschromatographie ..	42
Tabelle 23 Enzymextrakt Elutionsschema.....	42
Tabelle 24 Puffersysteme für die Durchführung eines Mono Q-FPLC-Laufs.....	43
Tabelle 25 Gradientenverlauf für die GST-HPLC-Methode.....	45
Tabelle 26 Emissionslinien der einzelnen Elemente .....	46
Tabelle 27 Schwermetall- und Extraktionsgehalte in Mutanten der IBL 04 und der Hybride Salut .....	47
Tabelle 28 Schwermetall- und Extraktionsgehalte im Tabak.....	48
Tabelle 29 Aufarbeitungslösung für die HPLC .....	49
Tabelle 30 Gradienten für die HPLC-Läufe .....	50
Tabelle 31 Schwermetallgehalte in <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Behandlung.....	52
Tabelle 32 Pigmentanalyse der <i>Typha latifolia</i> -Pflanzenproben nach 72stündiger Behandlung .....	54
Tabelle 33 Spezifische GST-Aktivität in <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Behandlung. ....	71
Tabelle 34 Vergleich aller Enzymaktivitäten in <i>Typha latifolia</i> nach 72stündiger Behandlung.....	77
Tabelle 35 Aufgenommene Cadmiummenge von <i>Typha latifolia</i> nach Cd-Inkubation über 72 Tage ...	81
Tabelle 36 Pigmentanalyse von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung.....	82
Tabelle 37 Photosynthese, Transpiration und stomatäre Leitfähigkeit nach 72tägiger Cd-Behandlung	85

---

Tabelle 38 FG, TG, Gesamt-Pflanzengewicht von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung .....	86
Tabelle 39 Bestimmung der Blattzahl von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung .....	89
Tabelle 40 Bestimmung der Blattfläche von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung.....	92
Tabelle 41 Glutathiongehalte in <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung.....	101
Tabelle 42 Spezifische GST-Aktivität den <i>Typha latifolia</i> -Proben nach 72tägiger Cd-Behandlung ....	105
Tabelle 43 Darstellung der GST-Fraktionen nach einer HPLC-Bestimmung, Rhizome .....	109
Tabelle 44 Darstellung der GST-Fraktionen nach einer HPLC-Bestimmung, Blätter.....	110
Tabelle 45 Vergleich aller Enzymaktivitäten in <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Cd-Behandlung .....	111
Tabelle 46 Pigmentanalyse der M3-Sonnenblumenmutanten der IBL 04 und der Hybride Salut.....	115
Tabelle 47 Spezifische GST-Aktivität der Mutanten der IBL 04 und der Hybride Salut.....	130
Tabelle 48 Vergleich aller Antioxidantien-Enzymaktivitäten der Mutanten der IBL 04 .....	137
Tabelle 49 Vergleich aller Antioxidantien-Enzymaktivitäten der Mutanten der Hybride Salut .....	139
Tabelle 50 Pigmentanalyse der Tabakklone.....	141
Tabelle 51 Spezifische Enzymaktivität für die GST-Modellsubstrate in den Tabakklonen .....	156

**Abkürzungsverzeichnis**

Å	Ångström
AAS	Atomabsorption-Spektrometer
AN	Ammoniumnitrat
APOX	Ascorbatperoxidase
Ar	Argon
As	Arsen
AS	Ammoniumsulfat
BAG	Badischer Geudertheimer, Tabaksorte
BPDS	Bathophenonthroline Disulfidsäure
°C	Grad Celsius
CaCO <sub>3</sub>	Kalziumcarbonat
CAT	Katalase
Cd	Cadmium
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
cm	Zentimeter
cmol	Kubikmol
Cu	Kupfer
∅	Durchmesser
d	Tage
DCNB	1,2-Dichlor-4-nitrobenzol
DHAR	Dehydroascorbatreduktase
DNFB	Dinitro-1-fluorbenzol
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FG	Frischgewicht
FoP	Forchheim Pereg, Tabaksorte
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
GPOX	Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathion (oxidierte Form)
GST	Glutathion S-Transferase
HCl	Salzsäure
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

---

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBL 04	inbred line 04, nicht mutagenisierte Sonnenblumensorte
ICP	Induktiv gekoppelte Plasmaemission
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumphosphat
M	Molar
M2	2 Generation Mutantenlinie von Sonnenblumen
M3	3 Generation Mutantenlinie von Sonnenblumen
MDA	Malondialdehyd
MDHAR	Monodehydroascorbatreduktase
mM	Millimolar
MW	Molare Masse (Molekular Weight)
μM	Mikromolar
N	(0,1 N) Molar
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>	Dinatriumhydrogencarbonat
OD	Optische Dichte
Pb	Blei
PCA	Perchlorsäure
PS	Photosynthese
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NBC	p-Nitrobenzylchlorid
pNBoC	p-Nitrobenzoylchlorid
Pb	Blei
POX	Peroxidase
PVP	Polyphenylpyrrolidon
ppb	part per billion
ppm	part per million
SOD	Superoxiddismutase
TBA	Thiobarbitursäure
TCA	Trichloressigsäure
TG	Trockengewicht
TSP	dreifaches Superphosphat
U	Units
UV	Ultraviolet

## 1. Einleitung

### Schwermetalle: Chemische Eigenschaften und bestehende Gefahren

#### 1.1 Welche Metalle sind „schwer“?

Von insgesamt 110 Elementen aus dem Periodensystem besitzen 69 Elemente metallische Eigenschaften. Sieben der Elemente, die die Erdkruste aufbauen, sind Metalle.

Mit dem Terminus „Metall“ werden Elemente bezeichnet, die gute elektrische Leitfähigkeit besitzen (diese Eigenschaft nimmt mit der Zunahme der Temperatur ab) und deren elektrischer Widerstand direkt proportional zur absoluten Temperatur ist. Schwermetalle sind alle Metalle mit einer Dichte größer oder gleich  $4,5 \text{ g/cm}^3$ . Alle anderen Metalle sind Leichtmetalle ( $<4,5 \text{ g/cm}^3$ ).

#### Toxizität der Metalle

Die relative Toxizität der Schwermetalle ist von der Bodeneigenschaft und dem Pflanzentyp anhängig. Die Schwermetalle interagieren mit unterschiedlichen Zellkomponenten und verursachen dabei Störungen in den normalen metabolischen Vorgängen. Das kann Zellverletzungen und in Extremfällen das Absterben des Organismus bewirken (Shaw et al., 2004).

Die Toxizität beruht hauptsächlich darauf, dass entweder biologische Funktionen von Enzymgruppen blockiert werden oder essentielle Metallionen in Biomolekülen ersetzt werden (Shaw et al., 2004), so dass sich die katalytischen Eigenschaften verändern.

Nach Nieboer & Richardson (1980) haben die Metalle verschiedene Bindungsmodelle an den Liganden, weswegen sie in drei Gruppen unterteilt wurden:

- Klasse A (bevorzugen Liganden, in denen Sauerstoff vorhanden ist)
- Klasse B (binden an Liganden, die Schwefel oder Stickstoff enthalten)
- Klasse C, in der alle Metalle eingeschlossen werden, deren Eigenschaften dazwischen liegen.

Nieboer & Richardson (1980) vermuten, dass die Bevorzugung bestimmter Liganden zu identischen Effekten in verschiedenen Organismen führt.

Mehrere Enzyme benötigen Metalle in ihren aktiven Zentren und die Verschiebung oder das Ersetzen dieses Metalls durch andere mit ähnlicher Größe und Ladung kann zu einer Inhibition der Enzymaktivität führen. Zink, das in zahlreichen Metallenzymen enthalten ist, kann so durch Cadmium, seinen nächsten Nachbarn im Periodensystem, ersetzt werden.



Trotz der chemischen Ähnlichkeit zwischen Cadmium und Zink können die im Cadmium enthaltenen Enzyme nicht richtig funktionieren (Shaw et al., 2004).

Die toxischsten Schwermetalle sind die aus der Klasse B (binden an Liganden, die Schwefel und Stickstoff enthalten), die ein weites Spektrum an toxischen Mechanismen besitzen. Kein einziges Metall dieser Gruppe ist in irgendeinem Enzym vorhanden. Diese Metalle gehen die effektivsten Bindungen an SH-Gruppen, wie Cystein und stickstoffenthaltende Gruppen wie Lysin und die aktiven Zentren von Enzymen (Shaw et al., 2004), ein.

## **1.2 Quellen der Umweltverschmutzung**

Im 20. Jahrhundert hat mit der ständig zunehmenden Entwicklung der Industrie die Verbreitung an Schadstoffen anthropogener Herkunft im Boden, im Grund- und Oberflächenwasser oder in der Atmosphäre stark zugenommen (Nriagu, 1979).

Schadstoffe sind Substanzen, die gefährdende Einwirkung auf die Umwelt, den Menschen, die Tiere, die Pflanzen, den Boden oder das Wasser haben können (Hoffmann, 1998). Auch wenn in den letzten zehn Jahren die Menge an diesen Belastungen im größten Teil Europas stark zurückgegangen ist, gibt es immer noch zahlreiche Länder, in denen sie eine Problematik darstellen. Es gibt Punktquellen wie Tankstellen, ölverarbeitende und metallverarbeitende Betriebe, Militärstandorte, Berg- und Tagebau oder Müllkippen, aber auch diffuse Quellen wie Verbrennung fossiler Brennstoffe, Pestizide, Phosphatdünger und kommunale Abwässer (Kabata-Pendias & Pendias, 1989). All diese Quellen sind nicht immer nur Eintragspfade für organische Schadstoffe, sondern auch für Schwermetalle, die bereits in niedrigen Konzentrationen sehr toxisch sein können (Memon et al., 2001).

Schwermetallkontaminationen können auch geogener Herkunft sein (Shaw et al., 2004). Dies tritt in Gebieten auf, wo das Erz an der Oberfläche zu finden ist und vom Regenwasser ausgewaschen wird, was am meisten bei Nickel und Arsen vorkommt. Diese Gebiete sind aber längst nicht so weit verbreitet wie Standorte mit einer Belastung anthropogener Herkunft (Pilon-Smits, 2005).

Die Kontamination von Boden und Wasser mit anthropogenen Belastungen ist für die Umwelt das Hauptproblem, das eine effektive und bezahlbare Lösung braucht (Memon et al., 2001). Die meisten verwendeten Methoden wie Bodensanierung, Einlagerung oder Isolierung der belasteten Oberflächen sind extrem teuer und von vielen Gemeinschaften nicht zu leisten.

Interessanterweise verfügen die belasteten Gebiete oft über Pflanzenarten, die ungestört auf dem an Metallen angereicherten Boden existieren und überleben können (Memon et al., 2001). Dabei sind sowohl solche Pflanzen aufgefallen, die extrem hohe Schwermetallkonzentrationen unbeschadet speichern können, als auch solche, die die Aufnahme der

Metalle vermeiden. Die erstgenannten Arten verfügen offenbar über Entgiftungsmechanismen, die die negativen Auswirkungen der Schwermetalle abpuffern oder reparieren können. Solche Pflanzen könnten genutzt werden, um die Schwermetalle gezielt aus dem Boden oder dem Wasser zu entfernen. Eine Technologie, die sich mit dieser Problematik beschäftigt, ist die Phytoremediation. Sie hat zum Ziel, mit Hilfe unterschiedlicher Pflanzenarten kostengünstig, nachhaltig und umweltverträglich Schadstoffe aus der Umwelt zu entfernen.

### 1.3 Eigenschaften der verwendete Schwermetalle

#### 1.3.1 Cadmium

Cadmium (*kadmia*, gr.: Zinkerz) Cadmiumhaltige Erze sind selten. Greenockit (CdS) kommt meistens gemeinsam mit Sphalerit (ZnS) vor. Cadmium wird so als Nebenprodukt bei der Zink-Verhüttung gewonnen. Kleine Mengen fallen auch im Eisen- und Stahl-Recycling an. Die chemischen Eigenschaften von Cadmium sind in der Tabelle 1 beschrieben.

**Tabelle 1** Chemische Eigenschaften von Cadmium

Name, Symbol, Ordnungszahl	Cadmium, Cd, 48
Gruppe, Periode, Block	12, 5, d
Aussehen	silbrig-grau, metallisch
Massenanteil an der Erdhülle	$3 \times 10^{-5}\%$
Atommasse	112,411
Atomradius	155 pm
Elektronenkonfiguration	Kr $4d^{10} 5s^2$
Kristallstruktur	Hexagonal
Dichte	$8650 \text{ kg/m}^3$
Schmelzpunkt	594,22 K (321,07°C)
Siedepunkt	1040 K (767°C)
Oxidationszustände	2
Oxide (Basizität)	CdO (leicht basisch)
Isotopenzahl	17
Gefahr	giftig

Verwendung:

Meistens wird das Metall für die Herstellung von Ni-Cd-Akkus, Farbpigmenten, Legierungen und bei der Erzeugung von Halbleitern verwendet. Außerdem findet es als Leuchtstoff in Fernschröhren, in Solarzellen zur Stromerzeugung, in Cadmiumlampen und in der Nukleartechnik Verwendung (Falbe & Regitz, 1996).

### 1.3.2 Arsen

Arsen (*arsenikon*, gr.: männlich, stark). Seine größten Vorkommnisse sind in der Form von Auripigment ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ) und Realgar ( $\text{As}_4\text{S}_4$ ). Arsen kommt in Spuren häufig im Boden in geringen Konzentrationen von unter 10 ppm vor und kann auch im Rahmen des Abbaus von Kupfer, Blei oder Kobalt oder beim Phosphatabbau gewonnen werden.

Arsen ist schwer wasserlöslich und wird deswegen nur in geringen Spuren in Ozeanen und Meeren gefunden (1,6 ppb). Der Anteil an freigesetztem Arsen in der Luft stammt von der Verbrennung fossiler Brennstoffe oder aus dem Straßenverkehr. Seine chemischen Eigenschaften sind in der Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2** Chemische Eigenschaften von Arsen

Name, Symbol, Ordnungszahl	Arsen, As, 33
Gruppe, Periode, Block	15, 4, p
Aussehen	metallisch grau, gelb oder schwarz
Massenanteil an der Erdhülle	$6 \times 10^{-4}\%$
Atommasse	74,92159
Atomradius	124,5 pm
Elektronenkonfiguration	Ar $3d^{10} 4s^2 4p^3$
Kristallstruktur	trigonal oder orthorhombisch
Dichte	$4700\text{-}5720 \text{ kg/m}^3$
Schmelzpunkt	1090 K (817°C)
Siedepunkt	889 K (616°C)
Oxidationszustände	-3, 3, 5
Oxide (Basizität)	$\text{As}_2\text{O}_3$ (amphoter)
Isotopenzahl	6
Gefahr	sehr giftig

#### Verwendung:

Industriell wird das Metall in den Bleilegierungen eingesetzt, um deren Festigkeit zu erhöhen. Daneben wird es auch als Schädlingsbekämpfungsmittel im Weinbau, als Holzschutzmittel oder Entfärbungsmittel in der Glasherstellung verwendet (Falbe & Regitz, 1996).

### 1.3.3 Blei

Blei (*plumbum*, lat.: bleischwer, schimmernd, leuchtend) kommt vorwiegend als Sulfid ( $\text{PbS}$ , Galenit) vor. Die bedeutendste Quelle von Blei ist heute das Recycling von Bleiprodukten. Die chemischen Eigenschaften von Blei sind in der Tabelle 3 beschrieben.

**Tabelle 3** Chemische Eigenschaften von Blei

Name, Symbol, Ordnungszahl	Blei, Pb, 82
Gruppe, Periode, Block	14, 6, p
Aussehen	bläulich weiß
Massenanteil an der Erdhülle	$2 \times 10^{-3}\%$
Atommasse	207,7
Atomradius	180pm
Elektronenkonfiguration	Xe $4f^{14} 5d^{10} 6s^2 6p^6$
Kristallstruktur	kubisch
Dichte	$11340 \text{ kg/m}^3$
Schmelzpunkt	600,61 K (327,46°C)
Siedepunkt	2022 K (1749°C)
Oxidationszustände	2, 4
Oxide (Basizität)	Amphoter
Isotopenzahl	9
Gefahr	giftig

**Verwendung:**

Blei wird bei der Herstellung industrieller Produkte eingesetzt, unter anderem in Bleiakkumulatoren, zur Stabilisierung von Schiffen, zum Schutz in Röntgengeräten oder in Kathodenstrahlröhren als Korrosionsschutz (Falbe & Regitz, 1996).

**1.4 Phytoremediation**

Phytoremediation ist eine neue Biotechnologie, die Pflanzen und alle assoziierten Organismen zur Reinigung von belasteten Böden, Sedimenten und Gewässern nutzt (Raskin et al., 1994; Salt et al., 1995, 1998). Dabei werden hauptsächlich natürliche Prozesse zwischen Pflanzen und ihrer Rhizosphäre genutzt (Pilon-Smiths, 2005). Auf diese Weise werden organische und anorganische Kontaminanten entfernt. Bei den organischen Kontaminanten handelt es sich vor allem um Treibstoff, explosive Stoffe, Materialien der chemische Industrie, Herbizide und Dünger (Pilon-Smiths, 2005). Im Gegensatz dazu sind die belastenden anorganischen Substanzen Elemente, die in der Folge des Bergbaus, durch Transport oder der Industrie in erhöhten Mengen in der Umwelt zu finden sind: Chrom, Kupfer, Eisen, Cadmium, Mangan, Blei und Arsen.

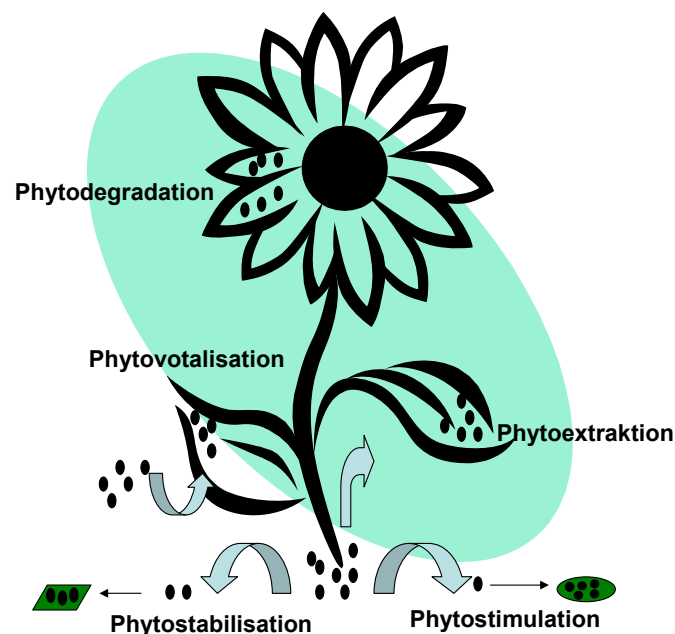
Die Phytoremediation ist in den letzten zehn Jahren sehr populär geworden. Pro Jahr werden 25 bis 50 Milliarden US \$ (Glass, 1999; Tsao, 2003) weltweit für Phytoremediationsprojekte ausgegeben. Diese Technik hat viele Vorteile, aber auch Grenzen. Um effektiv wirken zu

können, ist die Phytoremediation stark von Pflanzenwachstum und Klimabedingungen abhängig, da die Pflanzen schnell genug wachsen müssen, um die für die Phytoremediation erforderliche Leistung zu erbringen. Sie müssen vor allem über einen hohen Rhizom-Blatt-Transport verfügen, tolerant gegenüber hohen Metallkonzentrationen im Blatt sein und eine hohe Biomasse produzieren (Bañuelos et al., 1997; Bañuelos et al., 1998; Escarre et al., 2000; Gonelli et al., 2000; Greger & Landberg, 1999).

In der Phytoremediation werden folgende Techniken verwendet (Pilon-Smiths, 2005; Memon, 2001), (Abbildung 1):

1. Rhizofiltration nutzt Pflanzen und ihre Rhizomorganismen als Filter in Kläranlagen oder in Einrichtungen für Hydrokulturen (Dushenkov et al., 1995). Diese Technik beruht auf Aufnahme der Metalle in den Wurzeln oder der Absorption durch die Wurzeln und anderen Unterwasserorganen der metalltoleranten Wasserpflanzen (Dushenkov et al., 1995).
2. Phytostabilisation bezeichnet die Nutzung der Pflanzen, um die Verschmutzungen im Boden zu stabilisieren (Barceló & Poschenrieder, 2003), indem die Metalle im Boden oder in den Sedimenten durch die Wurzeln aufgenommen und dort adsorbiert oder in der Rhizosphäre abgelagert werden. Bei abnehmender Mobilität der Metalle schützen diese Prozesse vor Grundwasserverschmutzungen und dem Eindringen in die Nahrungskette (Barceló & Poschenrieder, 2003).
3. Phytoextraktion bezeichnet die Aufnahme der Schadstoffe in den Spross, der danach geerntet werden kann (Blaylock & Huang, 2002). Die Pflanzen können hinterher verascht und die Metalle akkumuliert werden. Der Fachausdruck für diesen Prozess ist Phytomining (Chaney et al., 2000). Die hierfür benutzten Pflanzen sind sehr gute Hyperakkumulatoren und produzieren viel Biomasse. Viele Pflanzenarten erfüllen leider nur eine dieser Bedingungen. Dafür werden aber auch Arten, die nur geringe Mengen an Metallen akkumulieren können, aber hohe Biomasse produzieren, als nützlich für die Phytoextraktion betrachtet, weil mit der Ernte der Pflanzen die Metalle aus dem Boden entfernt werden (Brooks et al., 1998).
4. Phytostimulation (Rhizodegradation) – hier spielen die Mikroben die Hauptrolle (McCutcheon et al., 2003). Nur organische Substanzen können mit Hilfe dieser Methode entgiftet werden. Gerade anorganische Elemente sind nicht abbaubar und können nur stabilisiert oder aufgenommen und gelagert werden (Pilon-Smith, 2005).
5. Phytodegradierung ist der Prozess der Entgiftung von organischen Verschmutzungen durch die Pflanzen über ihre eigene Enzymaktivität (McCutcheon & Schnoor, 2003)

6. Phytovolatilisation tritt auf, wenn die Kontaminanten die Pflanze nach der Aufnahme und Metabolisierung gasförmig verlassen (Bañuelos et al., 1998).
7. Hydraulische Kontrolle benutzt Pflanzen, die große Mengen an Wasser absorbieren, um die Ausbreitung des kontaminierten Wassers in benachbarte unkontaminierte Territorien zu verhindern (Barceló & Poschenrieder, 2003).
8. Phytorestoration ist die Wiederbepflanzung verödeter Gebiete mit schnell wachsenden, resistenten Arten, die effizient den Boden bedecken. Das schützt die Migration der kontaminierten Bodenteilchen und der Bodenerosion durch Wind und Regenwasser. Diese Technik zielt aktiv auf die Pflanzenkolonisierung des belasteten Substrats durch tolerante Spezies (Vangronsveld et al., 2000).



**Abbildung 1** Verschiedene Wege der Phytoremediation in der Pflanze (nach Pilon-Smiths, 2005). Die Punktierung soll die Kontaminationen darstellen.

Bemerkenswert sind die Vorteile der Phytoremediation (Schwitzguébel, 2001; Pilon-Smiths, 2005; Hoffmann, 1998):

1. es gibt einen minimalen ökologischen Transport, wenn die Kontaminanten *in situ* festgehalten und nicht in unbelastete Zonen verlagert werden (Phytostabilisation)
2. nach der Phytoremediation kann der Oberboden wieder verwendet werden
3. die Methode ist sehr günstig für große Wasserflächen oder Böden, die mit niedrigen Konzentrationen durch organische Schadstoffe belastet sind
4. organische Schadstoffe können zu  $H_2O$  und  $CO_2$  abgebaut oder durch mikrobiologische Prozesse mineralisiert werden

5. und nicht zuletzt ist die Phytoremediation insgesamt sehr kostengünstig.

Die Effektivität der Phytoremediation ist aber auch durch folgende Ursachen begrenzt (Schwitzguébel, 2001):

1. die notwendige Zeit für die Phytoextraktion ist grundsätzlich sehr lang (dauert Jahre)
2. die Konzentrationen der Belastungen müssen von den Pflanzen toleriert werden
3. es ist nur möglich, die bioverfügbare Fraktion der Kontamination zu bearbeiten. Das ist der wichtigste Teil in ökologischer, toxischer und gesundheitlicher Hinsicht.
4. Die Pflanzen können in den meisten Fällen nur die oberste Zone der Kontamination erreichen.

## **1.5 Mechanismen für die Metallaufnahme in Pflanzen**

Belastungspfade für Pflanzen mit Schwermetallen sind vor allem Luft, Gewässer, Böden und Sedimente. Pflanzen verfügen über die Möglichkeit Metalle anzureichern, falls die Wachstumskapazität das erlaubt (Greger, 2004). Höhere Pflanzen nehmen die Metalle nicht nur über Spross und Blätter aus der Luft, sondern auch über die Wurzeln aus dem Bodensubstrat auf. Es existiert ein wesentlicher Unterschied, in welchem Substrat die Metalle verfügbar sind, da sie im Boden meistens mehrfach konzentrierter vorhanden sind als im Wasser (Förstner, 1979).

### **1.5.1 Faktoren, die die Metallaufnahme beeinflussen**

Die Metallaufnahme in Blättern und Wurzeln hängt von der Metallkonzentration im Medium ab. Allerdings ist diese Zunahme nicht linear zur Konzentrationszunahme. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Metalle häufig in gebundenem Zustand vorliegen. Die Aufnahme-Effizienz ist bei niedrigen Konzentrationen am höchsten, weil die niedrige Metallkonzentration pro Absorptionsoberfläche auch einen geringen Wettbewerb zwischen den Cadmium-Ionen am Aufnahmeort auslöst (Greger et al., 1991). Je größer die Wurzeloberfläche ist, desto effektiver ist die Aufnahme an Metall-Ionen. Auch Wurzelkonkurrenz zwischen mehreren Pflanzen am Standort wird zu Konkurrenz um die Metalle führen und die Aufnahmeeffizienz wird abnehmen (Marschner, 1995).

Licht und Temperatur können ebenfalls die Aufnahme von Cadmium und Blei beeinflussen (Hu et al., 1996; Chawla et al., 1991; Hooda & Alloway, 1993). Die Zunahme der Biomasseproduktion jedoch fördert die Elementaufnahme. Die Akkumulation in der Pflanze wird entsprechend mit der Verdünnung, die durch das Wachstum verursacht wurde, abnehmen (Ekvall & Greger, 2003).

Marschner (1995) berichtet, dass die Metallaufnahme mit der pH-Zunahme in Lösungen zunimmt, im Gegensatz dazu aber im Boden abnimmt. Er vermutet eine Konkurrenz zwischen den Wasserstoffionen und den Metallionen im Wurzelwachstumsbereich.

In Versuchen mit Wasserpflanzen ist bewiesen worden, dass mit Zunahme des Salzgehaltes die Aufnahme von Cd, Cu und Zn abnimmt, da Metall-Cl<sub>x</sub>-Komplexe im Wasser gebildet werden (Greger et al., 1995). Solche Komplexe sind für die Aufnahme durch die Pflanzen schlechter geeignet. In einem Sedimentsystem, das auch Salz enthält, ist genau das Gegenteil zu beobachten; die Aufnahme von Cd ist dort wesentlich höher. Hier wird bei erhöhtem Salzgehalt eine Austauschreaktion zwischen den Natriumionen und den an Bodenkoloiden gebundenen Cadmiumionen beobachtet, die nach diesen Reaktionen in erhöhten Konzentrationen in der Pflanze zu finden sind (Greger et al., 1995).

Der größte Teil der Metalle tritt in die Pflanzen durch die Wurzeln ein, nachdem ein Metall-Wurzel-Kontakt stattgefunden hat. Bei diffusiver Aufnahme wandern die Metalle entlang ihres Konzentrationsgradienten mit anderen Ionen zur Wurzel und durch das Rindengewebe. Dabei kann der Massenfluss der Ionen entlang des Gradienten des Wasserpotenzials geschehen, der durch die Transpiration auf einem hohen Niveau gehalten wird und auf diese Weise zu einer Anreicherung im Spross führt (Marschner, 1995).

Wenn die Aufnahme durch die Wurzeln hoch und die Element-Konzentration im Boden niedrig ist, ist die Elementaufnahme nur durch die Diffusion limitiert.

### **1.5.2 Metalltransport im Sproß**

Schwermetalle werden apoplastisch in die Wurzel transportiert. Das ist eine Etappe der so genannten passiven Aufnahme der Ionen in der Pflanze, die mit dem Einströmen der einzelnen Ionen in den freien Raum „Apparent Free Space“ (AFS) beginnt (Nultsch, 2001). Dieser Raum macht insgesamt 10-25% der kapillaren Räume der Rhizodermis und Rindenzellwände aus. Die Ionen fließen mit dem apoplastisch aufgenommenen Wasser in den freien Raum ein, wo ein Teil von ihnen diffundiert und ein anderer an Carboxylgruppen der Zellwände oder negativ geladene Gruppen von Proteinen gebunden wird. Wie diese interne Verteilung genau stattfindet, ist je nach Metall und Pflanze unterschiedlich (Greger, 2004). Wie Wierzbicka (1998) berichtet, bleibt z.B. in *Allium cepa* der größte Teil an Blei im Apoplasten gebunden.

Auf diesem Wasserweg können die Ionen die Endodermis erreichen, wo „der innere Raum“ anfängt (Nultsch, 2001). Um in das Xylem zu gelangen, müssen sie die Endodermis und den Caspari-Streifen passieren. Die Metallaufnahme findet hauptsächlich in den jüngeren Wurzeln



statt, bei denen der Caspari-Streifen noch nicht ausgebildet ist (Marschner, 1995). Wie die Metalle bei älteren Wurzelteilen in das Xylem gelangen, ist unklar.

Der Schwermetalltransport im Phloem ist möglicherweise komplizierter, weil das Phloem in den lebenden Zellen Ionen leichter bindet. Cadmium zum Beispiel ist nach einer Blätterbehandlung in den Nebenblättern und dem Blattstiel von Erbsen zu finden; aber nicht weiter verbreitet (Greger et al., 1993). Stephan & Scholz (1993) vermuten, dass Nikotinamid, welches Metallchelatisierungsqualitäten hat, die Schwermetallgehalte im Phloem beeinflusst. Wasserpflanzen transportieren die Schwermetalle in beiden Gefäßtypen. Wenn das osmotische Potential um die Wurzeln herum zunimmt, nimmt auch der basipetale Transport von Zn und Cd zu, dagegen überwiegt der akropetale Transport, wenn die Blätter mit einem Osmoticum behandelt wurden (Greger, 2004).

Die Plasmamembran fungiert als Barriere für toxische Elemente und verhindert auf diese Weise deren unkontrollierte Aufnahme. Die Metalle werden in Form von Kationen aufgenommen. Für bestimmte Elemente existieren eigene Transportsysteme. Zink wird über die spezifischen Zinktransporter transportiert (Lasat et al., 2000) und bei Kupfer passiert das durch den ATP bedingten Kupferabfluss (Knauer et al., 1997). Costa & Morel (1994) nehmen an, dass 30% des Cadmiums passiv in die Pflanze aufgenommen werden, bei den restlichen 70% soll dies aktiv durch eine spezifische H<sup>+</sup>-ATPase passieren. Im Cytoplasma binden Metalle an negative Ladungen von Makromolekülen, die entweder gelöst vorliegen oder Teil größerer Zellstrukturen sind. Lösliche Biomoleküle, wie zum Beispiel die Phytochelatine, bilden Komplexe mit den Metallen, die dann über spezifische Transporter in Tonoplasten in die Vakuole gelangen, wo eine Abspaltung des Cadmiums mit anschließender Komplexierung durch eine organische Säure erfolgt. Die Phytochelatinmoleküle verlassen die Vakuole und stehen im Cytosol wieder als Bindungspartner zu Verfügung. Die Auflösung des Phytochelatin-Cadmium Komplexes gelingt offenbar durch den geringeren pH-Wert in der Vakuole (Steffens, 1990).

### **1.5.3 Hyperakkumulatoren und Excluders**

Wenn Pflanzen Schwermetalle aufgenommen haben, zeigen sich deutliche Unterschiede in der Schwermetalltoleranz. Einige Arten können Metalle in höheren Konzentrationen nicht existenzgefährdend akkumulieren, während andere Pflanzenarten bereits nach der Aufnahme von kleinsten Schwermetallkonzentrationen die ersten Schädigungssymptome zeigen.

Hyperakkumulator-Pflanzen sind krautige oder holzige Pflanzen, die mindestens 100-mal mehr Metalle in den Blättern ohne deutliche Symptome akkumulieren und tolerieren können. Baker & Brooks (1989) haben für Hyperakkumulatoren 0,1% als minimale Gewebekonzentra-

tion für Co, Cu, Cr, Pb und Ni festgelegt, für Zn und Mn liegen die Grenzwerte sogar bei 15%. Hyperakkumulatoren werden in der ganzen Welt gefunden. Sie synthetisieren Chelatoren, die Metallionen durch Komplexbildung detoxifizieren. Der lösliche, weniger toxische Organo-Metallkomplex wird zur Vakuole oder der Zellwand, die niedrigere metabolische Aktivität besitzen, transportiert. Der Komplex wird dort als organische oder anorganische Verbindung gelagert (Barceló & Poschenrieder, 1999; Hall, 2002), die am Ende der Vegetationsperiode mit den alten Blättern abgetrennt wird (Barceló & Poschenrieder, 2003). Zudem kann die Hyperakkumulation der Metalle als ein Nebenprodukt der Anpassung gegenüber anderen Bodenmineralen entstanden sein (Barceló & Poschenrieder, 2003).

Excluders sind im Gegensatz dazu solche Pflanzen, die eine niedrige Metallaufnahme bei höherer Außenmetallkonzentration haben. Sie haben eine metalloide Barriere außerhalb der Wurzeln, die die Metallaufnahme verhindert, aber sie funktioniert nicht mehr, wenn die Schwermetallkonzentration zu hoch wird.

Weil die verschiedenen Pflanzenarten unterschiedliche Aufnahmekapazitäten besitzen, ist es schwer zu bestimmen, welche aufgenommenen Konzentrationen normal sind und welche zu hoch. Deswegen hat Markert (1994) versucht, Anhaltspunkte für die Metallkonzentration der normalen Pflanzen zu geben (Tabelle 4).

**Tabelle 4** Normale Verteilung von Spurenelementen in der Pflanze (verändert nach Markert, 1994)

Spurelemente	$\mu\text{g g}^{-1}$
Aluminium	80
Blei	1,0
Cadmium	0,05
Chrom	1,5
Eisen	150
Kobalt	0,2
Kupfer	10
Mangan	200
Molybdän	0,5
Nickel	1,5
Quecksilber	0,1
Zink	50

## 1.6 Oxidativer Stress

### 1.6.1 Wie wird oxidativer Stress in Gegenwart von Schwermetallen verursacht?

Sauerstoff ist nicht nur essentiell für den Energiemetabolismus und die Atmung, sondern auch in degenerative Abläufe mit einbezogen (Marx, 1987; Aravind et al., 2005).

**Tabelle 5** Nomenklatur der verschiedenen Sauerstoffspezies

Triplett Sauerstoff (Grundzustand)	$\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$
Singulett Sauerstoff	$\text{O}-\text{O}\cdot$
Superoxid	$\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$
Perhydroxidradikal	$\cdot\text{O}-\text{O}:\text{H}$
Wasserstoffperoxid	$\text{H}:\text{O}-\text{O}:\text{H}$
Hydroxidradikal	$\text{H}:\text{O}\cdot$
Hydroxidion	$\text{H}:\text{O}\cdot$
Wasser	$\text{H}:\text{O}:\text{H}$

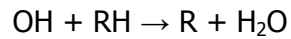
Er ist ein Biradikal, das heißt, dass er zwei nicht gepaarte Elektronen mit parallelen Spins hat (Tabelle 5). Er ist in Reaktionen mit organischen Molekülen träge, außer, er ist „aktiviert“. Um reagieren zu können, braucht der Sauerstoff einen Reduktor mit zwei parallelen Spins mit unterschiedlicher Ladung.

### 1.6.2 Ort der Aktivierung der Sauerstoffprodukte

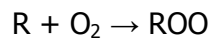
In grünen Pflanzen entstehen toxische Sauerstoffspezies vorwiegend während der Photosynthese (Elstner, 1991; Wagner, 2006). Sie werden entweder als Produkt der chemischen Reaktion zur Metabolismusaktivierung oder als Folge einer chemischen, beziehungsweise ökologischen Stressreaktion auch unter dem Einfluss von *in vivo* redox-inerten Metallionen wie  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  gebildet. Auch Fehlfunktionen der  $\text{NAD(P)H}^+$ -Oxidase in den Peroxisomen führen zur Superoxidbildung (Cakmak & Marschner, 1988; Marschner, 1995). Verletzungen, Hitzeschock oder Xenobiotika sowie Pathogene und Elicitoren können ebenfalls Auslöser für diese Reaktionen sein, die bis zu Bildung von Superoxid führen. Es wird vermutet, dass diese Reaktionen in den Pflanzenzellen Signalkaskaden auslösen, die den Gesamtorganismus vor physischem, chemischem oder biologischem Stress schützen können (Doke et al., 1991). Dies kann aber auch in einer hypersensitiven Reaktion zu regional begrenztem Zelltod führen.

### 1.6.3 Oxidative Schädigung der Lipide

Die Peroxidation von Lipiden läuft in drei Schritten ab: Aktivierung, Ausbreitung und Spaltung. Die Aktivierung zwischen einer ungesättigten Fettsäure (Linoleat) und einem Hydroxyradikal ist mit einer Abspaltung eines H<sup>+</sup>-Atoms von der Methylvinylgruppe der Fettsäure verbunden:



Bei der Ausbreitung wird diese Resonanzstruktur mit dem Triplett-Sauerstoff reagieren, einem Biradikal mit zwei freien Elektronen, das leicht mit anderen Radikalen reagiert. Nach dieser Reaktion wird ein Peroxidradikal gebildet:

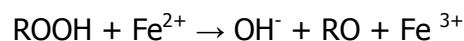


Dieses Peroxidradikal assimiliert ein Wasserstoffatom aus der sekundären Fettsäure, wobei ein Lipidhydroperoxid gebildet wird. Dieses setzt ein weiteres Kohlenstoffzentrum frei, das sich an der sekundären Assimilierung des Wasserstoffs beteiligen kann:



Die Hauptursache für den hohen Reaktionszustand des Hydroxidradikals in dem Lipidsystem ist, dass diese niedrige Konzentration eine Kettenreaktion verursacht. An dieser ist auch die häufigste Sauerstoffvariante, der Triplett-Sauerstoff, beteiligt.

Das Lipidhydroperoxid (ROOH) ist in Anwesenheit von Fe<sup>2+</sup> und anderen Metall-Katalysatoren instabil, weil es an der Fenton-Reaktion teilnimmt, die zur Bildung von reaktiven Alkoholradikalen führt:



Das ist die Ursache für die verbreiteten Kettenreaktionen in der Anwesenheit von Eisen.

Die Endprodukte des Abbaus des ROOH sind Ethylen und Ethan, die bei der Lipidperoxidation gebildet werden. Malondialdehyd (MDA) ist ein weiteres Endprodukt der Lipidperoxidation, das ausschließlich aus mehrfach ungesättigten Lipiden entsteht. Im Laufe der Oxidation von Lipidketten mit mehreren isolierten Doppelbindungen entsteht ein Peroxylradikal.

### 1.6.4 Oxidativer Schaden an den Proteinen

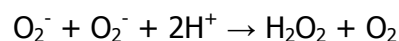
Oxidativer Stress kann zur Modifikation von Aminosäuren, zur Änderung der Elektronenladung und zu erhöhtem Proteinabbau führen. Die Reaktionskapazität der Aminosäuren kann sehr unterschiedlich sein. Schwefelhaltige Aminosäuren und die Thiolgruppen an Proteinen sind beispielsweise sehr sensitiv. Der aktivierte Sauerstoff kann ein Wasserstoff ( $H^+$ )-Atom von Cystein abstrahieren um ein Thiolradikal zu bilden, das sich mit einem anderen Thiolradikal verbinden wird, um eine Disulfidbindung auszubilden. Alternativ kann sich Sauerstoff mit Methioninresten verbinden, um oxidative Methionin-Schwefel Derivate zu bilden.

Oxidation der Fe-S-Zentren durch Superoxid stört die Enzymfunktionen (Gardner & Fridovich, 1991). Die Aminosäuren können dabei so modifiziert werden, dass das Protein oxidiert wird. Dies wird bei Anwesenheit von Metallkofaktoren beschleunigt (Stadtman, 1986).

## 1.7 Abwehrmechanismen gegen den oxidativen Stress

### 1.7.1 Superoxiddismutase

Die Superoxiddismutase (EC 1.15.1.11) ist erstmals von Mann & Kleilin (1938) isoliert worden, die vermuteten, dass sie für die Speicherung von Kupfer verantwortlich sei. Ihre katalytischen Funktionen wurden von McCord & Fridovich (1969) entdeckt. Seither ist die Superoxiddismutase als Katalysator der Dismutation von Superoxid zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff bekannt:



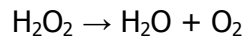
Da die Superoxiddismutase in allen aeroben Organismen zu finden ist, wo sie aktivierten Sauerstoff bildet, wurde vermutet, dass sie eine zentrale Rolle bei den Abwehrmechanismen gegenüber oxidativem Stress spielt (Beyer et al., 1991; Bowler et al., 1992; Scandalias, 1993). Es gibt drei verschiedene Typen von Superoxiddismutase, die nach dem Metall-Kofaktoren klassifiziert sind, die Mn-SOD in den Mitochondrien, die Fe-SOD in den Chloroplasten und die CuZn-SOD in den Chloroplasten und im Cytosol.

Die prokaryotischen und eukaryotische Zellen einiger Algen enthalten nur Mn-SOD und Fe-SOD Isoenzyme. Deshalb wird vermutet, dass es sich dabei um sehr alte Formen handelt.

Die Aktivität der Superoxiddismutase erhöht sich in den Zellen proportional zum ökologischen und xenobiotischen Stress (McKersie, 1996).

### 1.7.2 Katalase

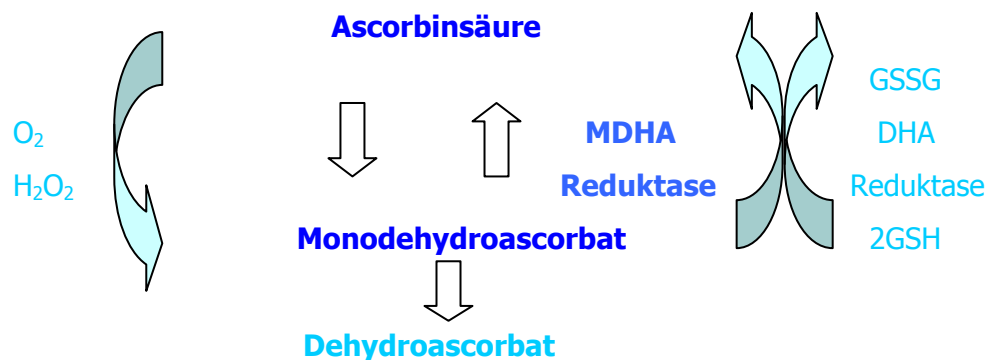
Die Katalase (1.11.1.6) katalysiert die Dismutation des Wasserstoffperoxids:



Das Enzym kommt in allen aeroben eukaryoten Organismen vor und ist für den Abbau von Wasserstoffperoxid, das in den Peroxisomen während der Oxidation der Fettsäuren gebildet wird, verantwortlich. Alle Formen dieses Enzyms sind tetramer. Die Katalase ist sehr photosensitiv (Hertwig et al., 1992).

### 1.7.3 Ascorbinsäure

Die L-Ascorbinsäure (Vitamin C) ist ein ubiquitäres Antioxidans in Pflanzen. Die grünen Blätter enthalten so viel Ascorbinsäure wie Chlorophyll. Ascorbat spielt eine sehr große Rolle in vielen physiologischen Prozessen, wie zum Beispiel dem Wachstum, der Differenzierung und dem Metabolismus (Foyer, 1993). Ascorbat reduziert auch erheblich die Gefahr durch die freien Radikale.



**Abbildung 2** Synthese und Degradierung von Ascorbinsäure

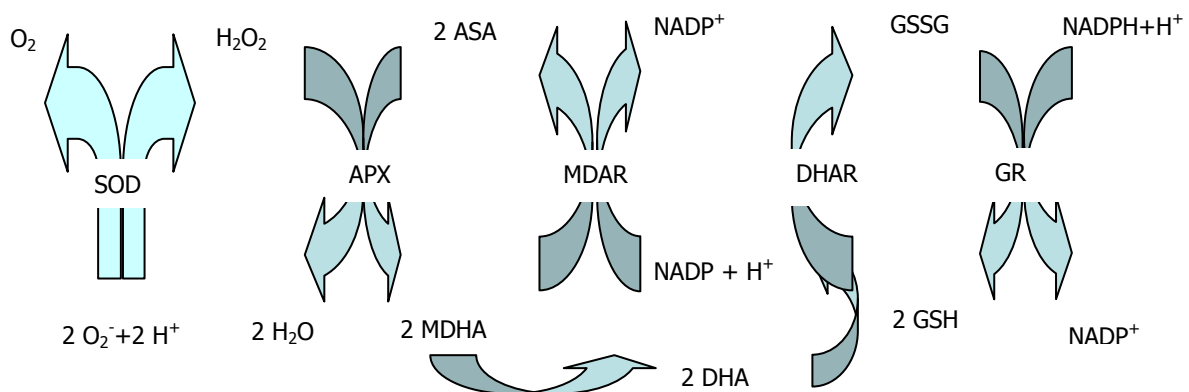
Ascorbinsäure wird aus D-Glukose synthetisiert und reagiert als Oxidationsmittel in Cytosol und Chloroplast. Es bindet Superoxid, Wasserstoffperoxid oder Tocopherolradikale, um Monodehydroascorbinsäure oder Dehydroascorbinsäure zu bilden. Durch die Aktivität der Monodehydroascorbatreduktase (MDHAR (EC 1.6.5.4)) und Dehydroascorbatreduktase (DHAR (EC 1.8.5.1)) wird Ascorbinsäure recycelt (Abbildung 2), wobei  $\text{NAD(P)H}^+$  und GSH als Elektronenquelle benutzt werden. Dehydroascorbat kann auch zu Tatraat oder Oxalat metabolisiert werden.

### 1.7.4 Peroxidase

Die Enzymklasse der Peroxidasen (EC 1.11.1.7, Wasserstoffperoxid-Oxidoreduktasen) entgiftet reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Peroxidasen reduzieren  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit Hilfe eines Elektronendonators zu Wasser. Wasserstoffperoxid stellt im Vergleich mit anderen Sauerstoffradikalen eine geringere Gefahr für die Zelle dar. Die Hauptgefahr, die von erhöhten  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentrationen ausgehen kann, ist die Oxidation von Thiolgruppen zu Disulfidbrücken, was sich auf die Funktion thiolregulierter Enzyme schädlich auswirken kann (Kaiser, 1979). Zu diesen zählen auch die GSTs. Wesentliche Bedeutung haben einige Peroxidasen im Lignifizierungsprozess (Hess, 1991) sowie bei der Pathogenabwehr (Messner & Schröder, 1999).

### 1.7.5 Glutathionreduktase

Das Enzym Glutathionreduktase (EC 1.6.4.2) ist ein regeneratives Enzym (vergleiche Abbildung 3). Mit Hilfe von  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  als Reduktionsmittel hält sie den Glutathion-Vorrat der Zelle in reduziertem Zustand (Kiefer, 2002), um reaktive Sauerstoffspezies zu reduzieren und auf diese Weise zu entgiften. Das zur Reduktion benötigte NADPH wird seinerseits wieder von den Photosystemen I und II zur Verfügung gestellt, was die Entgiftung von ROS über den Halliwell-Asada Zyklus zu einem lichtabhängigen Prozess macht (Kiefer, 2002).



**Abbildung 3** Halliwell–Asada Zyklus (Foyer et al., 1993, verändert). Entgiftung von Superoxid und Wasserstoffperoxid unter Verbrauch von Ascorbat und Wiederherstellung von Ascorbat auf Kosten von Glutathion und NADPH. Abkürzungen: ASA: Ascorbat, APX: Ascorbatperoxidase, DHAR: Dehydroascorbatreduktase, GR: Glutathionreduktase, GSH: Glutathion, GSSG: Glutathiondisulfid, MDHA: Monodehydroascorbatradikale, MDAR: Monodehydroascorbatreduktase, SOD: Superoxiddismutase.

Bei den intrazellulären Entgiftungsprozessen reduziert die Glutathionreduktase das zelltoxische Wasserstoffperoxid über GSH mit Hilfe der Glutathionperoxidase zu Wasser. Oxidiertes Glutathion (GSSG) wird über die Glutathionreduktase mittels NADPH als Reduktionsmittel

wieder zu GSH reduziert und steht auf diese Weise wieder für die Entgiftungsprozesse zur Verfügung (Abbildung 3).

### 1.7.6 Glutathion

Glutathion (GSH),  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-Cysteinyl-Glycin, ist ein ubiquitäres Tripeptid mit vielen Funktionen in Pflanzen und in den Chloroplasten. Glutathion wurde in allen Zellen höherer Pflanzen gefunden. Sein Niveau ist bei der höheren Lichtintensität am höchsten und auf subzellulärer Ebene ist seine Konzentration in den Chloroplasten höher als die im Cytosol, wo es auch akkumuliert werden kann. Glutathion kann auf verschiedene Weisen als Antioxidationsmittel wirken: Es reagiert chemisch mit dem Singulett Sauerstoff, dem Superoxyd und den Hydroxidradikalen und sorgt dafür, dass immer freie Radikale vorhanden sind. Andererseits kann das Glutathion als Cofaktor der Dehydroascorbatreduktase die Ascorbinsäure aus ihrer oxidierten in ihre reduzierte Form überführen (Loewus, 1988).

Das Glutathion kann auch alternativ zu diesen Funktionen am Zellmetabolismus beteiligt sein, zum Beispiel beim Transport von reduziertem Schwefel von den Blättern zu den Wurzeln (Rennenberg, 1982) oder es nimmt teil an der Entgiftung von Xenobiotika als Co-Substrat für die Glutathion S-Transferase. Außerdem kommt Glutathion als Ausgangsmolekül für die Phytochelatine, die Oligopeptide, die die Schwermetalle in den Pflanzen binden, vor.

### 1.7.7 Glutathion S-Transferasen

Glutathion S-Transferasen (GSTs, EC 2.5.1.18) sind erstmals bei Tieren beschrieben worden, wo sie die Konjugation von Arzneimitteln mit dem Tripeptid Glutathion katalysieren (Booth et al., 1961) und später auch in Pflanzen, in der Konjugation von Atrazin in Mais mit GSH (Frear & Swanson, 1970). Dieser Prozess der Konjugation führt zu einer Abspaltung elektrophiler Gruppen von Xenobiotikum und wird als echte Detoxifizierung bezeichnet.

Die pflanzlichen GSTs sind im Cytosol aber auch in den Membranen (Mikrosomen) gefunden worden. Die beiden Gruppen sind homo- (bei identischen Untereinheiten) oder heterodimere (im Fall von unterscheidlichen Untereinheiten) Enzyme, die eine Größe zwischen 23 und 30 kDa besitzen (Schröder, 2001). GSTs besitzen zwei Domänen um Konjugate von Glutathion und elektrophilen Substraten bilden zu können.

Die im Cytosol gelösten GSTs werden in folgende Klassen unterteilt: Phi (F), Tau (U), Theta (T), Zeta (Z), Lambda (L) und die Dehydroascorbatreduktasen (DHARs) (Edwards & Dixon, 2005). Die Klassen Phi und Tau besitzen die meisten Mitglieder und sie sind pflanzen-spezifisch. Die restlichen Klassen sind auch in der Tierwelt präsent.



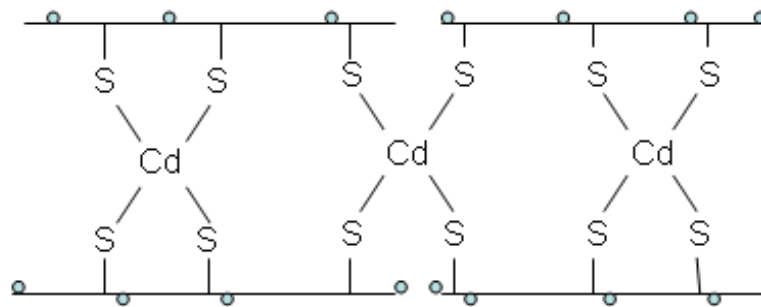
Jeder der GST-Klassen ist eine wichtige Funktion zugeschrieben worden. So scheint die Phi-Klasse besonders Stressantworten zu geben, Pflanzenhormone zu metabolisieren und auf Trockenstress zu reagieren, während die Tau-GST bei biotischem und abiotischem Stress und bei der Herbizid Entgiftung Rollen haben. Die weiteren GST-Klassen haben eingeschränkte Aufgaben. So hat die Theta-GST Peroxidaseaktivität, die Zeta-GST hingegen Isomeraseaktivität, die Lambda-GST Reduktaseaktivität und die DHARs katalysieren die Ascorbat Reduktion. Marrs (1996) äußert die Meinung, dass die Gruppe von anderen GSTs den Stress durch Hitze, Schwermetalle und Pathogene reguliert.

### 1.7.8 Phytochelatine

Um sich vor toxischen Schwermetallen schützen zu können, haben die Pflanzen Mechanismen entwickelt, mit deren Hilfe die Metallionen, die ins Cytosol eindringen, komplexiert und deaktiviert werden. Die Phytochelatine haben folgende Struktur (Grill et al., 1985):



Untersuchungen zeigen, dass  $\text{Cd}^{2+}$  und andere Schwermetalle durch diese Peptide chelatiert werden. Die Länge ihrer Kette variiert von  $n = 2$  bis  $n = 11$ ,  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  (Gekeler et al., 1989).

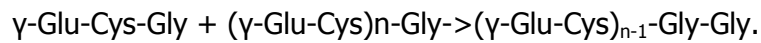


**Abbildung 4** Struktur eines  $[\text{Cd}_3(\text{PC}_4)]$  Komplexes. In Blau sind unkoordinierte Carboxylgruppen, deren Platz von der negativen elektrischen Ladung stark abhängig ist, dargestellt (Strasdeit et al., 1991).

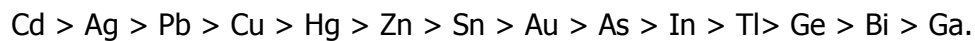
$\text{Cd}^{2+}$ -Ionen verursachen die stärkste Bildung von Phytochelatinen *in vivo*. Der Cd-PCs-Komplex hat die in der Abbildung 4 dargestellte Struktur.

Der Platz der unkoordinierten Carboxylgruppen ist von der stark negativen Elektronenladung abhängig (Strasdeit et al., 1991). Die Synthese von Schwermetall-Phytochelatinkomplexen aus Glutathion ist ein lebensnotwendiger metabolischer Prozess in den höheren Pflanzen (Rüegsegger et al., 1990; Rüegsegger & Brunold, 1992). Die Synthese der Phytochelatine

wird durch das Enzym  $\gamma$ -Glutamylcystein-Dipeptidil-Transpeptidase (Phytochelatinsynthese), (EC 2.3.2.15), katalysiert. Die erste Reaktion wird durch folgende Gleichung dargestellt:

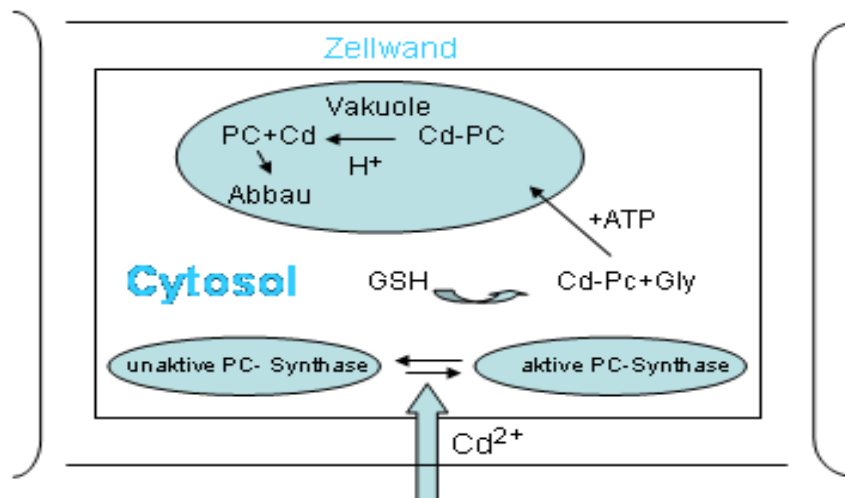


Diese Reaktion ist durch Schwermetalle stark induzierbar. Der Zusammenhang zwischen den Metallen und der Effektivität der Induktion der Enzymaktivität hat die Reihenfolge:



Außer in der Entgiftung spielen die Phytochelatine eine Rolle im Mechanismus, der die Konzentration essentieller Metallionen in der Pflanzenzelle reguliert.

Die Phytochelatine spielen hier zwei Rollen: einerseits müssen sie Metallionen komplexieren, deaktivieren und in der Vakuole einlagern (Abbildung 5), andererseits müssen sie die essentiellen Metalle zu den neusynthetisierten Apoenzymen führen (Thumann et al., 1991).



**Abbildung 5** Die Cd<sup>2+</sup> Ionen dringen in die Zelle ein und aktivieren die Synthese von Phytochelatinen, deren Charakter für die Bildung von Phytochelatinen von Glutathion typisch sind. Der Cd-PCs-Komplex wird aktiv in die Vakuole transportiert, wo er eventuell dissoziiert wird. Während das Metall dort gelagert wird, werden die Phytochelatine degradiert (Zenk, 1996).

### 1.7.9 Carotinoide

Carotinoide gehören zu den C<sub>40</sub>-Isoprenoiden und Tetraterpenen, die in den Plastiden der photosynthetisierenden und nichtphotosynthetisierenden Pflanzenzellen zu finden sind. In den Chloroplasten haben Carotinoide die Funktion der akzessorischen Pigmente, aber auch nicht

unwesentlich ist ihre Rolle, die verschiedenen Formen des aktivierten Sauerstoffs zu entgiften. Während der Entgiftung können Carotinoide das System auf verschiedene Weisen schützen:

- durch eine Reaktion mit den Produkten des Lipidhydroperoxid um eine Kettenreaktion zu starten (Burton & Ingold, 1984)
- durch Bindung des Singulett Sauerstoffs und Abgabe von Energie als Wärmeenergie (Mathis & Kleo, 1973)
- durch eine Reaktion mit dem Triplett oder angeregten Chlorophyllmolekülen, um die Bildung von Singulett Sauerstoff zu verhindern
- durch Abgabe der Energie durch den Xanthophyllzyklus (McKersie, 1996).

### **1.8 Zielsetzung der Arbeit**

In Rahmen dieser Arbeit werden verschiedene Aspekte des Schwermetalleinflusses auf die Aktivitäten von Enzymen, die am oxidativen Stoffwechsel beteiligt sind, auf Glutathion S-Transferasen und die Entgiftungsleistung unter multipler Belastung mit organischen Fremdstoffen untersucht.

Speziell wurde hinterfragt

- inwieweit die untersuchten Pflanzenarten Schwermetalle aufnehmen können, ohne deren physiologische Prozesse zu stören. Es wurden Cd-, As- und Pb-Versuche mit *Typha latifolia* durchgeführt.
- wo die höchste Akkumulation an Schwermetallen in der Pflanze stattfindet: im Rhizom oder Spross und wie sich die vertikale Verteilung verhält.
- wie sich die Aktivitäten von Schutzenzymen unter dem Einfluss erhöhter Schwermetallkonzentrationen infolge der Schwermetallbehandlung verändern
- wie die Verteilung und Veränderung der verschiedenen Enzymaktivitäten des Halliwell-Asada Zyklus nach den Metallbehandlungen gestaltet ist
- wie die Entgiftungskapazitäten von drei verschiedenen Pflanzenarten unter Cadmiumeinfluss sich verändert, und
- welche Unterschiede in den Isoenzymmustern der Glutathion S-Transferasen nachgewiesen werden können.

Der Hintergrund der Untersuchungen ist die Suche nach Pflanzenarten, die gute Überlebensmechanismen besitzen um die hohen Schwermetallkontaminationen bei gleichzeitiger Belastung mit organischen Xenobiotika mit möglichst niedrigen physiologischen Schäden ertragen zu können. Solche Pflanzen könnten zur Phytoremediation von metallkontaminierten Oberflächen und Gewässern eingesetzt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Beschreibung der verwendeten Pflanzenarten

#### 2.1.1 *Typha latifolia*

*Typha latifolia* L. (Abbildung 6), der breitblättrige Rohrkolben, gehört zu den süßgrasartigen Rohrkolbengewächsen (*Typhaceae*), aus der Abteilung Bedecktsamer (*Magnoliophyta*) und der Klasse Einkeimblättrige (Liliopsida). Diese Familie umfasst insgesamt 12 Arten.

Die Pflanze hat waagrecht kriechende Rhizome, einen aufrecht wachsenden Spross, ihre Blätter sind zwischen 1 und 3 cm breit, insgesamt kann sie bis zum 4 m groß werden. *T. latifolia* ist häufig in stehenden oder langsam fließenden Gewässern zu finden. Die Pflanzen bevorzugen Sümpfe, Wassergräben, Röhrlichtzonen an Seen und Teichen, wo ihre Rhizome bis in drei Meter Tiefe wachsen können. Ihre größte Verbreitung hat sie in der nördlichen gemäßigten Zone sowie in den Tropen und Subtropen, nicht aber in Mittel und Südafrika, Südasien, Polynesien und Australien ([http://de.wikipedia.org/wiki/Breitblaettriger\\_Rohrkolben](http://de.wikipedia.org/wiki/Breitblaettriger_Rohrkolben)). Die Pflanzenart wird weit verbreitet für die Phytoremediation in Kläranlagen und Schönungsteichen benutzt.



**Abbildung 6** *Typha latifolia* (Quelle: <http://fichas.infojardin.com/foto-acuaticas/typha-latifolia.jpg>).

#### 2.1.2 *Helianthus annuus*

*Helianthus annuus* L., die Sonnenblume (Abbildung 7), ist eine Art aus der Gattung *Helianthus* aus der Familie der Korbblütengewächse (*Asteraceae*). Die Pflanze hat ihren

Ursprung in Amerika, von wo sie im 16. Jahrhundert nach Europa gebracht worden ist. Sie bevorzugt fruchtbare, feuchte Böden. Pro Quadratmeter wachsen im landwirtschaftlichen Bestand 6 bis 7 Pflanzen, die bis zu 2 m hoch werden können. Die Früchte der Sonnenblume sind sehr vitaminhaltig und haben zudem einen hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren. Die Pflanze besitzt die Fähigkeit, dem Boden gefährliche Stoffe zu entziehen (<http://de.wikipedia.org/wiki/Sonnenblume>), weshalb sie zur Reinigung bleihaltiger und radioaktiver Böden eingesetzt wird.



**Abbildung 7** *Helianthus annuus* auf dem Versuchsfeld Rafz (Schweiz), im August 2005.

### **2.1.3 *Nicotiana tabacum***

*Nicotiana tabacum* L. oder Tabak (Abbildung 8) ist ein Bedecktsamer (*Magnoliophyta*). Die Pflanzenart gehört zur Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*), zu denen auch die Tomaten und die Kartoffeln zählen. Es sind über 65 *Nicotiana*-Arten bekannt. Ihr besonderes Merkmal ist das Alkaloid Nikotin, das allerdings nur Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) in den Wurzeln produzieren und in den Blättern ablagern. Der wirtschaftlich wichtigste Teil des Tabaks sind die Blätter, die von der Tabakindustrie verwendet werden.

Als Pflanze mit hoher Biomasse und einigem Akkumulationspotenzial für Metalle hat sie neuerdings Bedeutung in der Phytoremediation gewonnen.



**Abbildung 8** *Nicotiana tabacum* auf dem Versuchsfeld (Ostschweiz), im August 2005.

## 2.2 Pflanzenbehandlungen

### 2.2.1 Behandlungsreihe *Typha latifolia*

Pflanzenmaterial: Herkunft und Anzucht

Das Pflanzenmaterial wurde von der Firma Jörg Petrowsky in Eschede als 18 Monate alte Rhizome bezogen. Nach der Lieferung wurden die Rhizome sofort in Blähton (LecaTon, Partikelgröße 2–5 mm) gepflanzt. Im Gewächshaus herrschten während des gesamten Behandlungszeitraums folgende Bedingungen (Tabelle 6):

**Tabelle 6** Gewächshausbedingungen während des Behandlungszeitraums

	Dauer (h)	Luftfeuchtigkeit (%)
Tag	14	50
Nacht	10	50

Es wurde eine Pflanze pro Topf eingepflanzt. Die Pflanzengefäße (Ø 24 cm, Pöppelmann) wurden in Wannen gestellt (Abbildung 9), um eine eventuelle Kontaminierung der Gewächshauskabine mit Schwermetallen zu vermeiden.





**Abbildung 9** *Typha latifolia* während der Behandlung mit Schwermetallen im Gewächshaus des GSF-Forschungszentrums.

Während der Wachstumsperiode wurden je vier Pflanzen mit 2,4 L Wasser alle 36 h durch ein Bewässerungssystem und zunächst einmal pro Woche zusätzlich mit 10 g Murashige & Skoog Medium (Duchefa) (Tabelle 7) versorgt.

**Tabelle 7** Zusammensetzung des verwendeten Murashige & Skoog Mediums (Duchefa)

Mikroelemente		
Elemente	mg/L	µM
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,11
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,10
FeNaEDTA	36,70	0,10
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	100
KI	0,83	5,00
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16,90	100
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	1,03
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,60	29,91
Makroelemente		
Elemente	mg/L	mM
CaCl <sub>2</sub>	332,02	2,99
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	1,25
KNO <sub>3</sub>	1900,00	18,79
MgSO <sub>4</sub>	180,54	1,50
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00	20,61

### 2.2.1.1 72 Stunden *in vivo* Behandlung von *Typha latifolia*

Nach 72 d Wachstum wurden die Pflanzen nach dem unten beschriebenen Schema (Tabelle 8) mit insgesamt zwölf Behandlungsreihen, drei verschiedenen Schwermetallen in jeweils vier verschiedenen Konzentrationen, behandelt.

Die Kontrollpflanzen wuchsen bei gleichen Bedingungen, ohne Schwermetallzugabe. Für jede Konzentration wurden drei eigenständige Pflanzen als Replikate benutzt.

Vor der Pflanzenbehandlung wurde der Blähton entfernt und ein Plastikbeutel in jeden einzelnen Topf eingelegt, in dem 1,5 L Wasser mit der entsprechenden Menge an Schwermetall dosiert wurden. Nach 72 h in diesem Medium wurden die Pflanzen beprobt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

**Tabelle 8** Behandlungsreihe für den 72 h *in vivo* Versuch von *Typha latifolia*

Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	Schwermetall	Behandlungsdauer in Stunden (h)	Pflanzenzahl
0	-	72	3
10	Cd	72	3
50	Cd	72	3
100	Cd	72	3
250	Cd	72	3
10	As	72	3
50	As	72	3
100	As	72	3
250	As	72	3
10	Pb	72	3
50	Pb	72	3
100	Pb	72	3
250	Pb	72	3

### 2.2.1.2 72 Tage *in vivo* Behandlung von *Typha latifolia*

Für diesen Versuch wurden weitere Pflanzen derselben Klone wie oben beschrieben umgesetzt und angezogen. Nach 21 d wurden die Pflanzen nach dem folgenden Schema behandelt (Tabelle 9): Die Gewächshausbedingungen waren die gleichen wie beim 72 h Versuch (siehe Tabelle 6). Bei dieser Behandlung wurden 5 L Wasser mit Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  an Schwermetallen pro Wanne zugegeben. Das Medium



wurde jede Woche gewechselt, um über die Zeit der Versuchsdauer gleiche Bedingungen und Schwermetallkonzentrationen zu erhalten. Nach 72 d wurden die Pflanzen geerntet und bis zu ihrer Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

**Tabelle 9** Behandlungsreihe für den 72d *in vivo* Versuch von *Typha latifolia*

Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	Schwermetall	Behandlungsdauer in Tage (d)	Pflanzenzahl in den beiden Experimenten	
0	-	72	5	14
10	Cd	72	5	10
50	Cd	72	5	10
100	Cd	72	5	10
250	Cd	72	5	16

### 2.2.2 Behandlungsreihe *Helianthus annuus*

Die Sonnenblumenproben von 14 unterschiedlichen Mutanten (Nehnevajova, 2006) wurden von Dr. Rolf Herzig, PHYTOTECH (Schweiz), zur Verfügung gestellt. Ausgewählte Mutanten der M3-Generation, die über große Biomasse, gutes Wachstum und hohe Fähigkeit zur Metallakkumulation verfügen, wurden ausgewählt und weiter verwendet.

Sonnenblumenblätter wurden auf dem Versuchsfeld geerntet (Abbildung 10) und gleich in flüssigem Stickstoff eingefroren, zum Labor ins GSF-Forschungszentrum transportiert und bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.



**Abbildung 10** Mutagenisierte *Helianthus annuus* auf dem Versuchsfeld Rafz (CH) kurz vor der Ernte.

Das Versuchsfeld von 10 x 30 m Größe in Rafz (Schweiz) liegt 23 km nördlich vom Flughafen Zürich. Die Versuchsböden stellten sowohl einheimischen Boden als auch Industrie-klärschlamm kontaminierte Sandböden dar. Sie wurden als Parabraunerde (haplic luvisol), Tabelle 10, klassifiziert (Wenger, 2000).

**Tabelle 10** Chemische Zusammensetzung den Parabraunerde (Wenger, 2000)

Bodenzusammensetzung	Menge
Sand	54%
Schlamm	28%
Lehm	18%
Kohlenstoff (organisch)	1,6%
CaCO <sub>3</sub>	0,6%
CEC (cation exchange capacity)	16,9 cmol kg <sup>-1</sup> Boden

Die Sonnenblumenmutanten wurden auf Flächen von 4 x 15 m ausgepflanzt (je sechs Pflanzen pro Behandlung und Sorte), auf denen homogene Metallkonzentrationen festgestellt worden waren.

Im Boden des Versuchsfeldes, der einen pH Wert von 5,6 aufwies, konnten mit Hilfe des 2M-Salpetersäureverfahrens (HNO<sub>3</sub>) folgende Gesamtmetallkonzentrationen bestimmt werden (Tabelle 11):

**Tabelle 11** Gesamt Metallkonzentrationen auf dem Versuchsfeld Rafz (Schweiz)

Schwermetall	mg kg <sup>-1</sup> Trockengewicht
Blei	473
Cadmium	0,4
Chrom	32
Zink	740

Die höchste Metallkonzentration auf dem Versuchsfeld wurde im Oberboden (top soil) festgestellt. Wesentlich niedrigere Metallkonzentrationen sind in den tieferen Bodenschichten gefunden worden (Krebs-Hartmann, 1996). Die Ergebnisse der Bodenuntersuchungen im gleichen Versuchsfeld im Jahr 2001 zeigten keine signifikanten Unterschiede für die Cadmium-, Zink- und Kupferkonzentration unter 23 verschiedenen Proben und weisen auf eine relativ homogene Metallkonzentration auf dem Versuchsfeld hin (Nehnevajova, 2006). Die Sonnenblumen wurden mit 60 kg N ha<sup>-1</sup>, 50 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> und 400 kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> laut Schweizer

Landwirtschaftspraxis und unter Berücksichtigung der individuellen Pflanzenbedürfnisse gedüngt. Um die Metallverfügbarkeit und die Phytoextraktionseffektivität der Pflanzen zu erhöhen, wurden je zwei Behandlungen mit zwei unterschiedlichen Düngern durchgeführt:

1. Sulfatbehandlung, mit Stickstoff und Kalium als Sulfatsalzen:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und  $\text{K}_2\text{SO}_4$
2. Nitratbehandlung, mit Stickstoff in Nitratform ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) und K als KCl.

Phosphor wurde in beiden Fällen als dreifaches Superphosphat hinzugefügt (TSP, Nehnevajova, 2006).

### 2.2.3 Behandlungsreihe *Nicotiana tabacum*



**Abbildung 11** *Nicotiana tabacum* auf dem Versuchsfeld in der Oostschweiz unmittelbar vor der Ernte.

Auch die Tabakproben wurden von Dr. Rolf Herzig, PHYTOTECH (Schweiz), überlassen. Die Proben wurden auf dem Versuchsfeld in der Oostschweiz geerntet (Abbildung 11) und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Für diesen Versuch wurden selektierte Tabaksorten verwendet. Alle Sorten zeigten in früheren Experimenten besonders hohe Akkumulationsraten für Zink, Cadmium und Blei und hatten deshalb die besten Voraussetzungen, um den Schwermetallgehalt des Zn-kontaminierten Bodens zu reduzieren. Klone von zwei verschiedenen Tabaksorten: Badischer Geudertheimer (BAG), Forchheim Pereg (FoP) und vier Tabakmutanten: NBCu 10-8 F1 und NBCu 10-4 F1,

abstammend von BAG sowie NFCu 7-15 F1 und NFCu 7-19 F1 (FoP), wurden *in vitro* im Labor in MS-Agar Murashige & Skoog (1962) angezogen und später im Bodenvorbereitung und im Feld an Außenbedingungen (Boden, Licht, Temperatur) gewöhnt.

Die Tabakpflanzen wurden in die gepflügte und geeggte Versuchsfläche gepflanzt. Dieses Vorgehen gewährleistete ein Minimum an Ausfällen und besserer Kontrolle über den Versuch. Die Tabakpflanzen wurden mit 170 kg N ha<sup>-1</sup>, 40 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> und 260 kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> laut Schweizer Landwirtschaftspraxis und den individuellen Bedürfnissen der Kultur gedüngt. Zusätzlich wurden Ammoniumsulfat- und Ammoniumnitratdünger auf das Feld ausgebracht. Ziel war es, die Metallaufnahme und die Phytoextraktionskapazität der Pflanzen zu erhöhen. Um eine optimale Düngergabe für die höchste Metallextraktionsrate im Tabak zu finden, wurden die Tabakpflanzen mit doppelter Konzentration (2mal Ammoniumsulfat (AS) oder Ammoniumnitrat (AN)) und mit kombinierter Gabe (1 AS+1 AN und 1,5 AS+1,5 AN) gedüngt.

### 2.3 Aufarbeitung des Pflanzenmaterials (Enzymextraktion)

Das bei -80°C gelagerte Pflanzenmaterial wurde nach der Methode von Schröder et al. (2005) aufgearbeitet. Dazu wurden die tiefgefrorenen Blätter und die Rhizome von *Typha latifolia* unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und mit der zehnfachen Menge an Aufarbeitungspuffer (siehe Tabelle 12) versetzt. Die Probe wurde dann auf Eis gemischt, mit Ultra Turrax (IKA) bei maximaler Geschwindigkeit für 3 min homogenisiert und für 30 min unter ständigem Rühren und 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Extrakt bei 48 000 x g für 30 min und 4°C zentrifugiert (JA 25, Beckman Coulter). Der Überstand wurde dekantiert und mit Miracloth-Filter 20-25 µM (Calbiochem) filtriert, das Volumen bestimmt und das Pellet verworfen.

Mit dem Überstand wurde eine Ammoniumsulfatfällung von 0-40% Sättigung durchgeführt. Auf diese Weise wurde die Hydrathülle von Proteinen zerstört und ausgefällt. Die Menge an Ammoniumsulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) wurde mit Hilfe folgender Formel (Abbildung 12) berechnet:

$$\text{Ammoniumsulfatmenge (g)} = V \times 1,77(S-s)/(3,54-S)$$

V = Volumen der Lösung in mL

S = gewünschte Konzentration an Ammoniumsulfat

s = vorgelegte Konzentration an Ammoniumsulfat

**Abbildung 12** Formel zu Berechnung der benötigten Ammoniumsulfatmenge (nach Jaenicke, 1984)

Nach Zugabe der entsprechenden Ammoniumsulfatmenge folgte eine dreißigminütige Inkubation, erneute Zentrifugation für weitere 30 min, erneutes Dekantieren und Filtrieren der Probe und danach eine 40-80% Ammoniumsulfatfällung, um die gewünschten Enzyme zu fällen. Das Salz wurde wieder in kleinen Schritten dazugegeben.

**Tabelle 12** Erläuterung der Funktion der im Aufarbeitungspuffer (0,1 MTris/HCl, pH 7,8) enthaltenen Pufferkomponenten:

Pufferkomponente	Bedeutung	Anteil im Puffer
Nonidet P 40	solubilisiert die Membranen	1% Nonidet P40
PVP K90	Komplexbinder zum Abfangen oxidativ irreversibel wirkender Phenolebildner	1% PVP K90
EDTA	Komplex für zweiwertige Metallionen, die die GST-Aktivität stören oder sie hemmen können	5 mM EDTA
DTE	hält SH-Gruppen im reduzierten Zustand	5 mM DTE

Abschließend wurde der Extrakt bei 48 000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet, das einen sehr hohen Salzanteil besaß, entsalzt. Für die Entsalzung wurden PD 10 Säulen (GE Healthcare) mit 25 mL Puffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,8) äquilibriert. Das Pellet wurde in 2,5 mL des gleichen Puffers resuspendiert und auf die Säule aufgetragen. Protein wurde mit 3,5 mL Puffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,8) eluiert und aufgefangen. Die Proben wurden in Aliquots zu je 500 µL für weitere Messungen pipettiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

## 2.4 Bestimmung der Proteingehalte

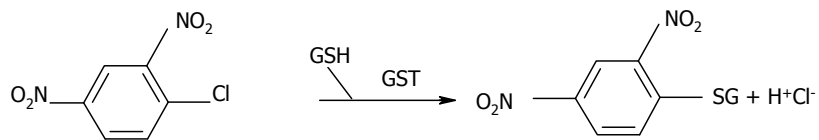
Die Proteingehalte wurden nach Bradford (1976) am Photometer Spectramax plus 384 (Molecular Devices) bestimmt.

Dazu wurden 200 µL der Bradford Arbeitslösung in eine 96 Well Mikrotiterplatte (Nunc) pipettiert. Dann erfolgte die Zugabe von 10 µL Probe, 10 min Inkubation und eine nachfolgende Messung bei 595 nm. Die Auswertung dieser und der nachfolgenden Messungen wurde mit dem Programm Soft Max Pro 4.6 (Molecular Devices) durchgeführt. Die Kalibriergeraden wurden mit Rinderserum-Albumin (BSA) erstellt. Weil nicht alle Proben die gleiche Konzentration an Protein enthielten, wurden zwei verschiedene Kalibriergeraden benutzt.

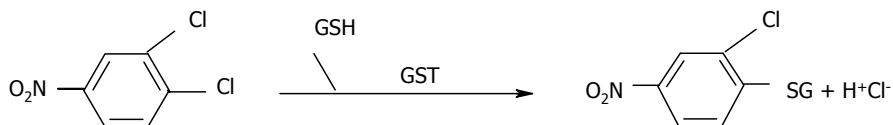
## 2.5 Bestimmung der Enzymaktivitäten

### 2.5.1 Glutathion S-Transferasen (GST)-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität der Glutathion S-Transferasen (EC 2. 5. 1. 18) wurde nach der Methode von Habig et al. (1974) durchgeführt. In den nachfolgenden Abbildungen 13 bis 17 sind die Konjugationsreaktionen mit den jeweiligen Modellsubstraten (Sigma) dargestellt:



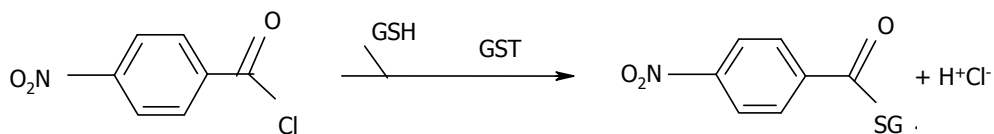
**Abbildung 13** Konjugation von 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (CDNB) mit GSH zu S-(2,4-Dinitrophenyl)-Glutathion.



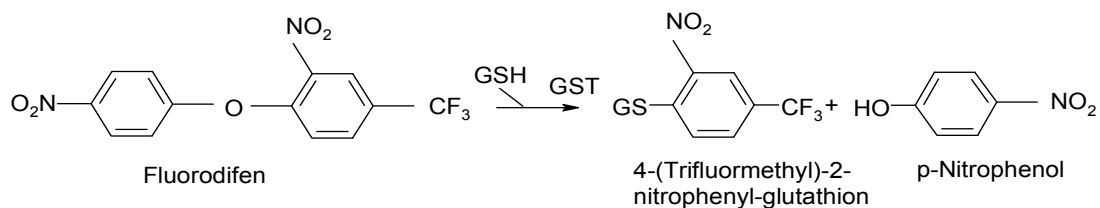
**Abbildung 14** Konjugation von Dichlornitrobenzol (DCNB) mit GSH zu S-(2-Chlor-4-Nitrophenyl)-Glutathion.



**Abbildung 15** Konjugation von p-Nitrobenzylchlorid (NBC) mit GSH zu p-Nitrobenzyl-Glutathion.



**Abbildung 16** Konjugation von p-Nitrobenzoylchlorid (NBoC) mit GSH zu p-Nitrobenzoyl-Glutathion.



**Abbildung 17** Reaktion des Herbizids Fluorodifen mit GSH.

Dem Ansatz wurde reduziertes Glutathion als Konjugationspartner der Glutathion S-Transferasen zugegeben, die die Enzymreaktion katalysieren. Die Konjugate, die bei dieser Reaktion gebildet wurden, wurden spektrophotometrisch bestimmt. Die substratspezifischen Wellenlängen sind in Tabelle 13 dargestellt.

Um die nichtenzymatische Reaktion von reduziertem Glutathion mit dem Substrat erfassen zu können, wurde ein Blank gemessen und von den Reaktionswerten abgezogen.

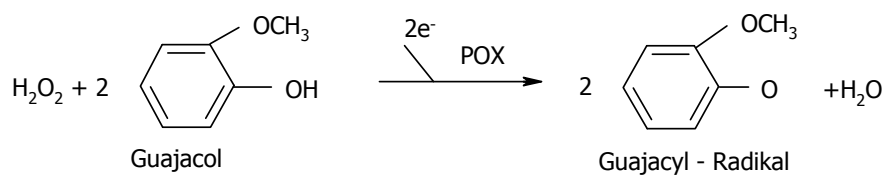
Vor der Testdurchführung wurden die Substrate und das Glutathion entsprechend frisch abgewogen und in Ethanol, beziehungsweise destilliertem Wasser, gelöst. Die Ansätze wurden wie in der Tabelle 13 beschrieben, zusammenpipettiert und gut durchmischt. Die Photometerestimmung erfolgte in einer Mikrotiterplatte mit 190  $\mu\text{L}$  Puffer- Substratgemisch und 10  $\mu\text{L}$  Enzymextrakt. Von jeder Probe wurden drei Replikate gemessen. Die Messung erfasste die lineare Zunahme oder Abnahme (Fluorodifen) der Extinktion bei der substratspezifischen Wellenlänge über eine Dauer von 300 s.

**Tabelle 13** Parameter und Pipettierschema für die spektrophotometrische Bestimmung von Glutathion S-Transferasen Aktivität

	CDNB	DCNB	NBC	NBoC	Fluorodifen
Tris/HCl Puffer, pH	6,4	7,5	6,4	6,4	7,5
Wellenlänge (nm)	340	345	310	310	405
Extinktionskoeffizient ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	9,6	8,5	1,8	1,9	3,1
GSH Konzentration im Well (mM)	1	1	1	1	1
Substratkonzentration im Well (mM)	1	1	0,5	0,5	1
Endvolumen, (in der Mikrotiterplatte), $\mu\text{L}$	200	200	200	200	200
Proteinanteil, (am Endvolumen), $\mu\text{L}$	10	10	10	10	10

### 2.5.2 Peroxidase-Aktivität

Die Aktivität der Peroxidasen (EC 1. 11. ...) im Enzymextrakt wurde nach der Methode von Drotar et al. (1985) durchgeführt. Das für diese Messung (Abbildung 18) verwendete Substrat ist Guajacol (2-Methoxy-phenol).



**Abbildung 18** Reaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit dem Substrat Guajacol, welches die Peroxidase zu Tetraguajacol katalysiert.

**Tabelle 14** Ansatz für den Peroxidase-Test

Reagenzien	Pipettiervolumen ( $\mu\text{L}$ )
Tris/HCl 50 mM pH 6,0	27 300
Guajacol 3,4 mM	600
$\text{H}_2\text{O}_2$ 9 mM	600
Enzymextrakt	10

Guajacol und Wasserstoffperoxid wurden in destilliertem Wasser gelöst und dem Puffer zugegeben (Tabelle 14). Danach wurden 190  $\mu\text{L}$  von dem Substratansatz in die Mikrotiterplatten pipettiert und 10  $\mu\text{L}$  Enzymextrakt zugegeben. Die Messung erfolgte über 300 s. Die Messung der Extinktionsänderung erfolgte bei 420 nm, der Extinktionskoeffizient beträgt  $26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 2.5.3 Ascorbatperoxidase-Aktivität

Um die Aktivität der Ascorbatperoxidase (EC 1. 11. 1. 11) messen zu können, wurde die Methode von Vanacker et al. (1998) verwendet. Hierzu wurde die Oxidation des Ascorbats und die damit verbundene Extinktionsabnahme spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 290 nm bestimmt. Dazu wurde folgender Ansatz pipettiert (Tabelle 15):

**Tabelle 15** Ansatz für den Ascorbat-Peroxidase-Test

Reagenzien	Pipettiervolumen ( $\mu\text{L}$ )
55,56 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,0	36 000
Vitamin C (Natriumascorbat 60 mM)	10
3% $\text{H}_2\text{O}_2$	41
Enzymextrakt	20



Die Messungen wurden bei 290 nm mit UV durchlässigen Mikrotiterplatten (Greiner) durchgeführt. Pro Well wurden 180  $\mu\text{L}$  Puffer-Substratgemisch und 20  $\mu\text{L}$  Enzymextrakt pipettiert. Jede Messung dauerte 300 s zur Messung der Extinktionsabnahme. Der Extinktionskoeffizient hat einen Wert von  $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### 2.5.4 Monodehydroascorbatreduktase-Aktivität

Monodehydroascorbatradikale disproportionieren zu Ascorbat oder spontan zu Dehydroascorbat durch Katalyse der NAD(P)H-abhängigen Monodehydroascorbatreduktase (EC 1.6.5.4) oder nichtenzymatische Mechanismen ( $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei pH 7,0) (Foyer, 1993).

Um die Aktivität dieser Reduktase bestimmen zu können, wurde eine modifizierte Methode von Vanacker et al. (1998) benutzt. Die Monodehydroascorbatreduktase wurde dabei an dem Spectra max Plus 384 Photometer (Molecular Devices) bei  $25^\circ\text{C}$  und 340 nm für 300 s bestimmt. Der Extinktionskoeffizient betrug  $6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Die Aktivität der Monodehydroascorbatreduktase wurde durch die Reaktion der Ascorbatoxidase im Puffergemisch aus Hepes/KOH mit NADPH, Ascorbat und Enzym bestimmt. Im Ansatz wurden die folgenden Volumina verwendet (Tabelle 16):

**Tabelle 16** Ansatz für die Monodehydroascorbatreduktase-Test

Reagenzien	Pipettiervolumen ( $\mu\text{L}$ )
111 mM Hepes/KOH pH 7,6	30 000
25 $\mu\text{M}$ NADPH	100
2,5 mM Ascorbat	1 000
0,4 U/mL Ascorbatoxidase	13,3 Units
Enzym	20

Es wurden 20-25 mL des Hepes/KOH Puffers vorgelegt und NADPH, Ascorbat und Ascorbatreduktase zugegeben. Der Ansatz wurde mit Puffer auf 30 mL aufgefüllt und pro Well 180 mL pipettiert. Zum Schluss erfolgte die Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  Enzymextrakt pro Well.

#### 2.5.5 Dehydroascorbatreduktase-Aktivität

Um die ständige Nachlieferung von reduziertem Ascorbat in den Ascorbatpool erzielen zu können, besitzen Chloroplasten die Möglichkeit, Dehydroascorbat zu rezyklieren. Reduziertes

Glutathion, das in den Chloroplasten in millimolarer Konzentration zu finden ist, reduziert dabei nichtenzymatisch Dehydroascorbat zu Ascorbat bei pH 7 (Foyer, 1993). Diese Reaktion wird von der Dehydroascorbatreduktase (EC 1. 8. 5. 1) katalysiert (Abbildung 19):



**Abbildung 19** Bildung von oxidiertem Glutathion und Ascorbat mittels reduziertem Glutathion und Dehydroascorbatreduktase

Die Methode nach Vanacker et al. (1998) misst die enzymabhängige Extinktionsänderung nach der Zugabe von Ascorbat bei 265 nm.

Die Bestimmung wurde am Spectra max Plus 384 Photometer (Molecular Devices) mit UV durchlässigen Mikrotiterplatten (Greiner) durchgeführt. Die Proben wurden 300 s bei 265 nm und 25°C gemessen. Für den Ansatz wurden in jedes Well 190 µL Puffergemisch und 10 µL Enzym pipettiert (Tabelle 17). Der Extinktionskoeffizient beträgt  $7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

**Tabelle 17** Ansatz für die Dehydroascorbatreduktase-Test

Reagenzien	Pipettiervolumen (µL)
52,6 mM Hepes/KOH pH 7,0	27 000
0,1 mM EDTA	1 000
2,5 mM GSH	1 000
0,2 mM DHA	1 000
Enzym	10

### 2.5.6 Glutathionreduktase-Aktivität

Die Aktivität der Glutathionreduktase (EC 1. 6. 4. 2) wurde nach der von Vanacker et al. (1998) beschriebenen Methode gemessen. Es wird die Reaktion verfolgt, bei der das Enzym Glutathionreduktase die oxidierte Form des Glutathions (GSSG) unter Verbrauch von NADPH zu GSH reduziert. Die Messung verfolgt die Konzentrationsabnahme des verbrauchten NADPH.

Hier wurden für den Ansatz folgende Substanzen (Tabelle 18) verwendet:

**Tabelle 18** Ansatz für den Glutathionreduktase-Test

Reagenzien	Pipettiervolumen ( $\mu\text{L}$ )
Tris/HCl 0,1 mM pH 7,5; 0,1 mM EDTA	9 300
GSSG 10 mM in 0,1 M Tris/HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA	100
NADPH 20 mM in 0,1 M Tris/HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA	100
Enzymextrakt	10

Für die Durchführung dieses Tests wurden 190  $\mu\text{L}$  des Substratgemisches pro Well pipettiert. Die Reaktion wurde danach durch Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  Enzymextrakt gestartet. Die Extinktionsabnahme wurde für 300 s bei 340 nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient beträgt  $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 2.5.7 Katalase-Aktivität

Bei der Bestimmung der Aktivität der Katalase (EC 1. 11. 1. 6) wird die Abnahme von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei 240 nm gemessen. Die Methode ist modifiziert nach Verma et al. (2003).

**Tabelle 19** Ansatz für den Katalase-Test

Reagenzien	Pipettiervolumen ( $\mu\text{L}$ )
100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ Puffer pH 7,0	100
200 mM $\text{H}_2\text{O}_2$	40
Enzymextrakt	10

Das Volumen des Ansatzes (Tabelle 19) beträgt 150  $\mu\text{L}$ , der Extinktionskoeffizient entspricht  $0,036 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Die spezifische Enzymaktivität wird als  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  oxidiert pro min und mg Protein angegeben.

### 2.5.8 Superoxiddismutase-Aktivität

Der in der Arbeit verwendete Test zur Bestimmung der Aktivität der Superoxiddismutase (EC 1. 15. 1. 1) ist nach Polle et al. (1989) modifiziert worden.

Das Prinzip des Tests beruht auf der spontanen Autoxidation des Adrenalins zum roten Adenochrom. Superoxidradikale initiieren die Autoxidation des Adrenalins und halten diese Kettenreaktion in Gang. Superoxiddismutasen (SOD) entfernen die entstehenden Superoxid-

radikale und verzögern die Bildung des Adenochroms. Dies ist ein Maß für die SOD-Aktivität. Die Adenochrombildung wird photometrisch bei 480 nm bestimmt (Kröniger, 1994).

**Tabelle 20** Ansatz für den Superoxiddismutase-Test

Reagenzien	Pipettiervolumen ( $\mu\text{L}$ )
62,5 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ Puffer pH 10,4 125 mM EDTA	790
Katalase	10
Enzymextrakt	100
Adrenalin	100

Die Konzentration der Adrenalinlösung wurde so voreingestellt, dass sich in der Kontrolle bei 480 nm eine Extinktionsänderung von 0,021 pro Minute ergab (Polle et al., 1989). Dazu wurden 25 mg Adrenalin in 30 mL 0,1 N HCl gelöst. Das Endvolumen des Testansatzes betrug 1 mL (Tabelle 20).

Zur Berechnung der SOD Enzymaktivität (in Units) wurde die Extinktionsänderung/min für die Testansätze (v) und die Kontrollen (V) nach der Formel von Beyer & Fridovich (1987) für andere SOD-Tests beschriebene Gleichung,  $\text{Units} = V/v - 1$  benutzt.

Ein Unit SOD-Enzymaktivität ist als die Menge an SOD, die die Bildung des Adenochroms um 50% hemmt, definiert (Kröniger, 1994).

### 2.5.9 Glutathionperoxidase-Aktivität

Die Glutathion-Peroxidase katalysiert die glutathion-abhängige Reduktion organischer Peroxide. In ihrem katalytischen Zentrum befindet sich ein Derivat des Cysteins, das Selenocystein. Um die Aktivität der Glutathionperoxidase (EC 1. 11. 1. 9), die wie die Katalase, die Superoxiddismutase und die Peroxidase zu den Oxidoreduktasen gehört, messen zu können, wurde in der Arbeit die Methode von Dixon et al. (1998) verwendet.

Dazu wird die Abnahme des NADPH bei der Reaktion mit Glutathion und Wasserstoffperoxid als Co-Substrate gemessen. Die dabei entstehenden Produkte sind Glutathiondisulfid (GSSG) und Wasser.

Für den Glutathionreduktase-Ansatz (Tabelle 21) wurden 19,66  $\mu\text{L}$  Glutathionreduktase in 1 mL destilliertem Wasser verdünnt. Das Gesamtvolumen pro Well entsprach 100  $\mu\text{L}$ .

Die Messung wurde für 300 s bei 340 nm in Spectra max plus 384 Photometer (Molecular Devices) durchgeführt. Der Extinktionskoeffizient ist  $6,22 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}^{-1}$ .

**Tabelle 21** Ansatz für den Glutathionperoxidase-Test

Reagenzien	Pipettiervolumen ( $\mu\text{L}$ )
50 mM Phosphat Puffer + EDTA, pH 7,0	50
100 mM GSH	10
Glutathionreduktase aus Bäckerhefe	10
2,5 mM NADPH	10
9 mM $\text{H}_2\text{O}_2$	10
Enzymextrakt	10

## 2.6 Berechnung der Aktivitäten

Das Spektra max Plus 384 Photometer (Molecular Devices) bestimmt Rates ( $\Delta$  Extinktion pro Zeit t) in der Einheit [Milli OD]. Sie müssen mittels des spezifischen Faktors (F) in Mikrokatal ( $\mu\text{kat}$ ) umgerechnet werden (Abbildung 20). Hierzu werden die angegebenen Werte in Milli-OD durch 1000 dividiert.

$$F = V \times 1\,000 / v \times t \times p \times \varepsilon \quad [\mu\text{kat}]$$

V = Endvolumen des Tests in  $\mu\text{L}$   
v = Probenvolumen im Test in  $\mu\text{L}$   
t = Zeit in Sekunden (Rates/ Minuten = 60 s)  
p = Schichtdicke in cm  
 $\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient in  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

**Abbildung 20** Formel zu Berechnung des Spezifischen Faktors, der zur Ermittlung der Enzymaktivitäten für die verschiedenen Substrate eingesetzt wird.

Folgende Enzymaktivitäten können bestimmt werden:

- Volumenaktivität (VA), beschreibt die Enzymaktivität in  $\mu\text{kat}$  pro mL Probe (Abbildung 21):

$$VA = \text{Rates} \times F \quad [\mu\text{kat/mL}]$$

**Abbildung 21** Formel zur Berechnung der Volumenaktivität von Enzymextrakten.

- Spezifische Aktivität (Spez A) bezeichnet die Enzymaktivität bezüglich einer bestimmten Proteinkonzentration (Abbildung 22). Sie bezieht sich auf den Proteingehalt der Probe und auf diese Weise auf die Menge an vorhandenem Enzym. Die Unterschiede in der Einwaage oder die eventuellen Enzymverluste bei der Enzymextraktion werden somit keinen Einfluss auf das Ergebnis haben.

$$\text{Spez A} = \text{VA} / \text{Proteinkonzentration der Probe} \quad [\mu\text{kat}/\text{mg Protein}]$$

**Abbildung 22** Formel zu Berechnung der spezifischen Enzymaktivität.

Die in der Gleichung eingesetzte Proteinkonzentration ist der nach der Methode von Bradford (1976) gemessene Proteingehalt.

- Frischgewichtaktivität (FG A) ist die dritte mögliche Berechnung der Enzymaktivität außer den beiden erwähnten Aktivitäten, die Bezug auf die eingewogene Menge an Pflanzenmaterial nimmt (Abbildung 23). Dies korrigiert die Enzymverluste während der Enzymextraktion und erlaubt Rückschlüsse auf Umwandlungen im Bestandslevel.

$$\text{FG A} = \text{VA} \times (3,5 / \text{Frischgewicht [g]}) \quad [\mu\text{kat}/\text{g FG}]$$

**Abbildung 23** Formel zur Beschreibung der Frischgewichtaktivität.

Der Faktor 3,5 in der Gleichung korrigiert die Verdünnung der Probe während der Entsalzung. Bei diesem Schritt der Aufarbeitung wird das Protein mit 3,5 mL 25 mM Tris/HCl Puffer pH 7,8 eluiert.

## 2.7 Nachweis von Malondialdehyd

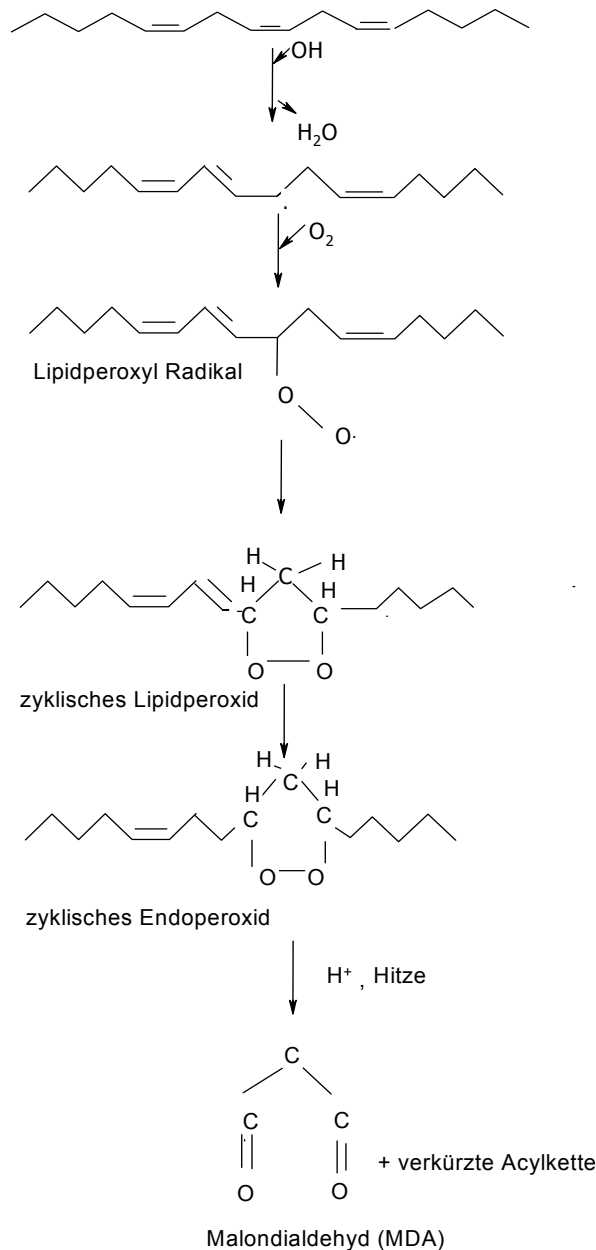
Malondialdehyd (MDA) ist ein Endprodukt der Lipidperoxidation, das aus mehrfach ungesättigten Lipiden entsteht. Im Laufe der Oxidation von Lipidketten mit mehreren isolierten Doppelbindungen entsteht ein Peroxylradikal (Abbildung 24), das zu einem zyklischen Peroxid stabilisiert werden kann, aus dem ein bityklisches Endoperoxid hervorgeht. Bei hohen Temperaturen ( $\sim 100^\circ\text{C}$ ) wird aus den Endoperoxiden Malondialdehyd freigesetzt (<http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/99/99H322/t6.pdf>).

Malondialdehyd kann die Funktionen intrazellulärer Proteine stören. Außerdem führen Lipidhydroperoxide zur Störung der Barrieren-Funktion und weiterer elementarer chemischer und physikalischer Eigenschaften der Zellmembran, in deren Folge die Membranfluidität abnimmt. Zur Bestimmung von MDA wurde die Methode von Mishra et al. (2006) modifiziert.

Ein Gramm frisch gemörsertes Pflanzenmaterial wurde mit 10 mL 0,1% Trichloressigsäure (TCA, Fluka) versetzt. Das Homogenat wurde fünf Minuten bei 10 000 x g zentrifugiert. Ein Milliliter des Zentrifugats wurde mit 4 mL 0,5% Thiobarbitursäure (TBA, Fluka) und 20% TCA versetzt. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 95°C im Wasserbad (GFT), danach ein Abkühlen im Eisbad.

Die abgekühlte Probe wurde durch Mira cloth filtriert und danach für 5 min bei 10 000 x g in der 25 JA Zentrifuge (Beckman Coulter) zentrifugiert.

Die Photometermessung wurde bei 532 nm und 600 nm am Spektralphotometer (Beckman Coulter 740) durchgeführt. Der Blank enthielt 0,5% Thiobarbitursäure und 20% TCA.



**Abbildung 24** Entstehung von Malondialdehyd aus mehrfach ungesättigten Lipiden.  
(<http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/99/99H322/t6.pdf>)

Für die Auswertung wurden die Photometerwerte bei 600 nm von denen bei 532 nm abgezogen. Das Ergebnis wurde geteilt durch den Extinktionskoeffizienten ( $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) und mal  $(1\ 000/0,6) \times 10 \times 8$  genommen, um alle Verdünnungsfaktoren einzubeziehen (Abbildung 25). Die Einheit beträgt:  $\mu\text{mol/g FG}$ .

$$C = B \times (D/F) \times G \times H \quad [\mu\text{mol/g FG}]$$

**Abbildung 25** Berechnung der Malondialdehydkonzentration.

A = Ergebnis bei 532 nm - Ergebnis bei 600 nm  
 B = A/155 ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )  
 D = Faktor um auf 1 000 hochzurechnen  
 F = 600  $\mu\text{L}$  in der Küvette  
 G = 10 mL 0,1% TCA (Verdünnungsfaktor)  
 H = 8 mL 20% TCA + 0,5% TBA (Verdünnungsfaktor)

## 2.8 Pigmentanalyse

Chlorophylle und Carotinoide sind fettlöslich und können aus Pflanzenproben mit organischen Lösungsmitteln isoliert werden. Die verwendete Methode stammt von Lichtenthaler (1987).

Gefrorenes Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und 1 g davon wurde mit 3 mL 90% Methanol im Zentrifugenröhrchen versetzt. Dieser Ansatz wurde dann über 30 min im Kühlschrank inkubiert und abdekantiert. Zum Pellet wurden wiederum 3 mL 90% Methanol pipettiert und weitere 30 min im Kühlschrank inkubiert. Beide Überstände wurden dann vereinigt und 10 min bei 4 000 x g zentrifugiert.

Ein Milliliter der Pigmentextrakte wurde in Plastikkuvetten am Spektralphotometer (Beckman Coulter 740) mit Endpunktmessung gemessen (Lichtenthaler, 1987). Es wurden drei Messungen von jeder Küvette bei 662,2 nm, 652,4 nm und 470 nm durchgeführt. Die Umrechnung der Konzentrationen in  $\mu\text{g}$  Pigment/g Frischgewicht ist lösungsmittelspezifisch und wird bei Extraktion mit 90% Methanol nach den von Lichtenthaler (1987) angegebenen Formeln (Abbildung 26) berechnet:

$$\begin{aligned} C_a &= 16,82 A_{665,2} - 9,28 A_{652,4} \\ C_b &= 36,92 A_{652,4} - 16,54 A_{665,2} \\ C_a + C_b &= 0,28 A_{665,2} + 27,64 A_{652,4} \\ C_{x+c} &= (1000A_{470} - 1,91C_a - 95,15 C_b) / 225 \end{aligned}$$

**Abbildung 26** Formeln zur Berechnung von Pigment- und Carotinoidgehalten. Abkürzungen:  $C_a$  - Chlorophyll a,  $C_b$  - Chlorophyll b,  $C_a + C_b$  - gesamt Chlorophyll und  $C_{x+c}$  - gesamte Carotinoide.



## 2.9 Affinitätschromatographie

Bei dieser Methode wird die Affinität des zu isolierenden Enzyms zu seinem Substrat genutzt. Abhängig davon, welche Proteine isoliert werden sollen, werden spezielle Gelmatrices benutzt, an denen spezifische Substrate gebunden sind. In der vorliegenden Arbeit wurde eine über Spacer mit GSH Schwefel-gebundene Agarose-Matrix (GSH-Agarose) verwendet, um glutathionabhängige Enzyme zu reinigen. Die gebundenen Proteine wurden mit einer hohen Konzentration an freiem GSH (Puffer C, Tabelle 22) eluiert, das um die SH-Gruppen konkurriert und dabei die Proteine ablöst.

Die Methode ist nach Pascal et al. (1998) modifiziert worden. Die Affinitätschromatographie wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, während die Eluate der einzelnen Proben in Fraktionen von 1 mL auf Eis gelagert wurden. Die Säulen wurden vor Gebrauch mit dem fünffachen Volumen an Puffer B (Tabelle 22) gespült. Anschließend wurde je 1 mL der Proben auf die Säulen aufgetragen.

**Tabelle 22** Pufferzusammensetzung und Puffervorbereitung für salzlose Affinitätschromatographie

Puffersystem	Zusammensetzung
A	0,2 M Tris/HCl pH 7,8; 1 mM EDTA; 5 mM DTT
B	0,5 M Tris/HCl pH 7,8; 1 mM EDTA; 1 mM DTT
C	0,2 M Tris, 1 mM EDTA; 20 mM GSH

Die Elution des Extrakts wird nach dem folgenden Schema (Tabelle 23) durchgeführt:

**Tabelle 23** Enzymextrakt Elutionsschema

1 = B	8 = A	15 = C	22 = A
2 = B	9 = C	16 = C	23 = B
3 = B	10 = C	17 = C	24 = B
4 = B	11 = C	18 = C	25 = A
5 = A	12 = C	19 = B	26 = A
6 = A	13 = C	20 = B	
7 = A	14 = C	21 = A	

Die einzelnen Fraktionen wurden in 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen gesammelt und ihre Enzymaktivität für die Konjugation des Modellsubstrats CDNB sowie ihre Proteinaktivität bestimmt. Danach wurden die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die GSH-Agarose-Affinitätssäulen wurden mit 20 mL 0,1 M Borat Puffer, pH 8-9; 0,5 M NaCl gewaschen, gefolgt von 20 mL destilliertem Wasser und des Weiteren mit 20 mL 0,1 M Acetat Puffer, pH 4; 0,5 M NaCl gespült. Es folgte eine zweite Spülung mit destilliertem Wasser. Die kurzzeitige Lagerung der Säulen erfolgte in 1 M NaCl bei  $4^{\circ}\text{C}$ , die Langzeitlagerung in 1 M NaCl, 20% Ethanol bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

Alle nach der Affinitätschromatographie gesammelten Enzymfraktionen wurden mit Hilfe der IVSS Vivapore 2 Concentrator, PES Membran (Sigma-Aldrich) konzentriert. Die Lösungsmittel und Moleküle  $<10\text{kDa}$  wurden von einem Absorbens mit hoher Kapazität durch eine Membran gezogen. Die integrierte Dead-Stop-Funktion verhinderte, dass die Probe zu stark aufkonzentriert wurde. Wenn das gewünschte Volumen von 2 mL erreicht war, wurde das Konzentrat mit einer Pasteur-Pipette abgezogen. Im nächsten Schritt wurde mit diesen konzentrierten Proben weiter gearbeitet.

## 2.10 Fast Protein Liquid Chromatography

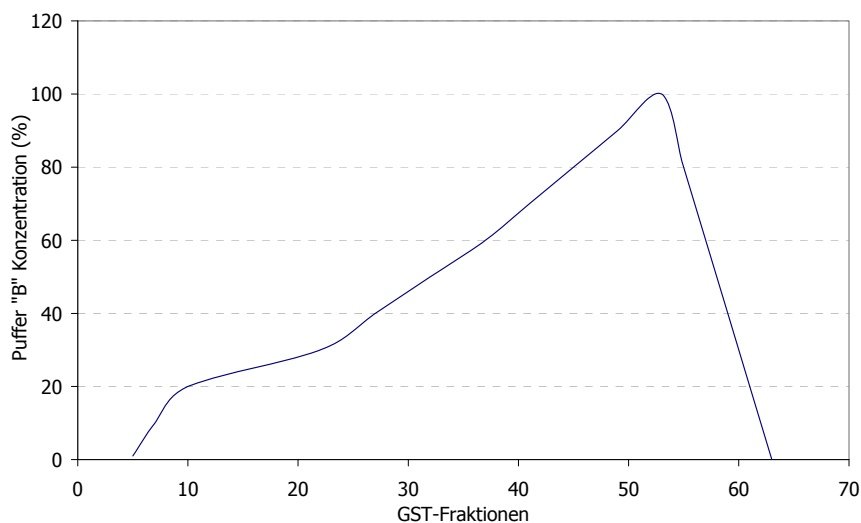
Die Ionenaustauschchromatographie gehört zu den Methoden der Säulenchromatographie, bei der die Trennung der Moleküle nach der Ladung stattfindet. Die Säulenmatrix kann positiv (Anionenaustauscher) oder negativ (Kationenaustauscher) geladen sein. Die Proteinprobe wird in einer Lösung mit möglichst niedriger Eigenladung aufgebracht, um die Bindung nicht zu stören.

**Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)** wurde in der vorliegenden Arbeit mittels einer Mono Q Econo-Pac Kationenaustauscher-Säule (BIO RAD) und in der Tabelle 24 Puffersysteme durchgeführt. Ihre dynamische Bindungskapazität ist  $>170\text{ mg BSA}$ . Der Partikeldurchmesser beträgt  $50\text{ }\mu\text{m}$  und die Größe der Poren  $1\text{ }000\text{ \AA}$ .

**Tabelle 24** Puffersysteme für die Durchführung eines Mono Q-FPLC-Laufs

Puffer	Zusammensetzung
Puffer A	20 mM Tris/HCl pH 7,8 + 2 mM DTE
Puffer B	20 mM Tris/HCl pH 7,8 + 2 mM DTE + 1 M NaCl
Aufbewahrungspuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0 + 0,1 M NaCl + 0,05% $\text{NaN}_3$

Vor dem ersten Lauf wurde die Säule nach Anleitung des Herstellers mit leicht und danach mit stärker konzentriertem Laufpuffer eine halbe Stunde gespült.



**Abbildung 27** Verlauf der Puffer „B“-Konzentrationen während des Mono Q FPLC Laufs

Danach wurde die Anlage für 5 min mit Puffer A, gefolgt von Puffer B und zum Schluss für 10 min mit Puffer A (jeweils mit einer Flussrate von 6,5 mL) gewaschen (Tabelle 24). Zwei Milliliter der durch Affinitätschromatographie gereinigten Proben wurden mit einer Spritze in die Probenschleife der Anlage aufgetragen. Nach dem Starten des Laufs wurde die Probe in den Laufmittelstrom eingeschleust (Abbildung 27). Fraktionen von 1 mL Volumen wurden gesammelt und für die Bestimmung von Proteingehalt und GST-Aktivität gekühlt aufbewahrt.

### 2.11 HPLC-Methode zur Bestimmung von GST-Untereinheiten

Für die Untersuchung der GST-Untereinheiten wurde die Reversed-Phase-Chromatographie-Methode nach Fischer (1997) und Daubner (2001) verwendet. Als hydrophobe stationäre Phase diente dabei eine C-18-Kieselgel-Säule (Vydac, Protein & Peptide C-18). Die Säule besteht aus Kieselgel-Partikeln, deren Oberfläche mit über Silylether verbundenen Kohlenwasserstoffketten besetzt ist (Daubner, 2001).

Die mobile Phase war aus einem Laufmittel A (100% Acetonitril + 0,1% Trifluoressigsäure) und einem Laufmittel B (destilliertes Wasser + 0,1% Trifluoressigsäure) zusammengesetzt. Beide Laufmittel wurden vor dem Gebrauch über 15 min entgast.

Tabelle 25 stellt den einstündigen Gradientenverlauf dar.

Proteinextrakte von je 40 µL Volumen wurden mit Hilfe eines Autosamplers injiziert. Die Flussrate betrug 1mL/min. Die Extinktion des Eluats wurde mit einem UV/VIS-Detektor bei 220 nm gemessen.

**Tabelle 25** Gradientenverlauf für die GST-HPLC-Methode

Minuten	Laufmittel A	Laufmittel B
0-10	35%	65%
10-15	40%	60%
15-40	50%	50%
40-50	75%	25%
50-60	35%	65%

### 2.12 Blattflächenbestimmung von *Typha latifolia*

Am Ende des Langzeitversuchs wurde die Blattfläche der fünf innersten *Typha latifolia* Blätter aller im Versuch behandelten Pflanzen mittels eines  $\Delta T$  Area Meters (Delta T Devices) gemessen. Die Kamera des Blattflächenbestimmungsgerätes (RCA-Ernitec) ist mit einer 25 mm, F 8,1 mit TV Linse ausgerüstet. Nach dem Scannen wurde das FG der Blätter und nach 48 h Trocknung im Trockenschrank (Memmert) bei 65°C auch ihre Trockenmasse bestimmt.

### 2.13 Blattzahlbestimmung von *Typha latifolia*

Es wurde die Blattzahl aller behandelten *Typha latifolia* Pflanzen am ersten Tag der Cd Behandlung und danach alle 10 d im Verlauf des Versuchs bestimmt. Die letzte Blattzahlbestimmung wurde am Tag der Ernte durchgeführt. Es wurde die Zahl aller Blätter vor und nach der Behandlung bestimmt.

### 2.14 Bestimmung von Frisch- und Trockengewicht von *Typha latifolia*

Die *Typha latifolia* Pflanzen, die mit Cd über 72 d behandelt wurden, wurden nach der Ernte im frischen Zustand abgewogen. Die einzeln geernteten Blätter und Rhizome wurden danach im Trockenschrank (Memmert) bei 65°C über 48 h getrocknet. Nach der Trocknung wurde die Trockenmasse der Blätter und der Rhizome bestimmt. Unter den frischen *Typha latifolia* Blättern haben sich auch solche gefunden, die schon vertrocknet waren. Die Gruppe dieser weniger frischen Blätter wurde extra im frischen und trockenen Zustand abgewogen. Dieses Gewicht wurde aber in das Gesamtgewicht der *Typha latifolia* Pflanzen mit einbezogen.

## 2.15 Schwermetallbestimmung

### 2.15.1 Schwermetalle in *Typha latifolia*

Die Schwermetallkonzentrationen wurden mit der von Michalke et al. (2002) beschriebenen Methode bestimmt. Ein Gramm der bei -80°C gelagerten *Typha latifolia* Proben (Blatt und Rhizom) wurde im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz über Nacht getrocknet. Mit 0,1 g der getrockneten Proben wurde der so genannte Druckaufschluss durchgeführt. Hierzu wurden die Proben in Quarzaufschlussgefäße eingefahren. Es folgte die Zugabe von 1 mL HNO<sub>3</sub> sowie 100 µL HCl (32%) (jeweils Merck). Die Aufschlussgefäße wurden in ein Druckaufschlussystem (Seif) gestellt und für 10 h bei 180°C erhitzt. Die klare Aufschlusslösung wurde auf 5 mL mit entionisiertem Wasser (18 Mega-Ohm) aufgefüllt. Die anschließende Elementenbestimmung (Tabelle 26) erfolgte mit dem Atomemissionsspektrometer Typ JY 70 + (Jobin Yvon, Instruments SA) mit induktiv gekoppeltem Argonplasma als Anregungsquelle. Die Probenzufuhr erfolgte mittels einer peristaltischen Pumpe (1,5 mL/min; Abimed), die mit einem Meinhard-Zerstäuber und einer Zyklon-Zerstäuber kammer verbunden war.

**Tabelle 26** Emissionslinien der einzelnen Elemente:

Emissionslinie	Wellenlänge (nm)
Cadmium (Cd)	214,438
Arsen (As)	189,042
Blei (Pb)	220,353

Der Plasmagasstrom betrug 15 L Ar/min, der Zersträubergasstrom 0,6 L Ar/min. Nach 10 Messungen erfolgten drei Kontrollmessungen ohne Probenzufuhr (Blindwerte) sowie eine Messung eines zertifizierten Standards der einzelnen Elemente Cadmium, Arsen und Blei. Die verwendeten Standards (CPI) und die Metalle hatten Konzentrationen von 1 000 mg/L.

Die Berechnung der Endergebnisse erfolgte anhand von Kalibriergeraden und des Labor-daten-Management-Systems ELANA (Thinking Instruments). Die Ergebnisse der Blindwertbestimmungen und Kontrollstandards wurden in das Ergebnis mit einbezogen.

### 2.15.2 Schwermetalle in *Helianthus annuus* und *Nicotiana tabacum*

Die Schwermetallgehalte in den Sonnenblumen und im Tabak wurden nach der gleichen Methode wie bei *Typha latifolia* bestimmt. Die Metallgehalte in den Pflanzen zum Zeitpunkt der Ernte (Tabelle 27 und 28) wurden von E. Nehnevajova im Rahmen ihrer Dissertation bestimmt und sind hier tabellarisch aufgelistet (Herzig & Nehnevajova, 2006).

**Tabelle 27** Schwermetallgehalte und Extraktionsgehalte in Sonnenblumenmutanten (SBM) der IBL 04 und der Hybride Salut, geerntet auf dem Versuchsfeld Rafz (Schweiz), bezogen auf das Trockengewicht (TG). Die Metallgehalte sind in mg/Kg TG angegeben und die Extraktion in mg/Pflanze (mg/Pfl). Bei den mit n.g gekennzeichneten Proben wurde keine Metallkonzentration und Metallextraktion bestimmt. Die Daten stammen von Nehnevajova (2006).

M3 SBM	TG (g)	Cd (mg/Kg TG)	Cd Extraktion (mg/Pfl)	Zn (mg/Kg TG)	Zn Extraktion (mg/Pfl)	Pb (mg/Kg TG)	Pb Extraktion (mg/Pfl)
Sonnenblumenmutanten der IBL 04							
Kontr. IBL 04	54,9	1,2	0,065	636,4	34,938	3,6	0,197
6/14-185-04	194,6	0,96	0,187	476,8	92,78	3,68	0,72
17/14-185-04	196,5	1,04	0,204	260,16	51,121	6,32	1,241
14/3-185-04	161,1	1,2	0,167	270,72	37,846	2,16	0,301
20/3-185-04	139,8	0,96	0,211	236	51,872	1,44	0,316
1/3-185-04	219,8	0,8	0,143	233,92	41,988	1,52	0,272
12/3-185-04	179,5	1,04	0,260	261,68	65,254	2,16	0,540
11/11-185-04	n.g	n.g	n.g	n.g	n.g	n.g	n.g
18/11-185-04	135,5	0,96	0,151	461,2	72,823	1,76	0,277
4/11-185-04	152,6	0,8	0,116	285,28	41,707	1,84	0,269
8/11-185-04	n.g	n.g	n.g	n.g	n.g	n.g	n.g
2/2-185-04	69,5	0,96	0,040	281,92	11,868	2,8	0,117
13/2-185-043	146,2	0,88	0,065	328,96	24,573	1,84	0,137
14/8-185-04	145,2	0,8	0,062	167,68	13,129	2,16	0,169
26/8-185-04	82	0,88	0,084	257,76	24,641	1,68	0,160
2/35-190-04	56,3	1,28	0,072	536,8	30,221	4,32	0,197
7/35-190-04	232,7	0,88	0,204	618,4	143,901	9,6	2,233
3/50-190-04	144,6	1,12	0,132	220,32	26,107	1,68	0,199
12/50-190-04	137,5	1,04	0,156	279,92	42,015	1,92	0,288
7/67-190-04	32,9	1,04	0,065	247,6	15,598	2,72	0,171
10/67-190-04	63	1,04	0,174	235,76	39,489	2,96	0,495
8/2-110-04	195,9	0,96	0,165	187,84	30,167	0,96	0,154
16/2-110-04	155,3	1,12	0,220	220,96	43,529	1,04	0,204
Sonnenblumenmutanten der Hybride Salut							
Kontr. Salut	44,5	1,19	0,067	175,72	10,120	2,32	0,125
9/64-19-S	66,8	1,2	0,071	234,32	14,012	2,24	0,133
13/64-19-S	167,5	1,12	0,046	262,24	10,778	2,4	0,098
2/81-19-S	n.g	n.g	n.g	n.g	n.g	n.g	n.g
11/81-19-S	40,5	1,12	0,073	256,4	16,896	3,84	0,253
6/55-19-S	65,9	1,04	0,064	161,76	9,996	1,52	0,093
10/55-19-S	61,8	1,04	0,049	134,96	6,464	1,12	0,053

**Tabelle 28** Schwermetallgehalte und Extraktionsgehalte in Tabak, geerntet auf dem Versuchsfeld in der Ostschweiz, bezogen auf das Trockengewicht (TG). Die Metallgehalte sind in mg/Kg TG angegeben und die Extraktion in mg/Pflanze (mg/Pfl). Die Daten stammen von Nehnevajova (2006).

Tabakklonen	TG (g)	Cd (mg/Kg TG)	Cd Extraktion (mg/Pfl)	Zn (mg/Kg TG)	Zn Extraktion (mg/Pfl)	Pb (mg/Kg TG)	Pb Extraktion (mg/Pfl)
1/BAG 2AS	792	1,44	1,14	295,2	233,79	2,56	2,02
3/BAG 1.5AN+1.5AS	861	1,6	1,37	583,2	502,13	3,68	3,16
NBCu 10-8 F1 2AN	333	1,76	0,58	394,08	131,07	2,8	0,93
1/NBCu 10-8 F1 1AN+1AS	809	1,6	1,29	254,88	206,19	3,2	2,58
3/NBCu 10-8 F1 1AN+1AS	798	1,44	1,14	306,72	244,76	3,36	2,68
4/NBCu 10-4 F1 2AN	726	1,36	0,98	222,8	161,75	2,88	2,09
1/NBCu 10-4 F1 1AN+1AS	476	1,28	0,60	228,8	108,9	3,36	1,59
1/NBCu 10-4 F1 WT	217	1,04	0,22	146,08	31,69	2,56	0,55
FoP 1AN+1AS	503	1,6	0,80	276,48	139,12	2,88	1,44
3/NFCu 7-15 F1 2AS	622	1,04	0,64	95,36	59,31	4,24	2,63
3/NFCu 7-15F1 1,5AN+1,5AS	716	1,52	1,08	249,68	178,77	3,2	2,29
2/NFCu 7-15 F1 1AN+1AS	651	1,04	0,67	179,28	116,71	5,2	3,38
2/NFCu 7-19 F1 2AN	216	1,2	0,25	157,76	34,07	3,68	0,79
2/NFCu 7-19F1 1,5AN+1,5AS	660	1,04	0,68	206,8	136,48	3,52	2,32

### 2.16 Thiolbestimmung mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die Thiolbestimmung wurde nach Siller-Cepada et al. (1991) durchgeführt. Dazu wurde jeweils ein halbes Gramm gefrorenes Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff gemörsert, in Potter-Elvehjem-Homogenisatoren mit 2 mL 10% PCA (Perchlorsäure, Fluka), 1 mM BPDS (Bathophenanthrolin-disulfonsäure, Fluka) versetzt und bis zur Feinpulverisierung gemörsert (Tabelle 29). Anschließend wurden die Proben 10 min bei 10 000 x g zentrifugiert (JA 25, Beckman Coulter). Der Überstand wurde dekantiert und auf Eis gelagert. Das Pellet wurde mit 2 mL 10% PCA, 1 mM BPDS versetzt und erneut gepottert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min bei 10 000 x g) wurden die Überstände vereinigt und auf Eis gelagert. Diese Prozedur wurde ein drittes Mal wiederholt. Danach wurde das Gesamtvolumen des Überstands zur späteren Umrechnung der Thiolgehalte bestimmt. Je zweimal 2 mL des Überstands wurden in Mikrozentrifugenröhrchen bei -80°C gelagert. Weitere 0,5 mL wurden mit 50 µL 0,5 mM Gamma-Glu-Glu und 50 µL 100 mM Iodoacetsäure (Sigma), gelöst in 0,2 mM m-Cresol-Purpur (Aldrich) pipettiert, vorsichtig geschüttelt und gevortext.

Diesem Schritt folgte die Zugabe von 480 µL 2 M KOH-2,4 M KHCO<sub>3</sub>-Lösung. Nachdem das Gas aus den Mikrozentrifugenröhrchen entwichen war, wurden diese verschlossen, gevortext und 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den insgesamt 1 080 µL Ansatz wurden nun weitere 1 000 µL 1% DNFB (2,4-Dinitro-fluorobenzol; Sanger´s reagent, Sigma) in EtOH abs. pipettiert. Abschließend folgte eine 16 h Inkubation im Dunkeln bei 4°C.

Am nächsten Tag wurden die Proben für 15 min bei 10 000 x g zentrifugiert (Microfuge Life Centrifuge, Beckman Coulter).

**Tabelle 29** Aufarbeitungslösung für die HPLC

Lösung	Zu jeder Probe sind zu pipettieren (µL)
10% PCA, 1 mM BPDS Puffer	2 000
0,5 mM Gamma-Glu-Glu	50
100 mM Iodoacetsäure in 0,2 mM m-Cresol-Purpur	50
2 M KOH-2,4 M KHCO <sub>3</sub>	480
1% DNFB	1 000

Ein mL des Überstands wurde in ein 1,5 mL Messvial (WiCom) pipettiert, nachdem es durch Rotilabo Spritzenfilter (Nylon, 13 mm Durchmesser, 0,45 µm Porengröße, Roth) filtriert worden war.



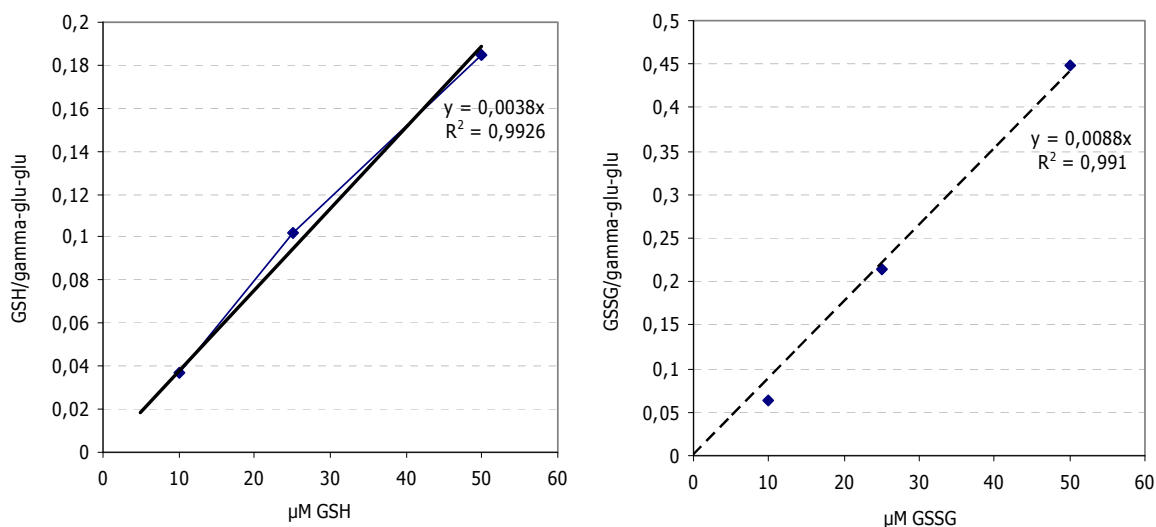
Für die HPLC-Messung wurden jeweils 40 µL des Filtrats auf eine 3-Aminopropyl-Sherisorb-Säule mit Vorsäule (beides Gamma Analysen) gegeben. Die Detektion der Dinitrophenol-derivate wurde bei 365 nm auf einer Varian HPLC mit UV/Vis Detektor durchgeführt.

**Laufmittel für die HPLC:** Für die Trennung wurde ein Gradientensystem verwendet. Laufmittel „A“ bestand aus 80% Methanol, Laufmittel „B“ enthielt 64% Methanol, 10% Essigsäure, 0,5 M Natriumacetat und destilliertes Wasser (Tabelle 30). Beide Laufmittel wurden vor Gebrauch filtriert (Steritop Aufsatzfilter, 0,22 µm, Roth) und entgast (Bandelin Sonorex Super RK 510).

**Tabelle 30** Gradienten für die HPLC Läufe

Laufmittel A (in %)	Laufmittel B (in %)	Zeit (in min)
80	20	0.00
80	20	5.00
1	99	20.00
0	100	5.00
80	20	5.00
80	20	5.00

**Standards:** Für die Kalibrierung wurden GSSG und GSH Standards in Konzentrationen von 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 µM verwendet. GSSG und GSH wurden in 10% PCA, 1 mM BPDS gelöst. Die Standards (Abbildung 28) wurden wie die Pflanzen-Proben mit den Puffern gehandhabt.



**Abbildung 28** Kalibriergeraden zur Quantifizierung von GSH (links) und GSSG (rechts).

### 2.17 Bestimmung der Photosynthese und der Transpiration von *Typha latifolia*

Nach 36 d (Mitte der Behandlung) und 72 d (Ende der Behandlung) der Cd Behandlung von *Typha latifolia* wurden die Photosynthese wie auch die Transpirationsraten aller behandelten Pflanzen mit einem Portable Photosynthesis System HCM 1 000 (Walz Mess- und Regeltechnik) mit einer Küvette von (Walz Mess- und Regeltechnik) gemessen.

Zur Photosynthese-Messung war die Messküvette auf die folgenden Bedingungen eingestellt: 25°C, PAR 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  und 50% relative Luftfeuchtigkeit.

Für die Nettophotosynthese- und Transpirationsbestimmung müssen  $\text{CO}_2$ - und  $\text{H}_2\text{O}$ -Konzentrationen ermittelt werden.  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  besitzen spezifische Absorptionsbanden im Infrarotbereich. Auf dieser Eigenschaft beruht das Messprinzip von Infra-Rot -Gas-Analysatoren (IRGA), mit denen sich  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  Konzentrationen in einem Luftraum erfassen lassen. In diesem Gerät eingebaute Analysatoren sind vom Typ BINOS-100/4PS. Der BINOS-100/4PS liefert ein Differenzmesssignal, aus dem sich bei zeitlicher Betrachtung die Messlinie ergibt.

Die Küvette erfasste 5  $\text{cm}^2$  der untersuchten Blätter. Folgende Parameter fließen in die Auswertung der Photosynthese- und Transpirationsraten ein (Heinz Walz GmbH, 1996):

$c_e$  =  $\text{CO}_2$  Eingangskonzentration

$T_{\text{leaf}}$  = Blatttemperatur

$c_o$  =  $\text{CO}_2$  Ausgangskonzentration

$u_e$  = Durchsatz am Messküvetteneingang

$\Delta \text{CO}_2$  =  $\text{CO}_2$  Differenz Ein- und Ausgang

$u_o$  = Durchsatz am Messküvettenausgang

LA = Bezugsgröße (5  $\text{cm}^2$ )

$w_e$  =  $\text{H}_2\text{O}$  Eingangskonzentration

PAR = Photosynthetisch aktive Strahlung

$w_o$  =  $\text{H}_2\text{O}$  Ausgangskonzentration

RH = relative Feuchte

$\Delta \text{H}_2\text{O}$  =  $\text{H}_2\text{O}$  Differenz Ein- und Ausgang.

$T_{\text{cuv}}$  = Temperatur in der Küvette

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der *Typha latifolia*-Versuche

##### 3.1.1 In vivo Behandlung von *Typha latifolia* mit Cadmium, Arsen und Blei über 72 Stunden

###### 3.1.1.1 Metallgehalte in *Typha latifolia* nach der Behandlung

Zur 72stündigen Behandlung von *Typha latifolia* wurden drei Schwermetalle in vier Konzentrationen verwendet: CdSO<sub>4</sub> und Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> in Konzentrationen von 10 µM, 50 µM, 100 µM und 250 µM und PbCl<sub>2</sub> in den Konzentrationen von 10 µM, 50 µM und 250 µM (Tabelle 31). Die Behandlungen wurden, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, unter Gewächshausbedingungen durchgeführt. Am Ende der Behandlung konnten in den Pflanzen folgende Metallkonzentrationen mittels ICP-AES festgestellt werden:

**Tabelle 31** Schwermetallgehalte in *T. latifolia* nach 72stündiger Behandlung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM und 250 µM Cd und As, sowie 10 µM, 50 µM und 250 µM Pb sowie Kontrollen. Für Arsenat und Blei liegen keine Messwerte aus den Blättern vor. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung zwischen drei parallel behandelten und unabhängig geernteten Proben. Mit „n.g“ ist „nicht gemessen“ gekennzeichnet.

Cadmium-Konzentration im Gießwasser	Konzentration in Rhizomen mg/Kg TG	Konzentration in Blättern mg/Kg TG	Gesamtkonzentration mg/Kg TG	Blatt/Rhizom-Verhältnis	Prozent Anreicherung in Blättern
Kontrolle	0,0414±0,01	0,016±0,01	0,06	0,39	27,87
10 µM Cd	24,2±5,05	0,913±0,51	25,1	0,04	3,64
50 µM Cd	181,66±86,85	2,367±2,83	185,17	0,01	1,28
100 µM Cd	n.g	3,51±0,83	n.g	n.g	n.g
250 µM Cd	271,67±28,72	6,09±6,41	277,76	0,02	2,19
Arsenat-Konzentration im Gießwasser	Konzentration in Rhizomen mg/Kg TG			Bleichlorid-Konzentration im Gießwasser	Konzentration in Rhizomen mg/Kg TG
Kontrolle	4,55±1,03			Kontrolle	0,851±0,3
10 µM As	21,80±6,24			10 µM Pb	97,76±46,83
50 µM As	34,20±12,24			50 µM Pb	319,43±240
100 µM As	n.g			n.g	n.g
250 µM As	56,5±19,48			250 µM Pb	1046±91

Man sieht deutlich einen Zusammenhang zwischen der Metalldosierung über das Medium und der Anreicherung in Rhizomen, die im Fall von Bleichlorid überproportional scheint. Die Aufnahme des Cadmiums in den Blättern ist im Verhältnis dazu relativ gering.

### **3.1.1.2 Pigmentanalyse der *Typha latifolia*-Pflanzenproben nach 72stündiger Cd-Behandlung**

Die drei Schwermetalle verursachten sehr interessante und konzentrationsabhängige Effekte auf die Chlorophyll a-Konzentrationen in den Blättern von *T. latifolia* (Tabelle 32). Sowohl nach der Cd-Behandlung als auch nach der As-Behandlung wurden bis zur Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  höhere Chlorophyll a-Konzentrationen in den Kontrollen gemessen. Bei der 100  $\mu\text{M}$  Cd- und As-Behandlung war ein deutliches Minimum festzustellen. Bei der Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd wurde ein Wert von 5,70  $\mu\text{g/g}$  FG und bei der Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Cd 21,31  $\mu\text{g/g}$  FG erreicht. Nach der Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  As verringerte sich der Chlorophyll a-Gehalt bis auf 4,62  $\mu\text{g/g}$  FG. Der Chlorophyll a-Wert der Kontrolle lag dagegen bei 7,31  $\mu\text{g/g}$  FG. Die nächst höheren Cd- und As-Konzentrationen hatten bei gleichen Versuchsbedingungen kaum Einfluss auf Chlorophyll a. Daher waren Werte von 19,53 und 24,41  $\mu\text{g/g}$  FG bestimmt worden.

Nach den Pb-Behandlungen wurden die gleichen Effekte beobachtet. In diesem Fall war die niedrigste Chlorophyll a-Konzentration bei der Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Pb zu messen: 16,29  $\mu\text{g/g}$  FG.

Die beschriebene Abnahme des Chlorophyll a-Gehalts bei der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Cd und As kann auch bei dem Chlorophyll b und somit ebenso beim Gesamtchlorophyll verfolgt werden. Bei der Bestimmung der Carotinoide in den schwermetallbehandelten Proben von *Typha latifolia* konnten ebenfalls drastische Änderungen der Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  Cd und As beobachtet werden.

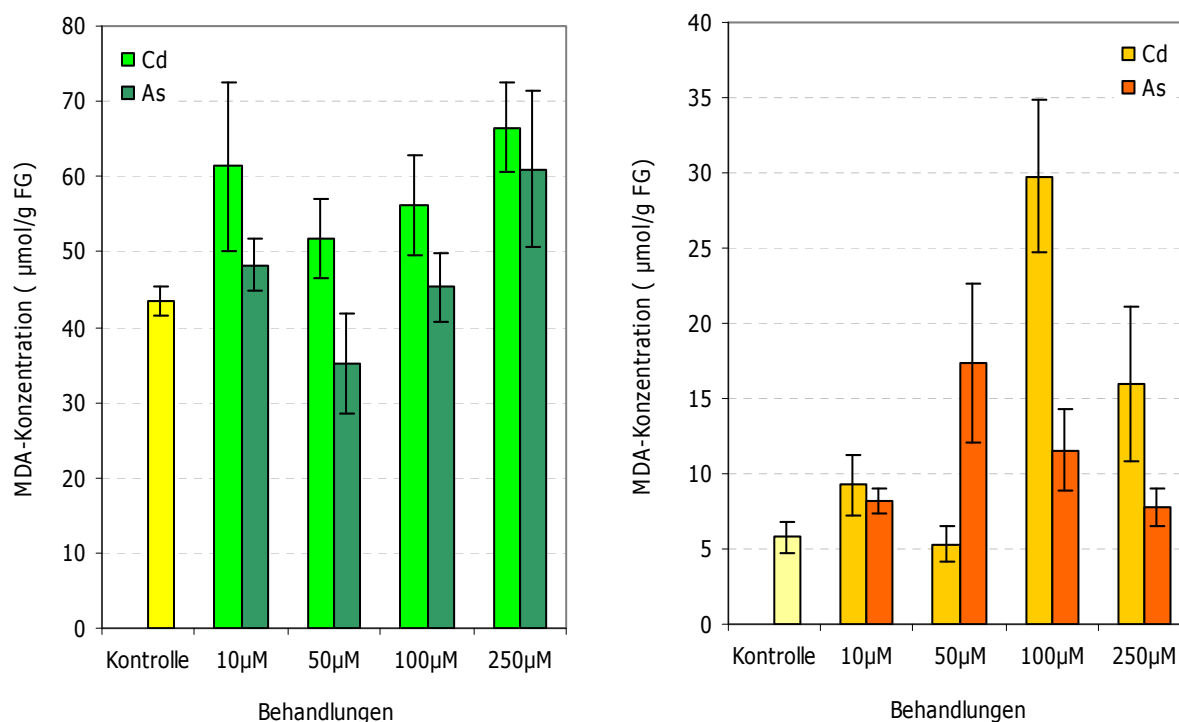
**Tabelle 32** Pigmentanalyse der *T. latifolia*-Pflanzenproben nach 72stündiger Behandlung mit Cd, As und Pb. Jeder Wert repräsentiert drei unabhängige Messungen einer Probe mit drei Replikaten und deren Standardabweichung. Chlorophyll a+b repräsentiert den Gesamtchlorophyllgehalt, das a/b-Verhältnis stellt die Beziehung Chlorophyll a zu Chlorophyll b dar und das a+b/x+c-Verhältnis die Beziehung zwischen dem Gesamtchlorophyll und den Carotinoidegehalt. Die Konzentrationen sind in  $\mu\text{g/g}$  FG angegeben.

	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Chlorophyll a+b	Carotinoide (Cx+c)	a/b	a+b/x+c
Kontrolle	7,31±0,9	6,47±1,03	13,79±1,32	4,79±1,10	1,13	2,88
10 $\mu\text{M}$ Cd	11,10±5,58	7,9±3,82	19,09±9,40	6,46±3,76	1,39	2,95
50 $\mu\text{M}$ Cd	21,31±4,48	13,25±3,27	34,57±7,63	6,93±0,21	1,61	4,99
100 $\mu\text{M}$ Cd	5,70±1,09	5,82±0,62	11,53±1,74	1,574±0,55	0,98	7,33
250 $\mu\text{M}$ Cd	19,53±3,9	11,30±2,09	30,84±5,97	10,53±0,72	1,72	2,93
10 $\mu\text{M}$ As	19,66±1,57	11,54±6,17	31,19±7,73	7,013±3,27	1,70	4,45
50 $\mu\text{M}$ As	21,07±4,11	11,22±1,81	32,30±5,84	8,30±2,013	1,88	3,89
100 $\mu\text{M}$ As	4,62±3,21	6,06±0,93	10,68±2,83	0,94±0,18	0,76	11,29
250 $\mu\text{M}$ As	24,41±8,11	18,50±4,96	42,92±9,87	6,45±3,60	1,32	6,65
10 $\mu\text{M}$ Pb	21,34±6,8	13,13±4,73	34,48±10,48	8,05±0,74	1,62	4,28
50 $\mu\text{M}$ Pb	16,29±7,84	9,69±4,09	25,9±11,91	7,34±3,15	1,68	3,54
250 $\mu\text{M}$ Pb	21,10±2,05	12,96±1,81	34,07±3,66	7,87±0,82	1,63	4,33

### 3.1.1.3 MDA-Konzentration in *Typha latifolia* nach 72stündiger Cd-Behandlung

Malondialdehyd (MDA) als Endprodukt der Lipidperoxidation ist ein Indikator dafür, dass freie Radikale, die bei der Behandlung mit Schwermetallen entstehen, pflanzeigene Schutzmechanismen überwunden haben und nun mit ungesättigten Fettsäuren der Zellmembranen reagieren. MDA entsteht als sekundäres Lipidperoxidationsprodukt aus dieser Reaktion und entfaltet seine toxischen Eigenschaften zum Beispiel auf die intrazellulären Proteintransporter. Es könnte daher vermutet werden, dass das MDA zur Störung der Barrierenfunktion und weiterer Eigenschaften der Zellmembranen führen kann; letztlich kommt es zu Abnahme der Membranfluidität und Zunahme der Durchlässigkeit (leaching) (<http://www.orthomedis.ch/mda.htm>).

Die Behandlung mit Cd bewirkte eine Erhöhung der Malondialdehyd-Konzentration in den Blattproben zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Cd (Abbildung 29). Besonders nach der Blattbehandlung mit 250  $\mu\text{M}$  Cd wurde eine weitere Steigerung der MDA-Konzentration gegenüber der Kontrolle erfasst. In den Rhizomen (Abbildung 29) sind die MDA-Effekte bei den Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  Cd und 250  $\mu\text{M}$  Cd am stärksten. Bei 100  $\mu\text{M}$  Cd zum Beispiel konnte ein 5facher Anstieg der MDA-Konzentration gemessen werden und bei 250  $\mu\text{M}$  ist eine Zunahme von 130% im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen.



**Abbildung 29** Malondialdehyd-Konzentration der Blätter (links) und der Rhizome (rechts) von *T. latifolia* nach 72stündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  Cd und As und 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Pb. Die Kontrolle enthält keine Metalle. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei parallel behandelten und gernteten Proben.

In den Blättern bewirkte Arsenat leichte Konzentrationsanstiege des MDA, eine signifikante Steigerung konnte man aber erst bei 250 µM beobachten.

Arsenat verursachte Änderungen in der MDA-Konzentration ähnlich wie Cd in den Rhizomen, mit dem Unterschied, dass die Zunahme der Konzentration schon bei geringeren Metallmengen auftrat. Eine 3fache Steigerung der MDA-Konzentration war schon bei 50 µM messbar. Dieser Trend blieb auch bei der nächsten As-Konzentration von 100 µM erhalten, bevor er später bei 250 µM As-Behandlung zu Hälfte abnahm.

Zusammenfassend liegen die MDA-Konzentrationen in Blättern auf einer trogförmigen Kurve mit Maximum bei 10 µM und 250 µM Cd und As, während die MDA-Konzentrationen in Rhizomen einen umgekehrten Verlauf nehmen; sie bilden eine Glockenkurve mit Maxima bei 50 µM As bzw. 100 µM Cd und Minima bei 10 und 250 µM. Das erneute Auftreten dieses Musters werden wir in der Folge bei einigen Enzymaktivitäten wieder finden.

#### **3.1.1.4 SOD-Aktivität in *Typha latifolia* nach 72stündiger Cd-Behandlung**

Bei allen Behandlungen mit den Schwermetallen Cd, Pb und As über 72 h konnten Hemmungen der Adenochrombildung in den Blatt- und den Rhizomextrakten von *T. latifolia* festgestellt werden.

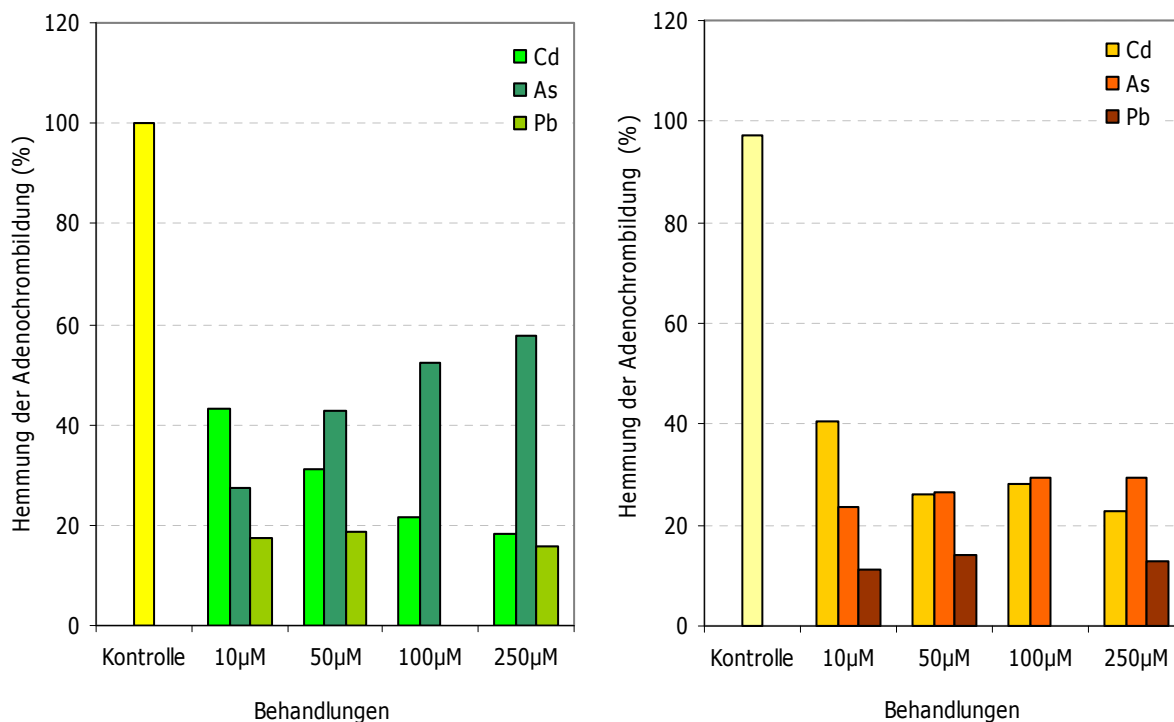
Alle Proben verfügen über SOD-Aktivität. In den Rhizomen von Rohrkolben konnten allerdings um 20% größere Hemmungen gemessen werden als in den Blättern (Abbildung 30).

Es ist sehr interessant, dass bei der Cd-Behandlung die Hemmung der Adenochrombildung mit ansteigender Metallkonzentration größer wird, d.h., dass die SOD-Aktivität hier ansteigt.

Nach Behandlung mit As ist der Verlauf der Enzymaktivität umgekehrt proportional: Mit steigender As-Konzentration in den Blättern nimmt die Hemmung der Adenochrombildung ab. Beim Pb sind keine Veränderungen der Enzymaktivität in den Rhizomen und den Blättern zwischen den Behandlungen festzustellen, jedoch ein Rückgang im Vergleich zur Kontrolle. Dies verhielt sich ähnlich bei As-Behandlung der Rhizome.

Die durch die Lipidperoxidation verursachten Effekte, die sich bereits in den angestiegenen MDA-Konzentrationen gezeigt hatten, sind im Bezug auf die As-Behandlung auch bei der SOD messbar.

Das heißt, dass Arsenat offenbar zu einem Überschuss an reaktiven Sauerstoffspezies geführt hat, der durch gestiegene SOD deaktiviert werden muss, bevor es zu weiterer Zellschädigung kommt. Die SOD-Aktivitätsabnahme nach der Cd-Behandlung hingegen ist nicht mit MDA-Konzentrationen korrelierbar.



**Abbildung 30** Hemmung der Adenochrombildung der Blätter (links) und der Rhizome (rechts) von *T. latifolia* nach 72stündiger Behandlung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM Cd und As und 10 µM, 50 µM und 250 µM Pb. Die Kontrolle enthält keine Metalle. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert zwischen drei parallel behandelten und geernteten Proben.

### 3.1.1.5 CAT-Aktivität in *Typha latifolia* nach 72stündiger Cd-Behandlung

Ebenso wie bei SOD konnten bei den CAT-Messungen der Blätter von *T. latifolia*, die mit Schwermetallen behandelt wurden, stets höhere Aktivitäten als in den unbehandelten Kontrollen festgestellt werden. Schon bei einer Cd-Konzentration von 50 µM konnte eine wesentliche Steigerung dieser Aktivität um das 5fache gemessen werden.

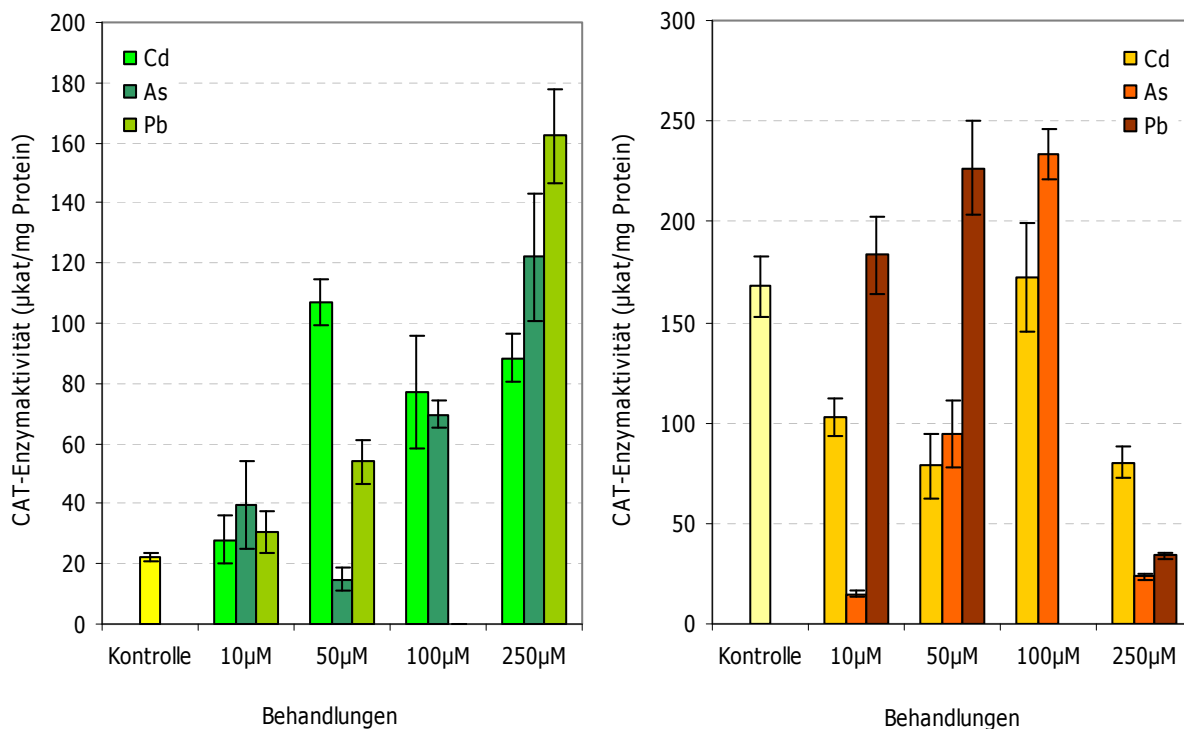
Bei den nächsthöheren Cd-Konzentrationen von 100 µM und 250 µM Cd war eine geringe Abnahme der CAT-Enzymaktivität zu messen, aber die Werte waren immer noch 3mal höher als bei den Kontrollen.

In den Rhizomen von *Typha latifolia*, die mit Cd behandelt wurden, war die CAT-Enzymaktivität konzentrationsabhängig gehemmt (Abbildung 31), nur bei der Konzentration von 100 µM Cd erreichten die Werte wieder den Kontrolllevel.

Im Unterschied zu Cd bewirkte Pb gleich ab 10 µM eine Erhöhung in der CAT-Enzymaktivität der Blätter. Hier konnte eine Aktivität von 137% im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Während bei der Konzentration von 50 µM Pb eine Steigerung der CAT-Enzymaktivität um das 2,5fache eintrat, war diese bei der Konzentration von 250 µM Pb 7mal so



hoch wie die Katalase-Aktivität der Kontrolle. Die Rhizome der Pb-behandelten Rohrkolbenproben zeigten bis zu der Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  keine erhöhte CAT-Aktivität. Dafür nahm die Enzymaktivität bei der Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  Pb wesentlich ab und lag danach bei nur 20% der CAT-Enzymaktivität der Rhizomkontrolle.



**Abbildung 31** Spezifische CAT-Aktivität der Blätter (links) und der Rhizome (rechts) von *T. latifolia* nach 72stündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  Cd und As und 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Pb. Die Kontrolle enthält keine Metalle. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei parallel behandelten und geernteten Proben.

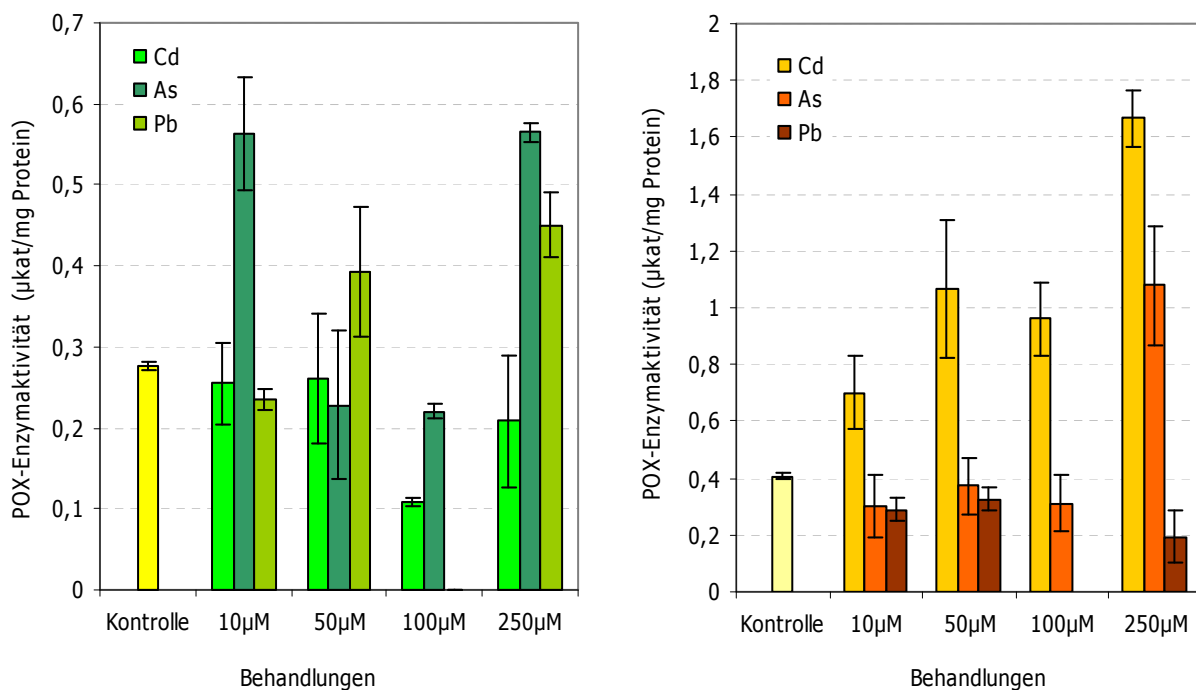
Behandlungen mit As förderten ebenfalls die Katalase-Aktivität in den Blättern von *Typha latifolia*. Schon 10  $\mu\text{M}$  As bewirkten eine 1,5fache Steigerung der CAT-Aktivität der Blätter. Dieser Trend blieb bei der As-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  nicht erhalten. Hier wurde eine Abnahme der CAT-Enzymaktivität bis zu 67% der Kontrolle gemessen. Ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  As konnte erneut eine deutliche Erhöhung der CAT-Aktivität bis zu 550% beobachtet werden.

Die Aktivität der Katalase in den Rhizomen der Rohrkolbenpflanzen liefert kein einheitliches Bild. Die mit As behandelten Rhizome zeigten außer bei der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  As eine signifikante CAT-Hemmung. Die Blei-Behandlung der Rhizome führte erst bei 250  $\mu\text{M}$  zur Hemmung und nach der Cd-Behandlung waren alle Katalase-Werte der Rhizome leicht bis signifikant gehemmt.

Da Arsenat Lipidperoxidation und Superoxidabbau in den *Typha latifolia*-Blättern induzierte, zeigte auch die Katalase eine metallabhängige Reaktion mit annähernd trogförmigem Verlauf, die eine Folge der Bildung von Wasserstoffperoxid durch SOD sein kann. Cd dagegen führte zu einer Sättigung der Katalase-Aktivität bei 50  $\mu\text{M}$ -Behandlung, während die Katalase mit dem Einfluss von Pb steil anstieg. Im Rhizom spiegelte die Katalase-Aktivität bei den Cd- und As-Behandlungen genau die MDA-Konzentration wieder.

### 3.1.1.6 POX-Aktivität in *Typha latifolia* nach 72stündiger Cd-Behandlung

Peroxidase-Aktivität konnte in allen Pflanzenteilen bei allen Cd-Konzentrationen gemessen werden. Die POX-Enzymaktivitäten in der Blatt- und der Rhizomkontrolle lagen bei 0,27 und



**Abbildung 32** Spezifische POX-Aktivität in der Blättern (links) und den Rhizomen (rechts) von *T. latifolia* nach 72stündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  Cd und As und 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Pb. Die Kontrolle enthält keine Metalle. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei parallel behandelten Proben.

0,41  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Alle Blattproben dieser Behandlung mit Cd zeigten leicht verminderte POX-Enzymaktivitäten im Vergleich zur Kontrolle. Nur bei der 100  $\mu\text{M}$  Konzentration von Cd in den Blättern war die Hemmung bedeutend (Abbildung 32). In allen Rhizomproben wurde eine starke und annähernd lineare Zunahme der POX-Enzymaktivität festgestellt. Das führte bei 250  $\mu\text{M}$  Cd sogar zu einer 4fachen Erhöhung der POX.

Nach der Pb-Behandlung wurde bei der mittleren Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  in den Blättern und den Rhizomen von Rohrkolben eine POX-Enzymaktivität im Bereich der Kontrolle gemessen. Dasselbe gilt auch für die POX-Aktivität nach 10  $\mu\text{M}$  Pb-Behandlung.

Bei der Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  Pb konnte in den Blättern von Rohrkolben eine Verdoppelung der POX-Enzymaktivität zur Kontrolle gemessen werden. Die niedrigste und die höchste Pb-Konzentration führten jeweils zu einer starken Abnahme der POX-Enzymaktivität in den Rhizomen von *Typha latifolia*.

Arsenat bewirkte keine Steigerung der POX-Aktivität; außer in den Rhizomen bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  As. Die Blattaktivität bei 10  $\mu\text{M}$  As und die POX-Blatt- und Rhizomaktivitäten bei 250  $\mu\text{M}$  As sind wesentlich höher (bis zu 3mal) als die der Kontrollen.

Bei den Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  As und 100  $\mu\text{M}$  As bleiben die POX-Enzymaktivitäten in Blättern und Rhizomen im Bereich der Kontrollen.

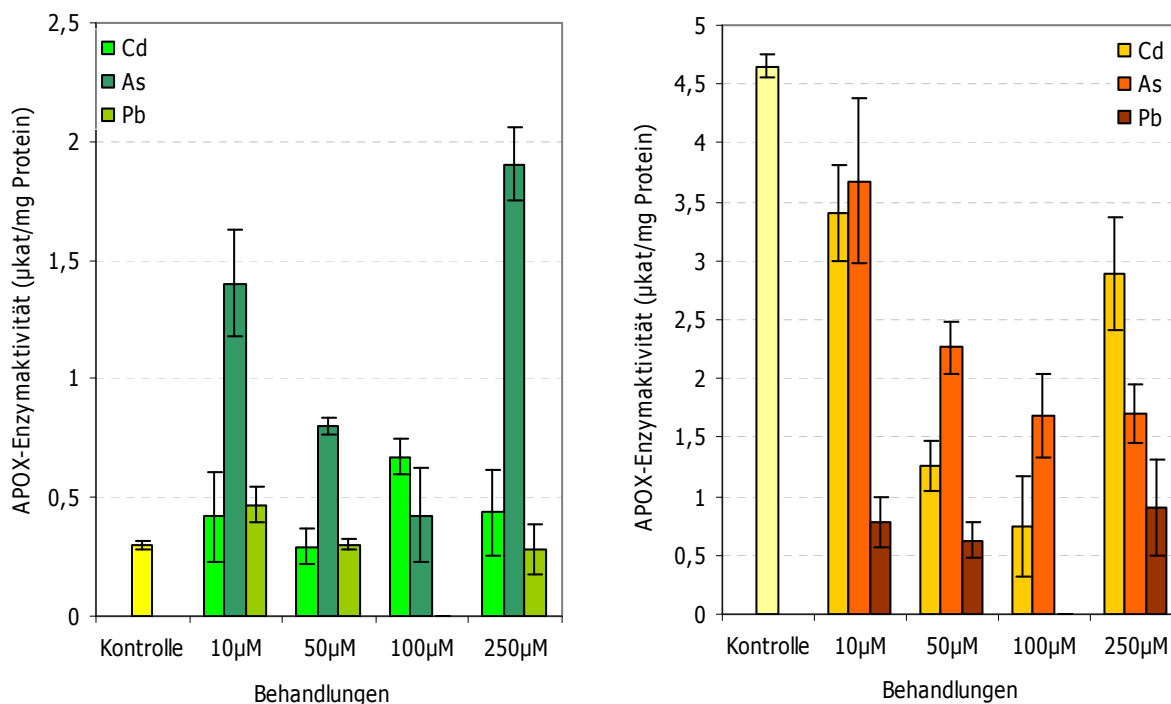
#### **3.1.1.7 APOX-Aktivität in *Typha latifolia* nach 72stündiger Cd-Behandlung**

Blattproben von *T. latifolia*, die 72 h lang mit Cd behandelt worden waren, zeigten eine ähnlich hohe APOX-Enzymaktivität wie die Kontrolle (0,30  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein). Nur die mit 100  $\mu\text{M}$  Cd behandelte Probe zeigte eine Verdopplung ihrer APOX-Enzymaktivität. In allen mit Cd behandelten Rhizomen von *Typha* waren die APOX-Aktivitäten gehemmt. Die niedrigste APOX-Aktivität der Rhizome lag mit 0,75  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein bei 100  $\mu\text{M}$  Cd (Abbildung 33).

Auch nach der Behandlung mit Bleichlorid zeigten die Rhizomproben eine abnehmende Tendenz für die APOX-Enzymaktivität. Dasselbe gilt allerdings nicht für die Blattproben von Rohrkolben, die mit Pb behandelt worden waren. Der stärkste Effekt ist hier bei 10  $\mu\text{M}$  Pb festzustellen. Diese APOX-Enzymaktivität lag 1,5mal höher als die Aktivität der Blattkontrolle. Mit der Zunahme der Pb-Konzentration war eine geringfügige Abnahme der APOX-Aktivität zu beobachten, aber die APOX-Aktivitäten der Blattproben lagen weiter im Bereich der Kontrolle.

Steigende Effekte auf die APOX der behandelten Blätter und hemmende Effekte auf die APOX der behandelten Rhizome findet man auch nach der Behandlung mit Arsenat. Hohe APOX-Enzymaktivität der Blätter war schon ab 10  $\mu\text{M}$  As zu beobachten. Hier konnte man eine 4,5fache Erhöhung der APOX-Aktivität feststellen. Mit der weiteren Zunahme der As-Konzentration nahm diese APOX-Aktivität leicht ab. Trotzdem waren die Effekte bis zu 2,5mal stärker als bei der Kontrolle. Die höchste APOX Enzymaktivität der Blätter konnte bei der As-Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  gemessen werden: eine 6fache Erhöhung im Vergleich mit

der Kontrolle. Außer bei 10  $\mu\text{M}$  As-Konzentration konnten in den Rhizomen von *T. latifolia* keine Effekte bei den restlichen As-Behandlungen festgestellt werden.



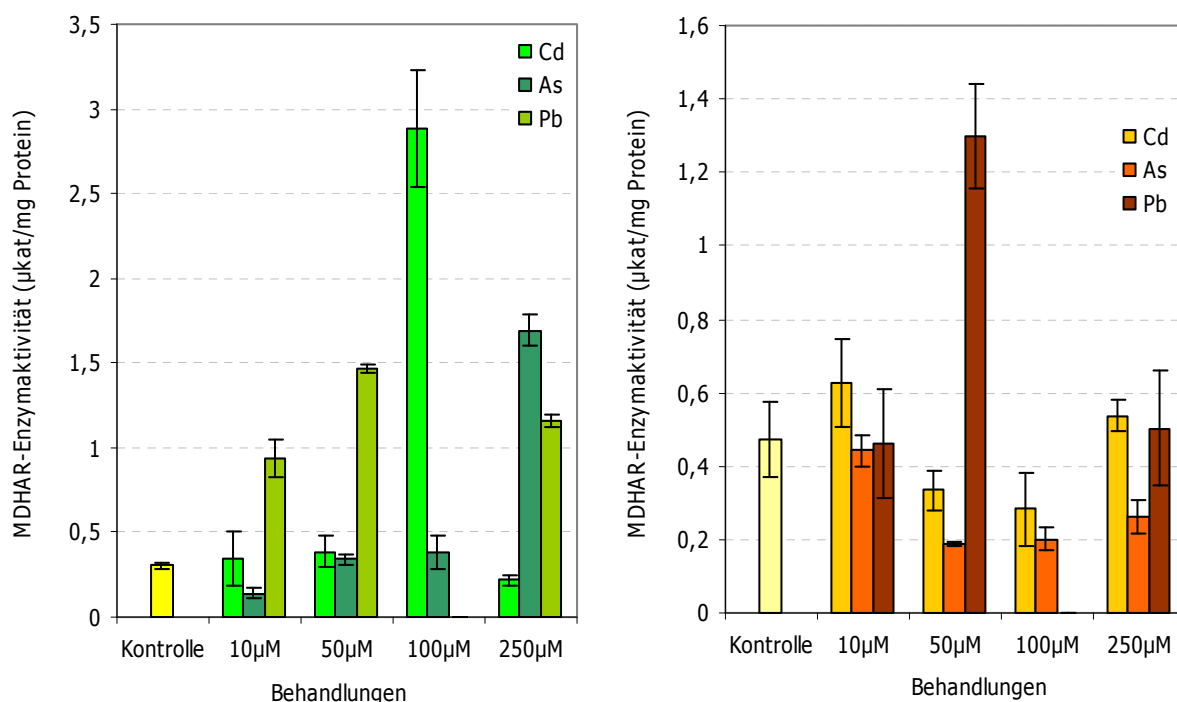
**Abbildung 33** Spezifische APOX-Aktivität der Blätter (links) und der Rhizome (rechts) von *T. latifolia* nach 72stündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  Cd und As und 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Pb. Die Kontrolle enthält keine Metalle. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei parallel behandelten Proben.

### 3.1.1.8 MDHAR-Aktivität in *Typha latifolia* nach 72stündiger Cd-Behandlung

Wie bei allen bisher gemessenen Enzymen zeigten die mit niedrigen Cd-Konzentrationen behandelten Blätter von *Typha latifolia* auch bei der MDHAR eine Enzymaktivität im Bereich der Kontrolle (Abbildung 34), etwa um 0,30  $\mu\text{kat/mg}$  Protein. Das Maximum dieser Aktivität in den Blättern lag bei 100  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung: Hier kam es zu 9,5facher Steigerung der MDHAR-Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle. Bei 250  $\mu\text{M}$  Cd kam es zu einer starken Abnahme der MDHAR. Bei den mit Cd behandelten Rhizomen von *Typha latifolia* wurde nur bei 10  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Cd eine ähnlich hohe MDHAR-Aktivität wie in der Kontrolle gemessen. Nach der Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Cd war die MDHAR-Aktivität stark gehemmt. Die Behandlung von Rohrkolben mit Bleichlorid hatte sehr starke Effekte auf die MDHAR-Enzymaktivität der Blätter. Konzentrationsabhängig kam es dort zu einer 3- bis 5fachen Steigerung der MDHAR-Enzymaktivität. Bei den Rhizomen war die MDHAR-Aktivität bei 50  $\mu\text{M}$  Pb 3mal höher als in der Kontrolle. Die Aktivitäten bei den anderen Pb-

Behandlungen lagen im Bereich der Kontrolle.

Die As-Behandlung führte bei den Rhizomen von *Typha latifolia* nur bei der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  As zu einer höheren MDHAR-Aktivität.



**Abbildung 34** Spezifische MDHAR-Aktivität der Blätter (links) und der Rhizome (rechts) von *T. latifolia* nach 72stündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Cd und As und 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Pb. Die Kontrolle enthält keine Metalle. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei parallel behandelten Proben.

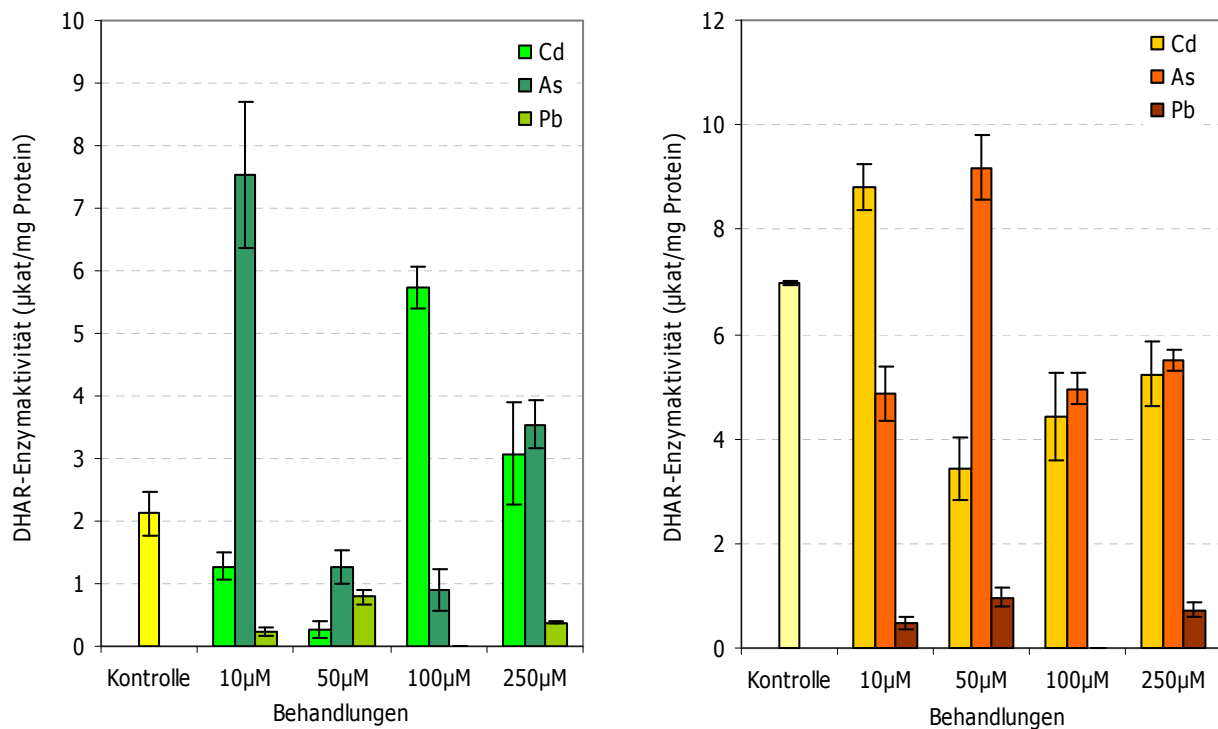
Alle anderen As-Konzentrationen hemmten die MDHAR. Der entgegengesetzte Effekt war bei den mit As behandelten Blattproben festzustellen. Dort war die MDHAR-Enzymaktivität bei der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  As halb so hoch wie in den Kontrollen; bei den mittleren gab es keine Unterschiede. Die höchste MDHAR-Induktion in den Blättern auf den 5,5fachen Wert der Kontrolle wurde bei der Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  As gemessen.

### 3.1.1.9 DHAR-Aktivität in *Typha latifolia* nach 72stündiger Cd-Behandlung

In den *T. latifolia*-Pflanzen wurde auch die Dehydroascorbatreduktase-Aktivität gemessen. In Blattproben war die DHAR-Aktivität nach den Behandlungen mit 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  Cd gehemmt (Abbildung 35). Nach der Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  Cd war die DHAR-Enzymaktivität stark angestiegen. Das Maximum der DHAR-Aktivität in den Blattproben lag bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Cd und machte dort eine 2,7fache Steigerung im Vergleich

zur Kontrolle aus, deren Wert bei 2,12  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein lag. Nach der Cd-Behandlung der Rhizomproben konnten erhöhte DHAR-Enzymaktivitäten nur bei den Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Cd gemessen werden. Bei den Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  war dieses Enzym gehemmt.

Keine der Behandlungen, weder die niedrigeren Pb-Konzentrationen in der Blättern noch die hohe Pb-Konzentration in den Rhizomen führte zu einer Erhöhung der DHAR-Aktivität. Alle Aktivitäten dieses Enzyms blieben bis zu 70% unterhalb der Kontrolle.



**Abbildung 35** Spezifische DHAR-Aktivität der Blätter (links) und der Rhizome (rechts) von *T. latifolia* nach 72stündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Cd und As und 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Pb. Die Kontrolle enthält keine Metalle. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei parallel behandelten Proben.

Dasselbe kann nicht über die As-Behandlungen gesagt werden. In den über 72 h mit As behandelten Blättern von Rohrkolben konnte schon bei der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  As eine 3,5fache Steigerung der DHAR-Aktivität zur Kontrolle bestimmt werden. Diese Tendenz einer erhöhten DHAR-Enzymaktivität blieb bei den Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  As jedoch nicht mehr erhalten, es kam zu einer Hemmung um 50%. Überraschend konnte eine erneute Steigerung der DHAR-Enzymaktivität auf das 1,5fache der Kontrollen bei der höchsten As-Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  gemessen werden.

Ähnliche Effekte konnten auch für die Rhizomproben bestimmt werden. Im Unterschied zu den Blättern zeigen die mit Pb behandelten Rhizome von *Typha latifolia* fast keine DHAR-Enzymaktivität bei 10  $\mu\text{M}$  As. Die DHAR-Aktivität unter As-Einfluss blieb bei 100  $\mu\text{M}$  auch

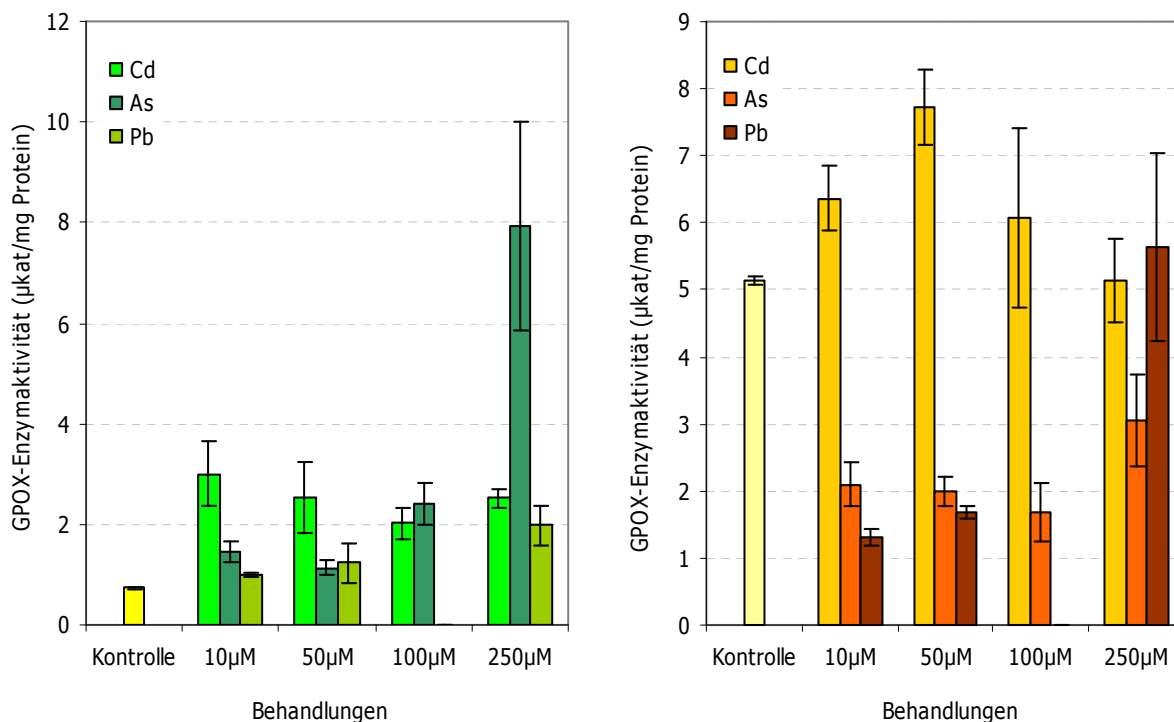
niedriger als die Kontrolle. Dafür wurde bei 50  $\mu\text{M}$  As eine fast 1,5fache Erhöhung der DHAR gemessen. Bei 250  $\mu\text{M}$  As war die Enzymaktivität von DHAR zwar höher als die der Kontrolle, aber weit niedriger als bei 50  $\mu\text{M}$  As.

#### **3.1.1.10 GPOX-Aktivität in *Typha latifolia* nach 72stündiger Cd-Behandlung**

Bei der Bestimmung der Glutathionperoxidase-Enzymaktivität wurden die höchsten Steigerungen der Aktivitäten nach der Cd-Behandlung erfasst. Alle Konzentrationen von  $\text{CdSO}_4$  verursachten mindestens eine Steigerung der GPOX-Enzymaktivität um das 3fache. Nach einer Gabe von 10  $\mu\text{M}$  Cd war sogar eine 4fache Erhöhung der Aktivität messbar (Abbildung 36). Cd verursachte bei keinem weiteren Entgiftungsenzym solche Veränderung der Aktivität. In den mit Cd behandelten *T. latifolia* Rhizomen waren die Enzymaktivitäten auch gegenüber der Kontrolle erhöht. Bei der Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Cd war diese Steigerung der Aktivität sogar 1,5fach.

Auch für die drei Pb-Konzentrationen war die Tendenz zur Steigerung der GPOX-Enzymaktivität in den Blättern von der niedrigsten (10  $\mu\text{M}$ ) zur höchsten Pb-Konzentration (250  $\mu\text{M}$ ) sehr deutlich. Während die GPOX-Aktivität der Kontrollen 0,74  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein betrug und die GPOX-Enzymaktivität nach der Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Pb bei 0,99  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein lag, kam es nach der Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Pb zur Verdopplung der GPOX auf 1,23  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (Abbildung 36). Die Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  Pb steigerte die GPOX-Aktivität der *Typha latifolia* Blätter um ein weiteres auf das 2,5fache der Kontrolle. Die GPOX-Enzymaktivitäten der Rhizome waren bei weitem nicht so hoch wie die der Blätter. In den Rhizomen lag die GPOX-Aktivität bei 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  Pb weit unterhalb der Kontrollwerte. Erst die Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  Pb führte zu einer Erholung der GPOX-Aktivität, die etwas über den Kontrollwert von 5,13  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein lag.

Bei diesem Enzym führte die As-Behandlung der Blätter prinzipiell zum gleichen Ergebnis wie die Inkubation mit Cd. Mit Erhöhung der As-Konzentration konnte eine Steigerung der GPOX-Enzymaktivität nachgewiesen werden. Während bei 10  $\mu\text{M}$  As und 50  $\mu\text{M}$  As eine 1,5fache Steigerung der GPOX-Aktivität gemessen werden konnte, war diese bei 100  $\mu\text{M}$  schon auf das 3fache gestiegen. Bei der Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  konnten sogar 7,93  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein gemessen werden, was einer 10fachen Erhöhung der GPOX-Enzymaktivität in den Blättern im Vergleich zu der Kontrolle entspricht. In den Rhizomen von *Typha latifolia*, welche mit vier As-Konzentrationen behandelt wurden, war die GPOX-Enzymaktivität stets reduziert.



**Abbildung 36** Spezifische GPOX-Aktivität der Blätter (links) und der Rhizome (rechts) von *T. latifolia* nach 72stündiger Behandlung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM Cd und As und 10 µM, 50 µM und 250 µM Pb. Die Kontrolle enthält keine Metalle. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± die Standardabweichung zwischen drei parallel behandelten Proben.

### 3.1.1.11 GR-Aktivität in *Typha latifolia* nach 72stündiger Cd-Behandlung

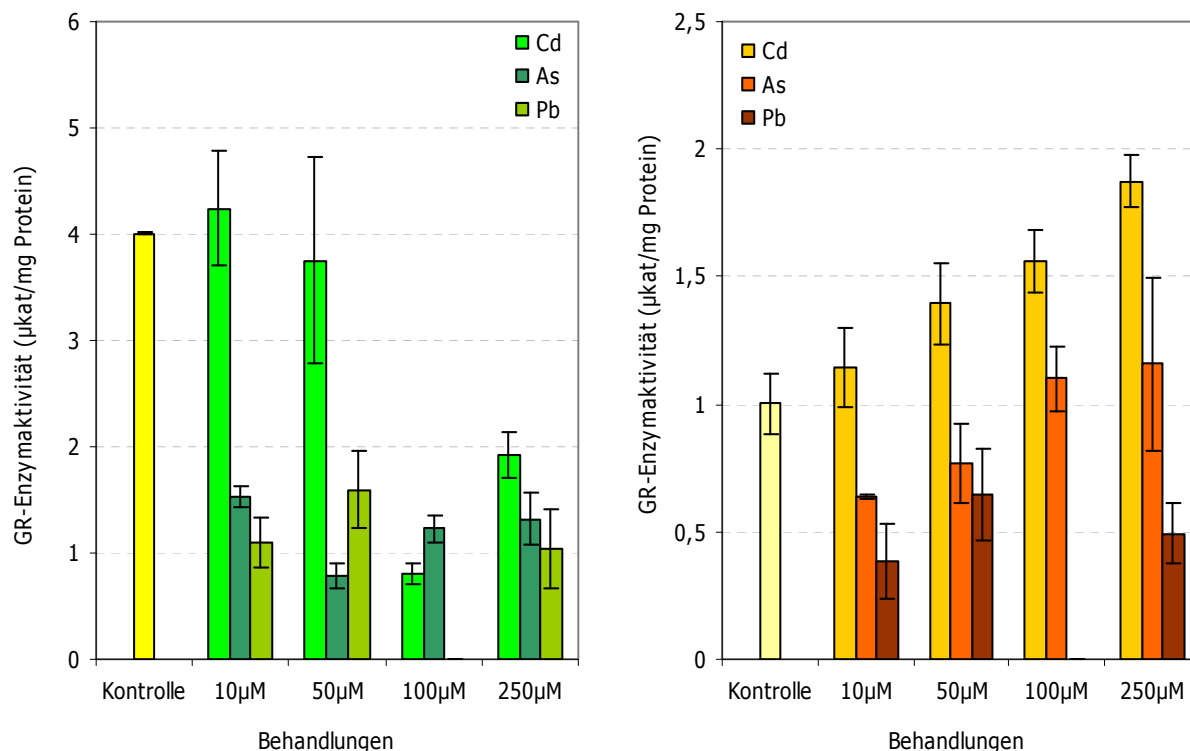
Die Behandlung mit CdSO<sub>4</sub> führte ab einer Konzentration von 50 µM zu einer Hemmung der GR-Aktivität, die bei der Inkubation mit 250 µM in eine leichte Erholung der Aktivität umschlug, jedoch immer etwa 50% niedriger als die Kontrolle blieb. In den Rhizomen konnte dagegen eine 1,5-2 fache Steigerung der GR-Enzymaktivität gemessen werden.

Die Behandlung von *Typha latifolia* mit Blei und Arsenat führte stets zur Hemmung der GR-Enzymaktivität (Abbildung 37). Alle GR-Aktivitäten in den Blättern und in den Rhizomen lagen unterhalb der Kontrolle. Während sich für die GR in den Blättern kein einheitlicher Trend abzeichnete, reagierte die GR in den Rhizomen nach der Arsenat-Behandlung mit einer sukzessiven Steigerung der Enzymaktivität, die jedoch stets im Bereich der Hemmung blieb.

In den Rhizomen von *Typha latifolia*, die den ersten Kontakt mit Cd und As hatten, konnte eine starke Aktivität der GR gemessen werden. Die gestiegene GR-Aktivität könnte ein Zeichen dafür sein, dass in der Zelle vorhandenes Glutathion zur Synthese von Phytochelatinen nach der Cd-Behandlung verbraucht wurde. Das Arsen induziert zwar keine Phytochelatine, aber Thiol-Peptid-Komplexe, die auch reduziertes GSH verbrauchen



(Dhankher et al., 2002).



**Abbildung 37** Spezifische GR-Aktivität der Blätter (links) und der Rhizome (rechts) von *T. latifolia* nach 72stündiger Behandlung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM Cd und As und 10 µM, 50 µM und 250 µM Pb. Die Kontrolle enthält keine Metalle. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± die Standardabweichung zwischen drei parallel behandelten Proben.

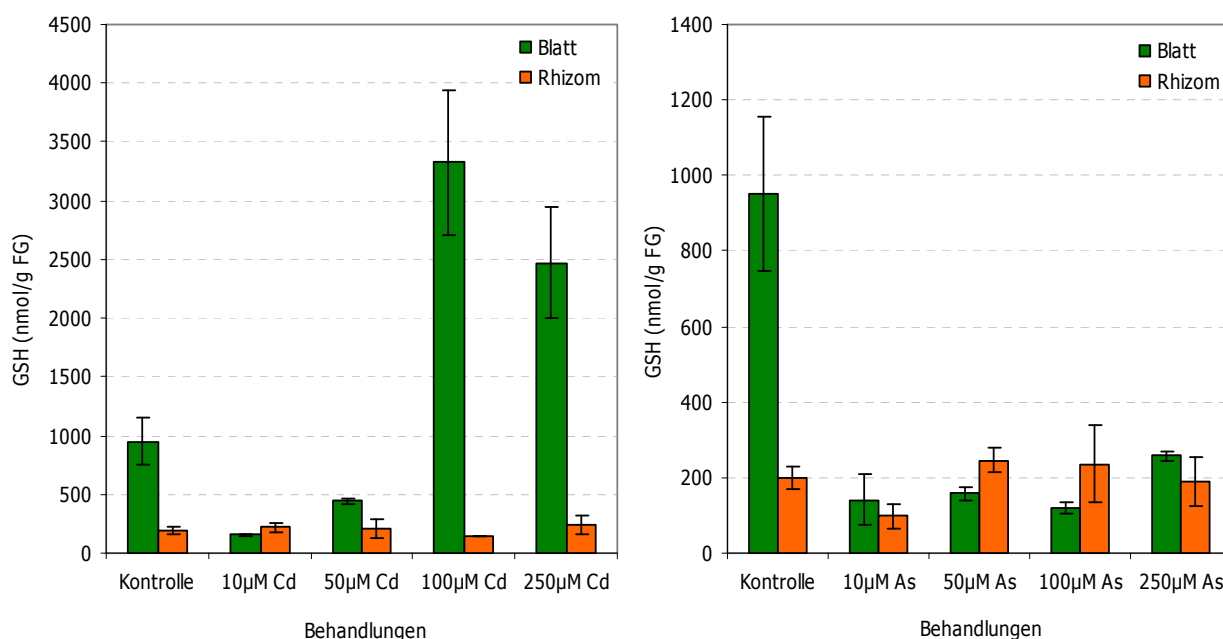
### 3.1.1.12 Glutathionhaushalt in *Typha latifolia* nach 72stündiger Cd-Behandlung

Bei der Untersuchung der Schwermetalleinflüsse in den *Typha latifolia*-Pflanzen, die über 72 h Cd-, As- und Pb-Stress hatten, wurde auch der Glutathionhaushalt untersucht. Es wurden außer den Enzymen Glutathionperoxidase, Dehydroascorbatreduktase und Glutathionreduktase auch die Konzentrationen von reduziertem und oxidiertem Glutathion in den behandelten Pflanzen gemessen.

In der Abbildung 38 ist die GSH-Konzentration in *Typha latifolia* nach 72stündiger Cd-Behandlung dargestellt. Dabei können zwei wesentliche Unterschiede zwischen den Reaktionen der Blätter und der Rhizome festgestellt werden. Die GSH-Konzentration der Blatt-Kontrolle betrug knapp 1000 nmol/g FG. Mit dem Verlauf der Behandlung war eine starke Abnahme der GSH-Konzentration bei 10 µM Cd auf 16% des Kontrolllevels festzustellen. Die Erhöhung der Cd-Konzentration auf 50 µM führte zur Reduktion der GSH-Konzentration auf 46% der Kontrolle, während 100 µM Cd die GSH-Konzentration in den

*Typha latifolia*-Blättern auf 349% steigerten. Dieser Trend blieb aber nicht bei der höchsten Cd-Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  erhalten, sondern es wurde eine vergleichsweise leichte Abnahme auf 259% der Kontrolle gemessen.

In den Rhizomen von *Typha latifolia* (Abbildung 38) wurden andere Effekte festgestellt. Bis zur Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Cd konnte eine leichte Zunahme der GSH-Konzentration gemessen werden. Bei der 10  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung wurden 109% der Kontrolle und bei 50  $\mu\text{M}$  Cd 106% der Kontrolle gemessen. Dafür nahm die GSH-Konzentration bei der Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd leicht ab. Hier wurden nur noch 72% der Kontrolle nachgewiesen. Interessant war es festzustellen, dass die weitere Erhöhung der Cd-Konzentration auf 250  $\mu\text{M}$  zu einer erneuten Erhöhung der GSH-Konzentration führte (122%).



**Abbildung 38** GSH-Konzentration der Rhizome und der Blätter von *T. latifolia* nach 72stündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  Cd (links) und As (rechts). Die Kontrolle enthält keine Metalle. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei parallel behandelten Proben.

Während die höchste GSH-Konzentration nach der Cd-Behandlung der Rohrkolben-Blätter 3300 nmol/g FG betrug (Abbildung 38), konnten nach der As-Behandlung nur 970 nmol/g FG gemessen werden. Weiterhin ist eine erhebliche Abnahme der GSH-Konzentration gleich bei 10  $\mu\text{M}$  As auf 14% der Kontrollwerte zu beobachten.

Die weitere Steigerung der As-Konzentration führte zu unterschiedlichen Effekten, stets blieben die GSH-Levels aber weit unter den Werten der Kontrolle. Die Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  As führte, verglichen mit den restlichen As-Behandlungen, zu einer leichten Steigerung der GSH-Gehalte. Nach der Behandlung waren noch 27% der Kontrolle übrig.

In den Rhizomen, die mit As behandelt worden waren, konnte kein eindeutiger Trend

bezüglich der GSH-Konzentration festgestellt werden. Nach der Einwirkung von 10  $\mu\text{M}$  As waren die Werte auf nur 49% der Kontrolle abgesunken. Mit der Steigerung der As-Konzentration auf 50  $\mu\text{M}$  As stieg auch die GSH-Konzentration auf 124% der Kontrolle. Bei der 100  $\mu\text{M}$  As-Konzentration war eine leichte Abnahme dieses Wertes festzustellen und nach Inkubation mit 250  $\mu\text{M}$  As war fast die Konzentration des GSH in den unbehandelten Pflanzen (96 %) erreicht.

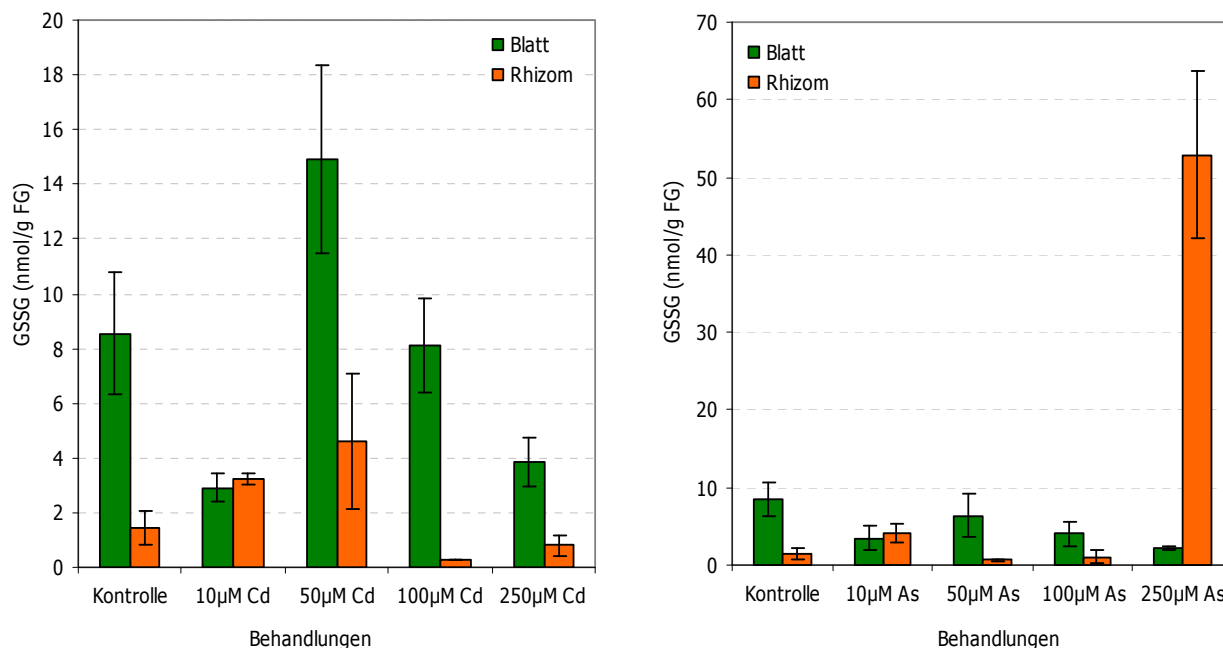
Im Unterschied zu den GSH-Konzentrationen der mit Cd und As behandelten *Typha latifolia*-Pflanzen traten bei den GSSG-Konzentrationen ganz andere Verhältnisse auf. Während in den Blättern die Cd-Behandlung zur höchsten Akkumulation von GSSG führte, wurde derselbe Effekt bei As in den Rhizomen verursacht. Die GSSG-Konzentration schwankte in den Blättern um 15 nmol/g FG und in den Rhizomen um bis zu 53 nmol/g FG.

Die Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Cd führte zu einer Abnahme der GSSG-Konzentration auf 33% der Kontrolle (Abbildung 39). Dies deutet auf einen Verbrauch von GSH und GSSG hin, wie er für die Entgiftung von Cd durch Phytochelatine beschrieben worden ist. Allerdings induziert Arsenat keine Phytochelatine, aber Thiol-Peptid-Komplexe, die das Glutathion aufbrauchen (Dhankher et al., 2002).

Die Steigerung der Cd-Konzentration verursachte eine Erhöhung der GSSG-Konzentration auf 174% der Kontrolle. Das ist das Maximum der GSSG-Konzentration in den Blättern, nicht nur für die Cd, sondern auch für die As-Behandlung. Die weitere Behandlung mit noch höheren Cd-Konzentrationen führte wieder zu einer Abnahme der GSSG-Konzentration auf 94% bei 100  $\mu\text{M}$  Cd und 44% der Kontrolle bei 250  $\mu\text{M}$  Cd. Die Rhizome von *Typha latifolia* reagierten schon auf 10  $\mu\text{M}$  Cd mit einer Steigerung der GSSG-Konzentration. Diese Schwermetallkonzentration verursachte eine Erhöhung der GSSG-Werte auf 221% zur Kontrolle. Die Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Cd führte in Rohrkolben-Rhizomen zu weiteren Steigerungen der GSSG-Konzentration bis auf 315% der Kontrolle (Abbildung 39). Bei 100  $\mu\text{M}$  Cd wurde eine drastische Abnahme der GSSG-Konzentration der Rhizome nachgewiesen. Es wurden nur 18% GSSG der Kontroll-Werte gemessen. Wie auch bei GSH, konnte bei der höchsten Cd-Konzentration in der Behandlung (250  $\mu\text{M}$  Cd) eine 3fache Steigerung der GSSG-Konzentration im Vergleich zu der 100  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung gemessen werden. Der Wert lag aber nur bei 56% der Kontrolle.

Wie bereits erwähnt, lagen die GSSG-Konzentrationen in der As-Behandlung von *Typha latifolia* nach 72 h weit unter den Werten nach der Behandlung über den gleichen Zeitraum. Bezüglich der GSSG-Konzentrationen in den Blättern konnte trotzdem der gleiche Trend beobachtet werden. Nach 10  $\mu\text{M}$  As-Behandlung sank der GSSG-Wert auf 40% der Kontrolle. Die Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  As erzielte das Maximum unter den Behandlungen mit 74% der

Kontrolle. Danach war eine Abnahme der GSSG-Konzentration zur 250  $\mu\text{M}$ -Behandlung zu beobachten. Hier wurden nur 25% der Kontrolle gemessen.



**Abbildung 39** GSSG-Konzentration der Rhizome und der Blätter von *T. latifolia* nach 72stündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  Cd (links) und As (rechts). Die Kontrolle enthält keine Metalle. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei parallel behandelten Proben.

Die GSSG-Konzentrationen in den As behandelten Blättern lagen in der gleichen Größenordnung wie die GSSG-Konzentrationen nach Cd-Behandlung (Abbildung 39). Genau wie dort wurde auch nach der As-Behandlung erst eine Abnahme der GSSG-Konzentration bei 10  $\mu\text{M}$  As auf nur 40% der Kontrolle festgestellt. Nachfolgend kam es zur Erhöhung der GSSG-Konzentration auf 74%. Bei den Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  As konnten nur noch 47% und 25% der Kontrolle nachgewiesen werden. Die Aktivität der GR war bei diesen As-Konzentrationen ebenfalls niedriger.

Die höchste GSSG-Konzentration in Rhizomen von *Typha latifolia* wurde nach As-Behandlung nachgewiesen. Interessant ist, dass dieses Maximum bei 250  $\mu\text{M}$  As auftrat. Bei der Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  Cd konnten nur 56% der Kontrolle festgestellt werden, während in diesem Fall eine Erhöhung von 3627% zur Kontrolle beobachtet werden konnte. Bereits niedrigste As-Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) führte zu einer Zunahme des GSSG auf 282% zur Kontrolle. Bei Konzentrationen von 50 und 100  $\mu\text{M}$  As wurden 45% und 72% der Kontrolle gemessen.

### 3.1.1.13 Bestimmung der Enzymaktivitäten der GSTs nach 72stündiger Cd-Behandlung

Nach der partiellen Charakterisierung des antioxidativen Stoffwechsels wurden in den mit Schwermetallen behandelten Rohrkolbenproben weitere Enzymtests mit unterschiedlichen

Substratspezifitäten durchgeführt, die an der Entgiftung von Pestiziden und organischen Schadstoffen beteiligt sind, um eventuelle Stressreaktionen charakterisieren zu können. Teil dieser Tests waren auch die Bestimmungen der GST-Aktivitäten mit fünf Substanzen (CDNB, NBC, NBoC, DCNB und Fluorodifen), die bekannte Modellsubstanzen für diese Enzymgruppe sind. Die Glutathion S-Transferasen katalysieren die Konjugation von Glutathion mit diesen Xenobiotika. Bekannt ist, dass die Substrate auch spontan Konjugate mit Glutathion bilden können, aber die GSTs erhöhen die Reaktionsgeschwindigkeit.

#### **3.1.1.13.1 CDNB-GST-Aktivität in *Typha latifolia***

Nach 72stündiger Behandlung mit Cd konnten in den Blättern und in den Rhizomen von *Typha latifolia* niedrigere GST-CDNB-Aktivitäten als in den Kontrollen gemessen werden (Tabelle 33). Dabei war die Aktivität in den Blättern der unbehandelten Pflanzen (1,571  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein) doppelt so hoch wie in Rhizomen (0,848  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein). Die CDNB-Enzymaktivitäten in den Blättern nahmen mit dem Konzentrationsanstieg ab. Im Unterschied hierzu nahm die CDNB-GST-Aktivität der Rhizome mit steigender Cd-Konzentration ab 10  $\mu\text{M}$  Cd kontinuierlich zu. Die niedrigste GST-Aktivität konnte jeweils bei der 100  $\mu\text{M}$ -Konzentration in den Blättern (0,144  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein) und nach der 10  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung in den Rhizomen (0,214  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein) gemessen werden. Die gleiche Beobachtung ließ sich auch für die GST-Enzymaktivität der mit Pb behandelten Proben machen. Keine der Proben zeigte nach der Behandlung eine höhere GST-Aktivität als die Kontrolle. In den Blättern und den Rhizomen konnte eine Abnahme der Enzymaktivität der Zunahme der Pb-Konzentration beobachtet werden (Tabelle 33). In den *T. latifolia*-Pflanzen, welche mit 250  $\mu\text{M}$  Pb behandelt worden waren, betrug die CDNB-GST-Aktivität der Blätter nur 3% und in den Rhizomen nur 2% der Kontrolle.

Die mit As behandelten *Typha latifolia*-Pflanzen zeigten ganz andere Effekte als die mit Cd oder Pb behandelten Pflanzen (Tabelle 33). Die Pflanzen, die mit der niedrigsten As-Konzentration behandelt worden waren (10  $\mu\text{M}$ ), hatten in den Blättern und in den Rhizomen CDNB-GST-Aktivitäten in der gleichen Höhe wie die Kontrolle. Diese Tendenz war bei den Rhizomen von *Typha latifolia*, die mit 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  As behandelt wurden, wieder zu entdecken. Dasselbe gilt allerdings nicht für die Blätter bei gleicher Behandlung. Bei diesen wurden abnehmende GST-CDNB-Aktivitäten gemessen (Tabelle 33). Erst die Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  As führte zu einer Steigerung der GST-Aktivität, die die Aktivität in den Blättern der Kontrolle übertraf. Die Rhizomproben von *Typha latifolia* zeigten bei der As-Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  168% GST-Aktivität über der Kontrolle.

**Tabelle 33** Spezifische GST-Aktivität in *T. latifolia* Proben, die mit Cd, As und Pb über 72 h behandelt wurden. Die Enzymaktivitäten wurden für vier Substrate (CDNB, NBoC, NBC, DCNB) und ein Herbizid (Fluorodifen) bestimmt. Jede Behandlung hat drei Wiederholungen. Jede einzelne Probe davon wurde in Triplikaten gemessen. Die Standardabweichungen wurden von insgesamt neun Messungen bestimmt. Die Aktivitäten sind in  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein dargestellt. Mit k.A ist keine Aktivität gekennzeichnet. Es wurden keine Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  Pb durchgeführt.

Behandlungen von <i>Typha latifolia</i>	Spezifische Aktivität der GST für fünf verschiedene Substrate				
	CDNB	NBC	NBoC	DCNB	Fluorodifen
GST-Aktivitäten der Rhizomproben					
Kontrolle	0,848±0,1	0,047±0,01	0,068±0,02	0,015±0,002	0,12±0,01
10 $\mu\text{M}$ Cd	0,214±0,141	0,043±0,007	0,02±0,001	0,008±0,003	0,661±0,79
50 $\mu\text{M}$ Cd	0,446±0,152	0,038±0,013	0,189±0,002	0,012±0,005	0,207±0,19
100 $\mu\text{M}$ Cd	0,345±0,001	0,035±0,001	0,07±0,001	0,01±0,003	0,187±0,01
250 $\mu\text{M}$ Cd	0,695±0,176	0,067±0,009	0,142±0,044	0,015±0,004	0,166±0,02
10 $\mu\text{M}$ As	0,893±0,22	0,024±0,012	0,1±0,005	0,043±0,007	0,131±0,05
50 $\mu\text{M}$ As	0,793±0,229	0,015±0,009	0,008±0,001	0,038±0,013	0,171±0,1
100 $\mu\text{M}$ As	0,676±0,014	0,019±0,009	0,006±0,001	0,04±0,013	0,1±0,01
250 $\mu\text{M}$ As	1,428±0,587	0,042±0,001	0,004±0,002	0,057±0,021	0,346±0,13
10 $\mu\text{M}$ Pb	0,055±0,004	0,053±0,012	0,027±0,007	0,02±0,007	0,15±0,02
50 $\mu\text{M}$ Pb	0,0176±0,009	0,017±0,008	0,032±0,001	0,038±0,001	0,289±0,02
250 $\mu\text{M}$ Pb	0,0235±0,001	0,041±0,003	0,014±0,009	0,305±0,075	0,272±0,02

Fortsetzung Tabelle 33

GST-Aktivitäten der Blattproben					
Kontrolle	1,571±0,012	0,197±0,08	0,104±0,03	0,022±0,01	0,0362±0,09
10 µM Cd	0,899±0,272	0,159±0,059	0,017±0,049	0,019±0,003	0,362±0,05
50 µM Cd	0,708±0,112	0,139±0,032	0,008±0,009	0,012±0,002	0,303±0,10
100 µM Cd	0,144±0,002	0,123±0,01	0,009±0,001	0,018±0,003	0,135±0,004
250 µM Cd	0,701±0,289	0,009±0,001	0,023±0,002	0,013±0,007	0,216±0,14
10 µM As	1,226±0,193	0,044±0,02	0,04±0,003	0,116±0,016	0,27±0,07
50 µM As	0,519±0,202	0,0280,01±	0,012±0,001	0,09±0,03	0,18±0,1
100 µM As	0,171±0,011	0,03±0,001	0,01±0,001	0,05±0,01	0,408±0,03
250 µM As	1,878±0,868	0,052±0,015	k.A	0,17±0,03	0,382±0,06
10 µM Pb	0,177±0,02	0,068±0,002	0,036±0,009	0,05±0,01	0,364±0,01
50 µM Pb	0,156±0,009	0,082±0,002	k.A	0,052±0,011	0,227±0,1
250 µM Pb	0,053±0,011	0,053±0,006	0,007±0,002	0,06±0,02	0,239±0,01

### 3.1.1.13.2 DCNB-GST-Aktivität in *Typha latifolia*

Die GST-Aktivität aller *T. latifolia*-Proben, die mit den drei verschiedenen Schwermetallen behandelt wurden, wurde auch für das Substrat DCNB geprüft. Wie in der Tabelle 33 zu sehen ist, schwankt die DCNB-GST-Aktivität der Cd-Proben um die der Kontrollen. Die Aktivität der Blattkontrolle lag bei 0,022  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein und die der Rhizome bei 0,015  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Die niedrigste DCNB-GST-Aktivität in den Blättern konnte bei 100  $\mu\text{M}$  Cd gemessen werden und in den Rhizomen schon bei 10  $\mu\text{M}$  Cd.

Es konnte ein interessanter Effekt der GST-DCNB-Aktivität bei den Pflanzen, die mit As und Pb behandelt wurden, beobachtet werden. Der durch die beiden Schwermetalle verursachte Stress führte in *Typha latifolia*-Pflanzen zu der gleichen Veränderung der GST-Aktivitäten. Mit Ausnahme der 10  $\mu\text{M}$  Pb-Konzentration im Rhizom, die zu 133% höherer GST-DCNB-Enzymaktivität führte, waren die Aktivitäten der restlichen Behandlungen bei As und bei Pb zwischen 200 und 700% höher als die Aktivitäten der Kontrollen. Die 250  $\mu\text{M}$  As-Behandlung verursachte die höchsten Veränderungen der GST-Enzymaktivität in Blättern und Rhizomen (780% und 380%).

Bei den mit As behandelten Rohrkolbenproben waren die Unterschiede der DCNB-GST-Enzymaktivitäten noch stärker ausgeprägt. Während die Blätter die höchste GST-Aktivität von 0,06  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein hatten, lag die Rhizomaktivität bei 0,305  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Verglichen mit den jeweiligen GST-Enzymaktivitäten der Kontrollen wurde bei den Blättern 282% GST-Aktivität bestimmt. Die Steigerung der GST-Aktivität in den Rhizomen war noch stärker: 2033% über der Kontrolle (Tabelle 33).

### 3.1.1.13.3 NBC-GST-Aktivität in *Typha latifolia*

Das Substrat NBC wurde generell nur in geringem Maß konjugiert. Hier lagen die GST-Aktivitäten bei 0,197  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (Blatt) und 0,047  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (Rhizom). Die Aktivität nach der Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Cd blieb unverändert. Mit der Steigerung der Cd-Konzentrationen nahm die Aktivität in den Blättern ab. In den Rhizomen bei 50  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung wurde eine Erhöhung über der Kontrolle gemessen. Dafür waren in der Blattprobe von 250  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung die niedrigsten GST-Enzymaktivitäten dieser Serie messbar (0,009  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein).

Bei der Behandlung von *Typha latifolia* mit Pb konnten dieselben Effekte wie bei der Cd-Behandlung festgestellt werden. Hier lag der Unterschied nur darin, dass die Blätter bei 10  $\mu\text{M}$  Pb eine Abnahme der GST-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle zeigten. Das absolute



Minimum der GST-Enzymaktivität wurde bei 50  $\mu\text{M}$  Pb gemessen. Die restlichen NBC-GST-Aktivitäten waren sowohl bei den Rhizomen als auch bei den Blättern extrem niedrig.

Nach der As-Behandlung konnte nur in den Rhizomproben der Rohrkolben bei 250  $\mu\text{M}$  As GST-Enzymaktivität nahe der Kontrolle gemessen werden (Tabelle 33). Bei allen anderen Konzentrationen lag die GST-Aktivität der Blätter und der Rhizome unterhalb der Kontrollen. Die niedrigste NBC-GST-Aktivität der Rhizome wurde bei der Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  As gemessen. Bei den Blättern war dies bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  As der Fall. Die Konjugation des Substrats NBC veränderte sich am geringsten.

#### **3.1.1.13.4 NBoC-GST-Aktivität in *Typha latifolia***

Die Cd-Behandlungen konnten nicht zu einer Steigerung der GST-Enzymaktivität in den Blättern von *T. latifolia* führen, sondern stets zu niedrigeren Raten als in der Kontrolle. Die Blattkontrolle hatte eine NBoC-GST-Enzymaktivität von 0,04  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein und die niedrigste Aktivität der mit Cd behandelten Blätter lag bei 0,009  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (100  $\mu\text{M}$  Cd Konzentration). Bei den Rhizomen konnte 0,068  $\mu\text{kat}$  Enzymaktivität/mg Protein nach der Cd-Behandlung gemessen werden (Tabelle 33). Das Minimum der GST-Enzymaktivität für NBoC in der gleichen Behandlungsreihe lag bei 0,02  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (10  $\mu\text{M}$  Cd Konzentration) für die Rhizome. Mit der Steigerung der Cd-Konzentration in den Rhizomen von Rohrkolben kam es hier zu einer Erhöhung der GST-Enzymaktivität. Bei den Behandlungen mit 100  $\mu\text{M}$  Cd und 250  $\mu\text{M}$  Cd kam es zu einer Steigerung der Aktivität von über 200% (0,189 und 0,142  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein).

In keiner der Behandlungen mit Pb konnten höhere GST-Enzymaktivitäten als in der Kontrolle ermittelt werden. Alle NBoC-GST-Aktivitäten waren um die Werte von 0,007 und 0,036  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (Blatt) und 0,014 und 0,032  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (Rhizom) verteilt.

Von den Aktivitäten aller Behandlungen mit As konnte nur bei der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  As bei den Rhizomen eine höhere Enzymaktivität als die der Kontrolle ermittelt werden (50% Erhöhung). Alle restlichen Proben lagen weit darunter.

#### **3.1.1.13.5 Fluorodifen-GST-Aktivität in *Typha latifolia***

Bezüglich der Fluorodifen-GST-Enzymaktivität in den Blätterproben nach Behandlung mit Cd konnten nur bei 10  $\mu\text{M}$  Cd und 50  $\mu\text{M}$  Cd steigende Effekte bestimmt werden. Der Wert der Kontrolle lag in diesem Fall bei 0,0362  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Die GST-Aktivitäten der beiden

erwähnten Proben lagen bei 0,362  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein und 0,303  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Bei den höheren Cd-Konzentrationen lagen die GST-Enzymaktivitäten weit unterhalb der Kontrolle (Tabelle 33). Bei drei von vier Cd-Behandlungen in *Typha latifolia*-Rhizomen konnten GST-Aktivitäten weit höher als die Kontrolle bestimmt werden. Der Wert der Kontrolle lag bei 0,12  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Die Fluorodifen-Enzymaktivität lag bei 0,661  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein für die 10  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung. Bei den restlichen drei Konzentrationen konnte eine Steigerung der GST-Enzymaktivität zwischen 109% und 173% der Kontrolle bestimmt werden.

Die Steigerung der Pb-Konzentration in den Blättern führte zu einer Abnahme der GST-Enzymaktivität. Die GST-Aktivität bei 10  $\mu\text{M}$  Pb lag noch im Bereich der Kontrolle (Tabelle 33). Der umgekehrte Effekt konnte in den Rhizomen von Rohrkolben beobachtet werden. Die Steigerung der Pb-Konzentration führte hier zu einer starken Zunahme der GST-Aktivität. Bei den Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  Pb und 250  $\mu\text{M}$  Pb konnte eine 2- und 2,5fache Erhöhung der GST-Enzymaktivität gemessen werden.

Die Effekte, die die As-Behandlung auf die GST-Enzymaktivität von *Typha latifolia* verursachte, waren denen von Pb ähnlich. Die beiden niedrigeren As-Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$ ) wirkten hemmend auf die GST-Aktivität in den Rohrkolbenblättern. Dies galt aber nicht für die gleichen As-Konzentrationen in den Rhizomen derselben Pflanzen, die über der Kontrolle lagen. Alle Enzymaktivitäten der GSTs bei As-Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  bewiesen höhere Aktivitäten. Das Rhizom zeigte bei der Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  sogar 2,5mal höhere GST-Aktivität als die Kontrolle.

#### **3.1.1.14 Vergleich aller Enzymaktivitäten von *Typha latifolia* nach 72stündiger Cd-, As- und Pb-Behandlung**

Die Fülle der bisher dargestellten Ergebnisse verlangt eine zusammenfassende Darstellung der gemessenen Enzymaktivitäten. In der Tabelle 34 sind die Effekte und die Tendenzen der Hemmung symbolisch erläutert, aber auf das Niveau der Kontrolle bezogen, weshalb Unterschiede zwischen einzelnen Behandlungsstufen nicht berücksichtigt sind.

Beispielsweise war die MDA-Konzentration in den Rhizomen nach allen drei Behandlungen höher als in den Blättern. Trotz der großen Unterschiede der SOD-Enzymaktivität in den einzelnen Behandlungsstufen war im Vergleich zur Kontrolle keine Steigerung der SOD-Aktivität messbar. Im Gegensatz zu MDA war bei der Katalase die Enzymaktivität nach allen drei Behandlungen in den Blättern erhöht, während sie in den Rhizomen um den Kontrollwert schwankte (nach der Pb-Behandlung) oder gehemmt (nach den Cd- und As-Behandlungen) war.

Bei den Enzymen des Ascorbat-Glutathion Zyklus war keine deutliche Differenz zwischen den Aktivitäten in den Blättern- und den Rhizomen der einzelnen Behandlungen zu verzeichnen. Nach der Cd-Behandlung blieben diese Enzymaktivitäten auf dem Kontrolllevel.

Bei der Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd aber waren signifikante Erhöhungen der APOX-, MDHAR- und DHAR-Aktivität in den Blättern messbar. Die POX zeigte hier keine Steigerung ihrer Aktivität, dafür war sie in den Rhizomen bei allen Cd-Konzentrationen sehr aktiv.

Nach der As-Behandlung konnten nur bei der niedrigsten und bei der höchsten Konzentration signifikant erhöhte Aktivitäten der Enzyme des Ascorbat-Glutathion Zyklus in den Blättern gemessen werden. Die Aktivitäten den Rhizomen waren dagegen gehemmt. Das am meisten induzierte Enzym nach der Pb-Behandlung war die MDHAR.

Die Enzyme des Glutathionperoxidase Zyklus waren gegenüber der Kontrolle in den Blättern nach allen Cd- und As-Behandlungen und bei der höchsten Pb-Konzentration erhöht. Die GPOX-Aktivität der Rhizome hingegen schwankte nach der Cd- und Pb-Behandlung um die Werte der Kontrolle und war nach der As-Behandlung stets gehemmt.

Die GR lag nach der Cd-Behandlung im Bereich der Kontrolle, nahm aber nach der As- und Pb-Behandlung steil ab. Das GSH/GSSG-Verhältnis war nur bei den höchsten Cd-Konzentrationen in den Blättern und in den Rhizomen signifikant höher als die Kontrolle.

In Bezug auf die GST-Aktivitäten ist zu erwähnen, dass As und Pb zu einer Induktion der DCNB-GSTs in Blättern und Rhizomen führten. Fluorodifen-GST hingegen wurde in den Rhizomen nach allen drei Behandlungen induziert. Die Aktivitäten der GSTs für die restlichen Modellsubstrate lagen vorwiegend unterhalb denen der Kontrolle.

**Tabelle 34** Vergleich aller Enzymaktivitäten in *T. latifolia* nach 72stündiger Behandlung mit Cd, As und Pb. Die Tabelle repräsentiert die Aktivitäten der einzelnen Enzyme verglichen zur Kontrolle. Die Kontrolle entspricht 100% und ist nicht in der Tabelle aufgetragen. Symbolerläuterungen: ↓ Enzymaktivität unter 75% im Vergleich zur Kontrolle, ● 75-150% zur Kontrolle, \* 150-200% zur Kontrolle, ↑ 200-400% zur Kontrolle, ↑↑ 400-600% zur Kontrolle, ↑↑↑ 600-1000% zur Kontrolle. Mit „k.A.“ ist fehlende Aktivität und mit „n.g.“ nicht gemessen gekennzeichnet worden. B = Blatt, R = Rhizom

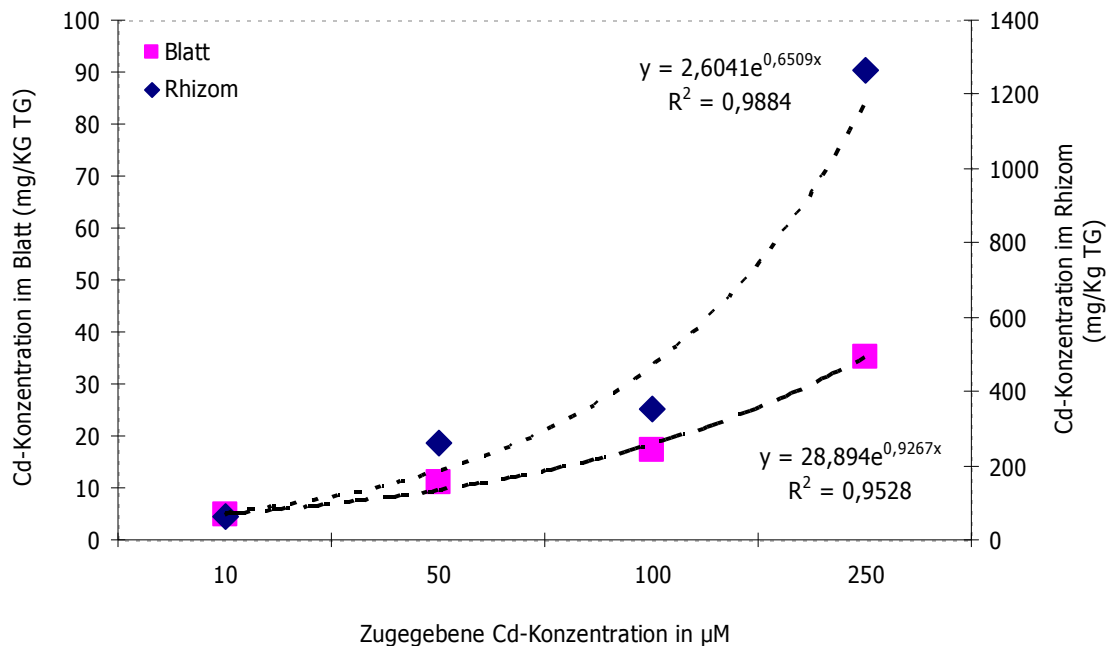
<i>Typha latifolia</i> -Behandlungen	10 µM Cd B	10 µM Cd R	50 µM Cd B	50 µM Cd R	100 µM Cd B	100 µM Cd R	250 µM Cd B	250 µM Cd R	10 µM As B	10 µM As R	50 µM As B	50 µM As R	100 µM As B	100 µM As R	250 µM As B	250 µM As R	10 µM Pb B	10 µM Pb R	50 µM Pb B	50 µM Pb R	250 µM Pb B	250 µM Pb R
Malondialdehyd als Stressmarker																						
MDA	●	*	●	●	●	↑↑	*	↑	●	●	●	↑	●	↑	●	●	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Oxidative Enzyme																						
SOD	●	●	●	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	●	↓	●	↓	●	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
CAT	●	↓	↑↑	↓	↑	●	↑	↓	*	↓	↓	↓	↑	●	↑↑	↓	*	●	↑	●	↑↑	↓
Ascorbat-abhängige Enzyme																						
POX	●	*	●	↑	↓	↑	●	↑↑	↑↑	↓	●	●	●	●	↑↑	↑↑	●	↓	●	●	*	↓
APOX	●	↓	●	↓	↑	↓	●	↓	↑↑	●	↑	↓	●	↓	↑↑	↓	*	↓	●	↓	●	↓
MDHAR	●	●	●	↓	↑↑	↓	↓	●	↓	●	●	↓	●	↓	↑↑	↓	↑	●	↑↑	↑	↑	●

					↑																		
DHAR	↓	•	↓	↓	↑	↓	•	•	↑	↓	↓	•	↓	↓	*	•	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
GSH und Glutathion-abhängige Enzyme																							
GPOX	↑ ↑	•	↑	*	↑	•	↑	•	*	↓	*	↓	↑	↓	↑ ↑ ↑	↓	•	↓	•	↓	↑	•	
GR	•	•	•	•	↓	*	↓	*	↓	↓	↓	•	↓	•	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
GSH/GSSG	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↓	*	•	↓	n.g	n.g	n.g	n.g	n.g	n.g	n.g
Entgiftung von organischen Fremdstoffen (GST)																							
CDNB	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	•	•	↓	•	↓	•	•	*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
DCNB	•	↓	↓	•	•	↓	↓	•	↑ ↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑ ↑ ↑	↑	↑	•	↑	↑	↑	↑	↑
NBC	•	•	↓	•	↓	↓	↓	•	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	•	↓	•	↓	↓	↓	↓	•
NBoC	↓	↓	↓	↑	↓	•	↓	↑	↓	•	↓	↓	↓	↓	k.A	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Fluorodifen	•	↑ ↑	•	*	↓	*	↓	*	↓	•	↓	•	•	•	•	↑	•	•	↓	↑	↓	↑	↑

### 3.1.2 Behandlung der *Typha latifolia*-Pflanzen mit Cadmium über 72 Tage

#### 3.1.2.1 Bestimmung der Metallgehalte in *Typha latifolia*, behandelt mit Cd über 72 Tage

Die *T. latifolia*-Pflanzen wurden in diesem Versuch mit vier unterschiedlichen Cadmiumkonzentrationen behandelt. Ziel war es, die Effekte auf den antioxidativen Stoffwechsel und die physiologischen Vorgänge in den Rohrkolbenpflanzen nach dieser Langzeitbehandlung zu evaluieren. Von besonderem Interesse war der vermutete Einfluss des Cadmiums auf das Entgiftungspotential für organische Schadstoffe und Herbizide. Die in der Studie verwendeten Cd-Konzentrationen waren: 0 µM (Kontrolle) und 10 µM, 50 µM, 100 µM und 250 µM. Die in die Pflanzen aufgenommenen Cd-Mengen waren exponentiell mit den in der Nährlösung dosierten Cd-Konzentrationen korrelierbar (Abbildung 40 und Abbildung 41).

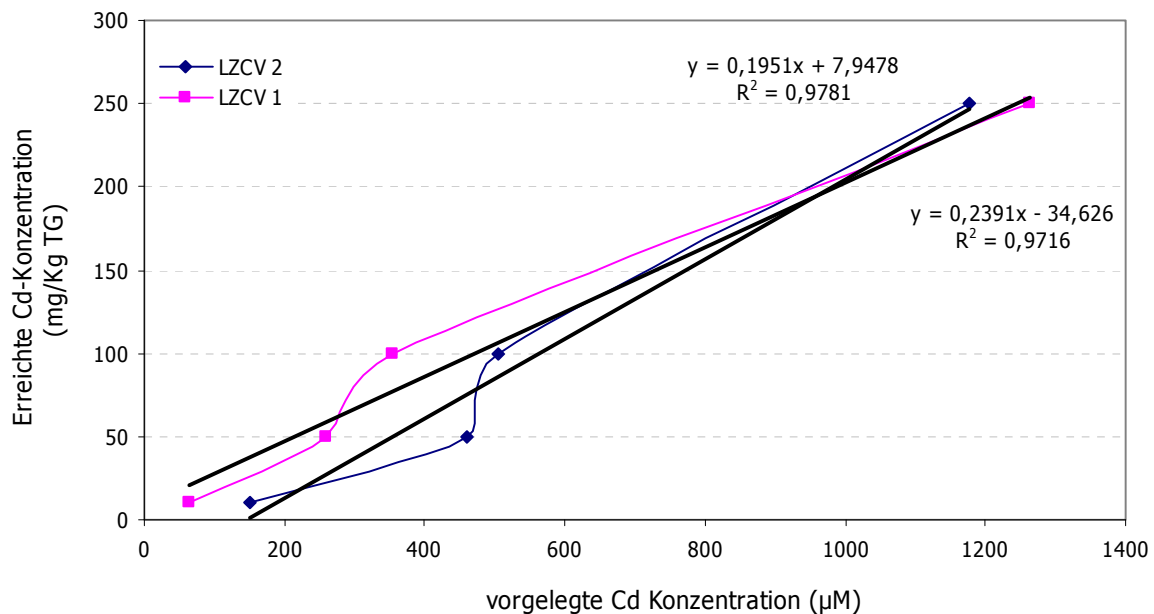


**Abbildung 40** Korrelation zwischen den Cd-Konzentrationen im Inkubationsmedium und den von den *T. latifolia*-Blättern und Rhizomen aufgenommenen Cd-Konzentrationen nach 72tägiger Behandlung. Die Werte sind aus den Mittelwerten dreier behandelter Pflanzen gebildet worden. Die Cd-Konzentrationen in den Blättern und in den Rhizomen sind in mg/Kg TG angegeben.

Wie aus der Abbildung 40 zu entnehmen ist, gab es auch zwischen der in den Rhizome aufgenommenen Cd-Menge und der Konzentration in den Blättern eine exponentielle Korrelation. Allerdings ist die Menge an Cd, die in die Blätter transportiert wurde, erheblich geringer als die von den Rhizomen aufgenommene.

In der Abbildung 41 ist die Korrelation zwischen der Metallaufnahme zweier unabhängig durchgeführter Experimente aus den Jahren 2006 und 2007 dargestellt. Wie aus der Graphik zu entnehmen ist, haben die beiden unabhängigen Behandlungen von *Typha latifolia* mit Cd

über 72 Tage zu den gleichen Effekten geführt. Deswegen konnten die Ergebnisse der beiden Versuche miteinander verglichen werden. Ergebnisse zu morphologischen Parametern und zur Photosyntheseleistung sind nur im zweiten Experiment erworben worden.



**Abbildung 41** Korrelation zwischen der vorgelegten Cd-Konzentration im Medium und der von den *T. latifolia*-Rhizomen aufgenommenen Cd-Konzentration nach 72tägiger Behandlung. LZCV 1 steht für die erste Behandlung von *T. latifolia* und LZCV 2 für die Wiederholung dieser Versuche. Die Werte sind aus den Mittelwerten von je drei behandelten Pflanzen gebildet worden. Die Cd-Konzentrationen in den Rhizomen sind in mg/Kg TG angegeben.

Die Tabelle 35 listet die Werte, die nach der 72tägigen Cd-Behandlung in den *T. latifolia*-Rhizomen und Blättern erreicht wurden, auf. Es ist anzumerken, dass bereits in der Kontrolle, die keine externe Cd-Zugabe bekommen hatte, Spuren von Cd festgestellt wurden. Dies beruht offenbar auf einer Kontamination der verwendeten Geräte oder auf dem Eintrag von Schwermetallen mit dem verwendeten Bodensubstrat (Lecaton). Bei der prozentualen Verteilung der Cd-Konzentration in den Blättern von Rohrkolben konnte festgestellt werden, dass diese von den niedrigeren zu den höheren Inkubations-Konzentrationen abnahm (Tabelle 35). Der gleiche Effekt schlug sich auch in den Blatt/Rhizom-Verhältnissen nieder. Die ICP-Messungen belegten, dass in den Rhizomproben von *Typha latifolia* nach dem 72. Behandlungstag die Cd-Konzentrationen von 10 µM (63,8 mg/Kg TG) auf 50 µM (258,7 mg/Kg TG) linear zunahm. Bei 100 µM (354 mg/Kg TG) Cd kam es zu einer reduzierten Aufnahme, bei 250 µM Cd zu einer erheblichen Steigerung: 1265,5 mg/Kg TG.

**Tabelle 35** Aufgenommene Cadmiummenge in den Rhizomen und den Blättern von *T. latifolia* nach Inkubation mit 10 µM, 50 µM, 100 µM und 250 µM Cd über 72 Tage. Die Kontrolle wurde nicht mit Cadmium behandelt. Mittelwert ± Standardabweichung repräsentieren drei parallel behandelte Proben.

Zugegebene Cadmium-Konzentration im Versuch	Konzentration in den Rhizomen mg/Kg TG	Konzentration in den Blättern mg/Kg TG	Gesamtkonzentration in der Pflanze mg/Kg TG	Blatt/Rhizom-Verhältnis	Prozent Cd-Konzentration in den Blättern
Kontrolle	6,5±2,5	0,8±0,3	7,3	0,1	11,01
10 µM Cd	63,8±35,6	4,7±1,2	68,5	0,1	6
50 µM Cd	258,7±127,6	10,9±2,3	269,6	0,04	4,04
100 µM Cd	354±84,8	17,2±5,3	371,2	0,05	4,6
250 µM Cd	1265,5±417,5	35,2±8,5	1297,7	0,03	2,7

### 3.1.2.2 Pigmentanalyse in *Typha latifolia*, behandelt mit Cd über 72 Tage

Nach einer Behandlung von Pflanzen mit Schwermetallen ist häufig Vergilbung und eine Veränderung in den Konzentrationen der einzelnen Pigmente beobachtet worden. Das hängt in jedem Fall davon ab, wie gut die jeweilige Pflanze die gefährlichen Stoffe entgiften und neutralisieren kann. Um das bei *Typha latifolia* zu untersuchen, wurden die Konzentrationen der Pigmente am Ende der 72tägigen Cd-Behandlung aufgenommen.

Aus der Tabelle 36 ist zu entnehmen, dass die Chlorophyll a- und Chlorophyll b-Konzentrationen im Rohrkolben mit der zunehmenden Cd-Konzentration stark abnahmen. In der Kontrolle wurde für Chlorophyll a ein Wert von 21,05 µg/g FG gemessen; bei der geringsten Cd-Konzentration war dagegen ein Wert bei 10 µM von nur 12,5 µg/g FG Chlorophyll a im Pflanzenextrakt festgestellt worden. Das ist eine Abnahme um fast 40%, die im Kurzzeitexperiment (72 h) nicht zu sehen war.

Interessant ist, dass bei der Konzentration von 100 µM Cd die gleiche Chlorophyll a-Konzentration wie nach der 10 µM-Behandlung vorlag. Bei der 250 µM-Konzentration nahm wie erwartet das Chlorophyll a weiter ab, aber nicht mehr so viel. Hier waren immer noch 10,5 µg/g FG zu finden, was genau der Hälfte des Chlorophyllgehalts in der Kontrolle entsprach.

Die Effekte, die bereits beim Chlorophyll a beschrieben wurden, konnten auch bei Chlorophyll b und folglich auch bezüglich der Gesamt-Chlorophyll-Konzentration festgestellt werden. Die Carotinoidkonzentrationen in den mit Cd behandelten Rohrkolben nahmen bis zu 100 µM kaum ab. Bei der höchsten Cd-Konzentration waren aber nur noch 2,79 µg Carotin/g FG zu finden, was nur 33% der Gehalte der Kontrolle entsprach.



Die höchsten Verhältnisse zwischen dem Gesamt-Chlorophyll und den Carotinoiden konnten bei der Cd-Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  (5,952) gemessen werden und die niedrigsten bei der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  mit 2,859.

**Tabelle 36** Pigmentanalyse der Blätter von *T. latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung. Jeder Wert repräsentiert drei unabhängige Messungen einer Probe mit drei Replikaten. Die Standardabweichungen wurden aus den Replikaten ausgerechnet. Chlorophyll a+b repräsentiert den Gesamtchlorophyllgehalt, das a/b-Verhältnis stellt die Beziehung Chlorophyll a zu Chlorophyll b dar und das a+b/x+c-Verhältnis, dieses zwischen dem Gesamtchlorophyll und den Carotinoiden. Alle Konzentrationen sind in  $\mu\text{g/g}$  FG angegeben.

Pigmentanalyse von <i>Typha latifolia</i> nach 72tägiger Behandlung mit Cd						
Behandlung	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Chlorophyll a+b	Carotinoide (Cx+c)	a/b	a+b/x+c
Kontrolle	21,0 $\pm$ 4,9	13,9 $\pm$ 3,5	34,9 $\pm$ 8,4	8,4 $\pm$ 0,9	1,5	4,2
10 $\mu\text{M}$ Cd	12,5 $\pm$ 3,1	7,7 $\pm$ 1,1	20,4 $\pm$ 4,1	7,1 $\pm$ 1,5	1,6	2,9
50 $\mu\text{M}$ Cd	14,3 $\pm$ 3,5	9,1 $\pm$ 2,9	23,5 $\pm$ 6,3	6,3 $\pm$ 1,6	1,6	3,7
100 $\mu\text{M}$ Cd	12,2 $\pm$ 1,9	7,4 $\pm$ 0,9	19,7 $\pm$ 2,7	5,5 $\pm$ 1,1	1,7	3,6
250 $\mu\text{M}$ Cd	10,5 $\pm$ 0,5	6,1 $\pm$ 0,4	16,6 $\pm$ 0,9	2,8 $\pm$ 0,2	1,7	5,9

### 3.1.2.3 Untersuchung der Photosynthese, der Transpiration und der stomatären Leitfähigkeit in *Typha latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit Cd

Die drei Parameter wurden zu zwei Zeitpunkten gemessen. Die ersten Messungen wurden am Tag 36 nach dem Start des Versuchs durchgeführt. Die Messungen wurden am Tag 72, dem letzten Tag der Behandlung, wiederholt. Es wurde vermutet, dass die beiden Zeitpunkte Hinweise über den Verlauf und die vermuteten Hemmungen der Photosynthese unter Cadmiumeinfluss geben könnten.

#### 3.1.2.3.1 Netto Photosynthese

Am Tag 36 nach dem Start des Versuchs konnte nach der Kontrolle eine konsistente Abnahme der Photosynthese in den Blättern bis zur der höchsten Cd-Konzentration beobachtet werden (Abbildung 42A). Die mit 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  Cd behandelten Pflanzen zeigten nur etwa 85% der PS-Rate der Kontrolle. In Anwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  Cd wurde noch 68% der Photosynthese-Rate der Kontrolle gemessen, bei 250  $\mu\text{M}$  Cd waren es weniger als 50%.

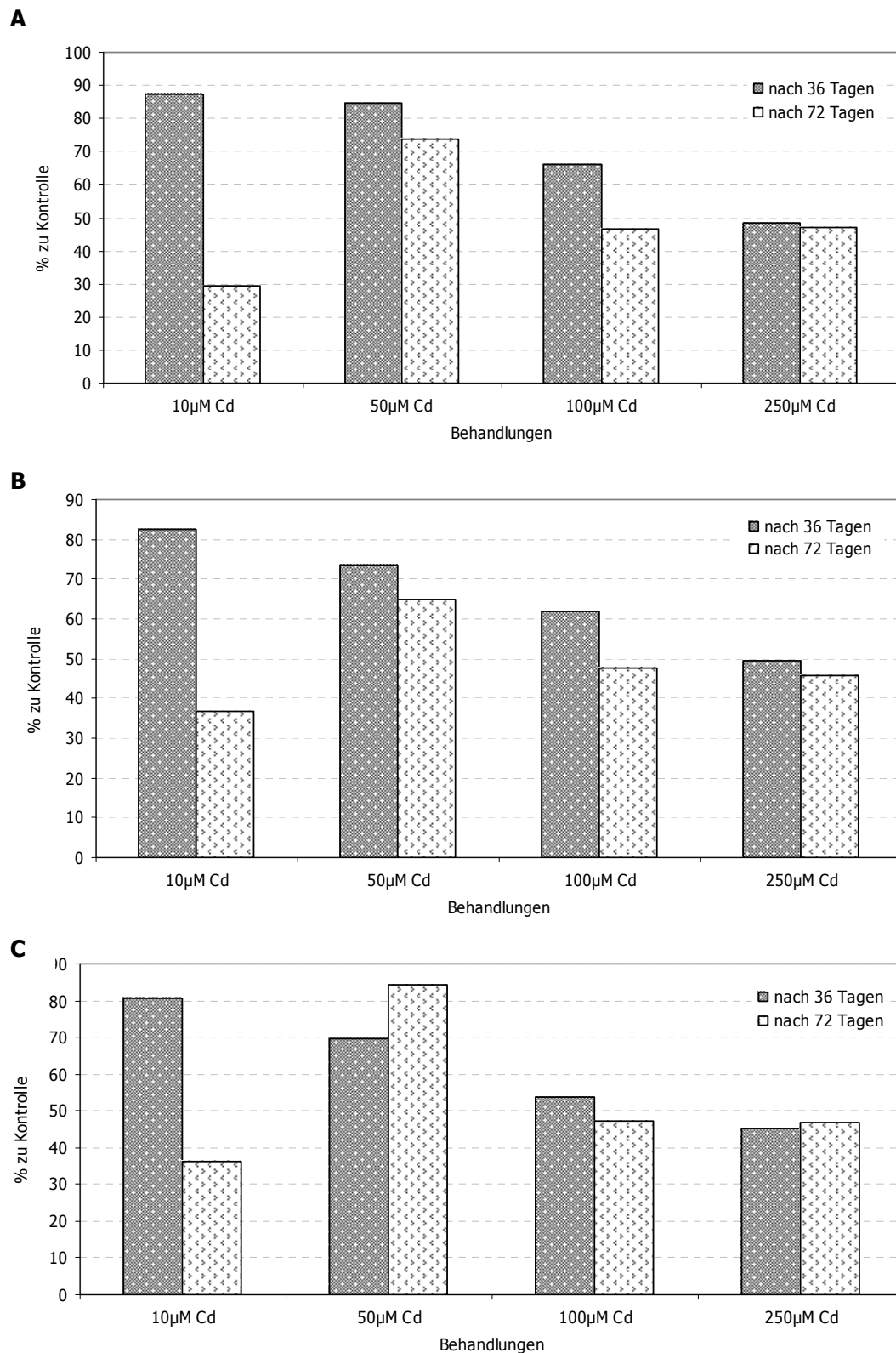
Am letzten Tag des Experiments wurde die Messung der Photosynthese-Rate wiederholt. Zu diesem Zeitpunkt konnten in den mit  $10\ \mu\text{M}$  Cd behandelten Pflanzen nur 30% der Photosynthese in der Kontrolle gemessen werden (Abbildung 42A). Bei den restlichen drei Behandlungen wurde auch eine stete Abnahme der Photosynthese in der Kontrolle beobachtet (Tabelle 37), aber die Werte waren bis zu 15% höher als die bei  $10\ \mu\text{M}$  Cd gemessenen. Die Photosynthese-Rate von *Typha latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit  $50\ \mu\text{M}$  Cd betrug 74% in der Kontrolle. Bei der  $100\ \mu\text{M}$  Cd-Behandlung konnten  $1,2\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  (47% der Kontrolle) und bei der  $250\ \mu\text{M}$  Cd  $1,3\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  (48% der Kontrolle) gemessen werden.

### 3.1.2.3.2 Transpiration und stomatäre Leitfähigkeit

Die Ergebnisse der Transpirations-Messungen sind mit denen der Photosynthese vergleichbar. Nach 36 Tagen Cd-Behandlung konnten in den mit  $10\ \mu\text{M}$  Cd behandelten Pflanzen Transpirationsraten von 82% der Kontrolle gemessen werden (Abbildung 42B). Das entspricht  $0,86\ \text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$  (Tabelle 37). Die Abnahme der Transpiration verläuft kontinuierlich weiter zu den höheren Cd-Konzentrationen. In den Pflanzen, die mit  $50\ \mu\text{M}$  Cd behandelt wurden, konnte nur knapp 50% ( $0,76\ \text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$ ) der Transpiration der Kontrolle gemessen werden (Abbildung 42B).

Ähnlich wie für die Photosynthese wurde eine starke Abnahme der Transpirations-Werte bei den mit  $10\ \mu\text{M}$  Cd behandelten Pflanzen festgestellt (Abbildung 42B). Hier konnte nur 37% der Transpiration der Kontrolle gemessen werden. Im Vergleich zu der gleichen Messung nach 36 Tagen war eine Reduktion der Transpiration von 45% festzustellen. Bei den restlichen drei Behandlungen waren die Differenzen zwischen den Messungen der beiden Zeitpunkte nicht so groß. Bei der Behandlung mit  $50\ \mu\text{M}$  Cd über 72 Tage konnte eine 35%ige Reduktion der Transpiration konstatiert werden. Das sind aber nur 8% weniger als bei der ersten Messung am Tag 36. Die Transpiration bei  $100\ \mu\text{M}$  Cd betrug  $0,21\ \text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$  (48% der Kontrolle) und bei der  $250\ \mu\text{M}$  Cd-Konzentration konnten  $0,20\ \text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$  (47% der Kontrolle) Transpiration gemessen werden (Abbildung 42B, Tabelle 37).

Weil die stomatäre Leitfähigkeit und die Transpiration in direkter Verbindung zueinander stehen, ist es zu erwarten, dass sie ähnliches Verhalten nach der Cd-Behandlung zeigen



**Abbildung 42** Netto Photosynthese (A), Transpiration (B), stomatäre Leitfähigkeit (C) von *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM und 250 µM Cd. Die Kontrolle enthält kein Cd. Die Messungen wurden durchgeführt nach 36 und 72 Tagen der Behandlung.

würden. Daher ist es klar, dass sich bei den Konzentrationen von 50 µM Cd und 250 µM Cd die Effekte bei 36 und 72 Tagen spiegelverkehrt zu den Ergebnissen der Transpiration

verhalten (Abbildung 42C) werden. Bei den Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  Cd und 100  $\mu\text{M}$  Cd bleiben die Reaktionen unverändert.

Die nach 36 Tagen bestimmten Werte für die stomatäre Leitfähigkeit lagen bei 80% (68,71  $\text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$ ) bei der 10  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung, 70% der Kontrolle (59,41  $\text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$ ) bei 50  $\mu\text{M}$  Cd, 55% (45,89  $\text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$ ) bei 100  $\mu\text{M}$  Cd und 46% der Kontrolle (38,52  $\text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$ ) bei der 250  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung (Abbildung 42 C, Tabelle 37).

**Tabelle 37** Photosynthese, Transpiration und stomatäre Leitfähigkeit in *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium. Die Daten wurden von  $n = 14$  (Kontrolle),  $n = 10$  (10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Cd) und  $n = 16$  (250  $\mu\text{M}$  Cd) erworben. Die Mittelwerte  $\pm$  die Standardabweichungen wurden von der entsprechenden Anzahl an behandelten Pflanzen berechnet.

	Kontrolle	10 $\mu\text{M}$ Cd	50 $\mu\text{M}$ Cd	100 $\mu\text{M}$ Cd	250 $\mu\text{M}$ Cd
36 Tage Behandlung					
Photosynthese ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )	4,34 $\pm$ 1,79	3,79 $\pm$ 2,09	3,67 $\pm$ 1,45	2,88 $\pm$ 2,04	2,11 $\pm$ 1,34
Transpiration ( $\text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$ )	1,04 $\pm$ 0,49	0,86 $\pm$ 0,56	0,76 $\pm$ 0,30	0,64 $\pm$ 0,43	0,52 $\pm$ 0,30
stomatäre Leitfähigkeit ( $\text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$ )	85,38 $\pm$ 58,39	68,71 $\pm$ 48,04	59,41 $\pm$ 29,34	45,89 $\pm$ 27,45	38,52 $\pm$ 23
72 Tage Behandlung					
Photosynthese ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )	2,73 $\pm$ 1,96	0,80 $\pm$ 0,19	2,01 $\pm$ 1,20	1,27 $\pm$ 0,62	1,29 $\pm$ 0,94
Transpiration ( $\text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$ )	0,47 $\pm$ 0,29	0,17 $\pm$ 0,11	0,31 $\pm$ 0,13	0,22 $\pm$ 0,12	0,22 $\pm$ 0,16
stomatäre Leitfähigkeit ( $\text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$ )	16,33 $\pm$ 12,22	5,92 $\pm$ 3,87	13,78 $\pm$ 9,55	7,75 $\pm$ 4,66	7,64 $\pm$ 6,81

Wie schon erwähnt, sind einige der Werte nach der 72tägigen Behandlung höher als nach 36 Tagen. Bei der 10  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung konnten 37% (6  $\text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$ ) der stomatären Leitfähigkeit der Kontrolle gemessen werden. Bei den mit 50  $\mu\text{M}$  Cd behandelten Pflanzen konnte aber nach 72 Tagen eine Zunahme der stomatären Leitfähigkeit von fast 15% im Vergleich zu den Werten, die nach 36 Tagen bestimmt wurden, gemessen werden (14  $\text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$ ). Die Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd hatte die gleichen Effekte wie bei der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Cd ausgelöst (Abbildung 42C) und der Wert der stomatären Leitfähigkeit nach 72 Tagen war höher als der, der nach 36 Tagen bestimmt werden konnte (8  $\text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$ ). Bezüglich der Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  Cd muss betont werden, dass die stomatäre Leitfähigkeit nach 36 Tagen erheblich niedrigerer war als nach dem 72. Tag (8  $\text{mmol}/\text{m}^2\text{s}$ ) (Abbildung 42C, Tabelle 37).

### 3.1.2.4 Änderungen des Frisch- und Trockengewichts in *Typha latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung

In der Tabelle 38 ist deutlich erkennbar, dass die Rhizome von *T. latifolia* über höhere FG und TG verfügen als die Blätter der gleichen Pflanzen nach der Behandlung. Während bei der Kontrolle, die nicht mit Cd behandelt worden war, das FG der *Typha latifolia*-Blätter einer Pflanze mehr als 78,27 g betrug, wogen die Rhizome der gleichen Probe 130,28 g. Etwa 80% aller *Typha latifolia*-Pflanzen, die in diesem Versuch verwendet worden waren, hatten vergilbte und trockene Blattmasse aufzuweisen. Diese seneszenten Blätter wurden gezielt bis zum Ende des Versuchs nicht von den Pflanzen getrennt, da sie als Merkmal für die Auswirkungen des Cadmiums auf die Seneszenz der Pflanze angesehen wurden. Diese trockenen Blätter stellten nur 5,75 g des gesamten FGs in den Kontrollen (214,3 g).

**Tabelle 38** FG, TG, Gesamt-Pflanzengewicht und Verhältnisse der einzelnen Gewichtsbestimmungen von *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit Cd. Die Daten wurden von n = 14 (Kontrolle), n = 10 (10 µM, 50 µM und 100 µM Cd) und n = 16 (250 µM Cd) erworben. Mittelwerte ± Standardabweichungen wurden aus der entsprechenden Zahl an behandelten *Typha latifolia*-Pflanzen berechnet.

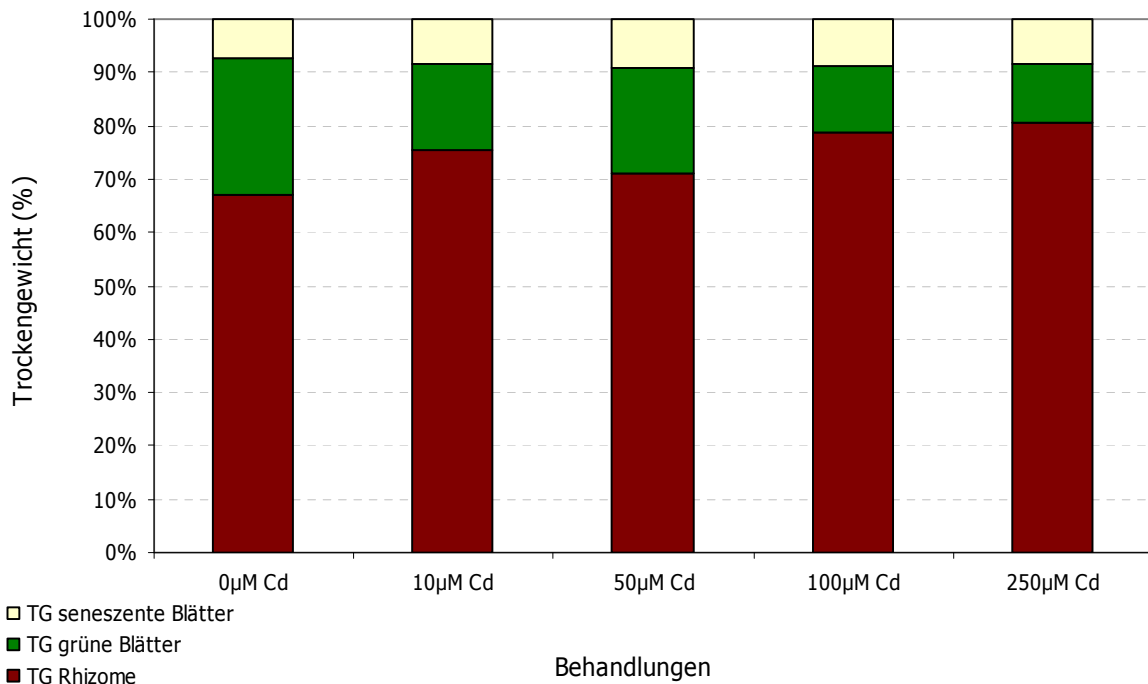
	Kontrolle	10 µM Cd	50 µM Cd	100 µM Cd	250 µM Cd
Frischgewicht (FG)					
grüne Blätter	78,27±18,40	47,20±14,03	46,22±19,44	34,60±10,47	31,56±8,43
seneszente Bl	5,75±2,86	7,69±3,03	5,85±1,80	5,78±2,45	6,11±2,40
Rhizome	130,28±52,85	141,84±50,18	111,43±41,92	123,46±38,55	130,18±44,69
Trockengewicht (TG)					
grüne Blätter	8,99±2,25	5,58±2,06	5,11±2,08	3,74±1,24	3,65±1,27
seneszente Bl	2,60±1,27	2,94±1,14	2,40±0,72	2,61±1,29	2,74±1,10
Rhizome	23,40±13,25	26,14±12,72	18,53±7,80	23,80±9,74	26,43±12,76
Gesamtgewicht					
FG Pflanze	214,3±62,55	196,73±68,94	163,49±55,28	163,84±61,34	167,87±65,53
TG Pflanze	34,99±10,69	34,66±12,70	26,04±8,64	30,21±11,90	32,81±13,42
Verhältnis					
FG/TG grüne Blätter	8,70	8,45	9,05	9,25	8,66
FG/TG senesz.Blätter	2,24	2,61	2,43	2,16	2,23
FG/TG Rhizome	5,56	5,42	6,01	5,18	4,92
Gesamt FG/TG	6,12	5,68	6,28	2,42	5,11
Blatt/Rhizom	0,49	0,33	0,41	0,27	0,24

Insgesamt war eine Tendenz der Abnahme des TGs zwischen der Kontrolle und einzelnen Cd-Behandlungen zu erkennen. Das FG der *Typha latifolia*-Blätter nach 10  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung lag bei 47,20 g, bei 50  $\mu\text{M}$  46,22 g, bei 100  $\mu\text{M}$  34,60 g und bei 250  $\mu\text{M}$  31,56 g. Es nahm also klar mit steigenden Cd-Konzentrationen ab.

Sehr interessant ist die Tatsache, dass die höchste Frischgewichtsmasse der seneszenten Blätter nicht bei der höchsten Cd-Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  Cd (6,11 g) festgestellt worden war, sondern nach der 100  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung (7,69 g). Dafür wurde in den Rhizomen das niedrigste FG in den mit 50  $\mu\text{M}$  behandelten Pflanzen festgestellt (111,43 g).

Die Tendenz zur Gewichtsabnahme von den höheren zu den niedrigeren Cd-Konzentrationen ist auch bei den TG der einzelnen untersuchten Proben verfolgbar. Dieser Effekt ist aber nicht mehr in den seneszenten Blättern oder in den Rhizomen der behandelten Pflanzen zu erkennen. Überraschend konnten bei den Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  (26,14 g) und 250  $\mu\text{M}$  (26,43 g) die höchsten TG bestimmt werden.

Bei den Berechnungen der Verhältnisse von FG zu TG bei den einzelnen *Typha latifolia*-Behandlungen wurde deutlich, dass die höchsten Werte immer bei der Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Cd vorlagen. Eine Ausnahme machte nur das FG/TG-Verhältnis bezüglich der seneszenten Blattmasse. In diesem Fall lag der höchste Wert bei der Behandlung bei 10  $\mu\text{M}$  Cd.



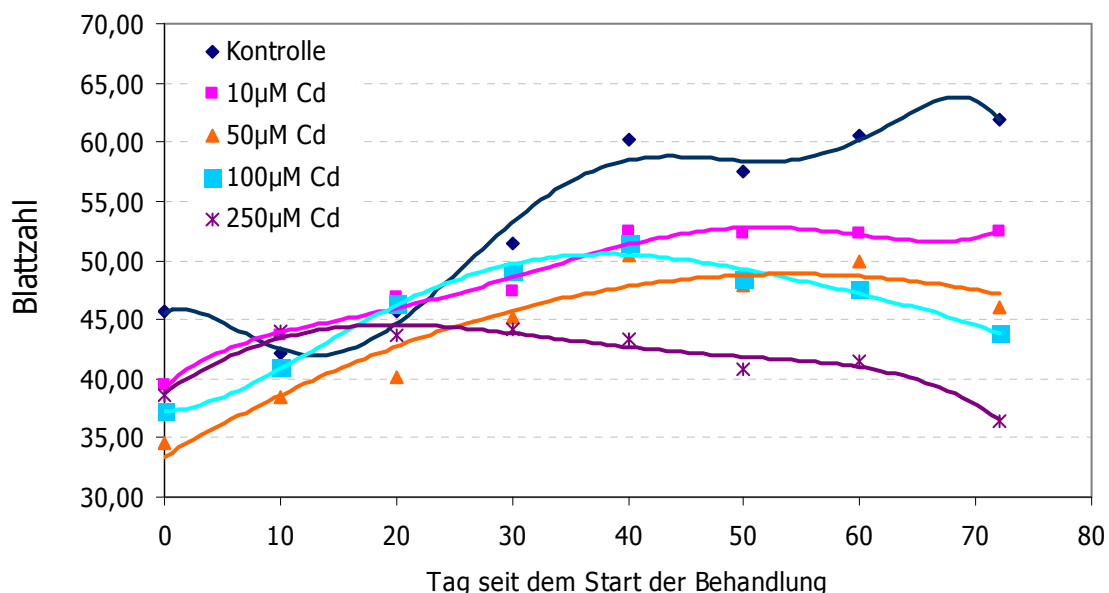
**Abbildung 43** Prozentuale Verteilung des TGs grüner und seneszenten Blätter von *T. latifolia* sowie auch von *T. latifolia*-Rhizomen nach 72tägiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Cd. Die Kontrolle enthält kein Cd.

Beim Vergleich der Blatt/Rhizom-TG-Verhältnisse nach den einzelnen Behandlungen ist eindeutig, dass das TG der Blattmasse mit der Erhöhung der Cd-Konzentration abnimmt. Dafür erhöht sich die prozentuale Gewichts-Zunahme der Rhizome in der gleichen Reihenfolge (Tabelle 38, Abbildung 43).

Bei der Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Cd konnte eine leichte Zunahme der Blattmasse um ca. 5% im Vergleich zu der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Cd festgestellt werden (Abbildung 43). Mit dem weiteren Anstieg der Cd-Konzentration nahm wieder die Blattmasse im Vergleich zur Rhizommasse ab. Der prozentuale Anteil der seneszenten Blätter an der Gesamtbiomasse von *Typha latifolia* blieb fast konstant über den ganzen Konzentrationsverlauf. Der Unterschied zwischen den Kontrollen und den Behandlungen ist mit 2% minimal (Abbildung 43).

### 3.1.2.5 Anzahl der Blätter bei *Typha latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit Cd

Über den ganzen Verlauf des Langzeitversuchs wurden Beobachtungen über die Veränderung der Blattzahl gemacht. Wie in der Abbildung 44 deutlich wird, nahm nur die Blattzahl in der Kontrolle kontinuierlich vom ersten bis zum letzten Tag der Behandlung zu.



**Abbildung 44** Veränderung der Blattzahl von *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium. Die Daten wurden von  $n = 14$  (Kontrolle),  $n = 10$  (10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Cd) und  $n = 16$  (250  $\mu\text{M}$  Cd) erworben. Die Mittelwerte  $\pm$  die Standardabweichungen wurden von der entsprechenden Zahl an behandelten *T. latifolia*-Pflanzen berechnet.

Es war eine leichte Abnahme der Anzahl von Blättern in den Kontrollen bis zum fünfzigsten Tag festzustellen, aber danach wurde dieser Rückgang aufgeholt. Während die Kontrollpflanzen von *Typha latifolia* bei dem Beginn des Versuchs im Mittel 46 Blätter hatten, waren bei der Ernte am Tag 72 durchschnittlich 63 Blätter vorhanden (Tabelle 39).

Bis zum Tag 40 beeinflusste Cd die Blattzahl nicht. Alle behandelten Pflanzen zeigten stabile Blattneubildung bis zum erwähnten Tag. Am Tag 40 nach dem Start des Versuchs konnten in allen drei Behandlungen im Durchschnitt zwischen 50 und 53 Blätter ausgezählt werden. Der Tag 50 schien ein Schwellenpunkt bei der Entwicklung von jungen Blättern zu sein. Ab dem erwähnten Tag 50 bis zu dem Tag der Ernte (Tag 72) hatten die *T. latifolia*-Pflanzen, die mit 10 µM Cd, behandelt wurden, eine konstante Anzahl von etwa 53 Blättern pro Pflanze. Zum gleichen Zeitpunkt konnte bei der Konzentration von 50 µM Cd eine deutlich geringere Blattzahl beobachtet werden. Ab Tag 60 kam es zu einem leichten Anstieg der Blattzahl. Am Tag der Ernte (Tag 72) waren aber nur noch 46 Blätter vorhanden.

**Tabelle 39** Mittelwert ± Standardabweichung der Blattzahl von *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM und 250 µM Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium. Mit 0 d ist die Blätterzahl beim Start des Versuchs gekennzeichnet worden. Die Blätterzahl wurde jeden 10-ten Tag kontrolliert. Es wurde ein gepaarter Student-T-Test mit zwei Freiheitsgraden durchgeführt. Die signifikanten ( $p < 0,01$ ) Änderungen zur Kontrolle am 72. d wurden in der Tabelle grün dargestellt.

	Kontrolle	10 µM Cd	50 µM Cd	100 µM Cd	250 µM Cd
0 d	45,64±7,9	39,4±11,6	34,6±6,9	37,2±5,9	38,6±
nach 10 d	42,14±10,8	43,6±11,6	38,4±7,2	40,9±6,5	43,94±9,4
nach 20 d	45,64±7,9	46,8±11	40,2±9,8	46,3±6,3	43,63±7,7
nach 30 d	51,5±12,3	47,3±8,9	45,2±7,6	49,1±5,6	44,25±6,4
nach 40 d	60,14±13,2	52,4±9,2	50,5±7,6	51,5±4,8	43,38±5,3
nach 50 d	57,43±10,1	52,2±9,4	47,9±8,9	48,4±4,5	40,81±6,2
nach 60 d	60,5±9,3	52,3±9	50±10,9	47,5±5,2	41,5±5,5
nach 72 d	61,86±12,6	52,4±10,7	46,1±9,9	43,8±8,7	36,44±5,2

Der Verlauf der Blattentwicklung bei der Konzentration von 100 µM Cd ist ähnlich wie bei der Konzentration von 50 µM Cd mit einer durchschnittlichen Zahl von 48 Blättern pro Pflanze.



Die hohen Cd-Konzentrationen führten aber dazu, dass die Pflanzen am Tag 72 nur über 43 Blätter pro Pflanze verfügen.

Die Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  Cd verursachte ganz andere Effekte auf das Blattwachstum. Bis zum 10. Tag nach dem Start des Versuchs konnte eine leichte Zunahme der Blattzahl bestimmt werden (45 Blätter pro behandelter Pflanze im Durchschnitt). Diese Zahl blieb für die nächsten 20 Tage konstant. Nach dem 40. Tag der Behandlung bis zum Abschluss konnte eine 20% geringere Blattzahl nachgewiesen werden. Nach 50 und 60 Tagen war diese Verringerung der Blattzahl mit 45% noch gravierender (Tabelle 39). Am Ende des Versuchs konnten nur noch 69% der Blattzahl in der Kontrolle gefunden werden (61,86 Blätter der Kontrolle gegen 36,44 Blätter der Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  Cd).

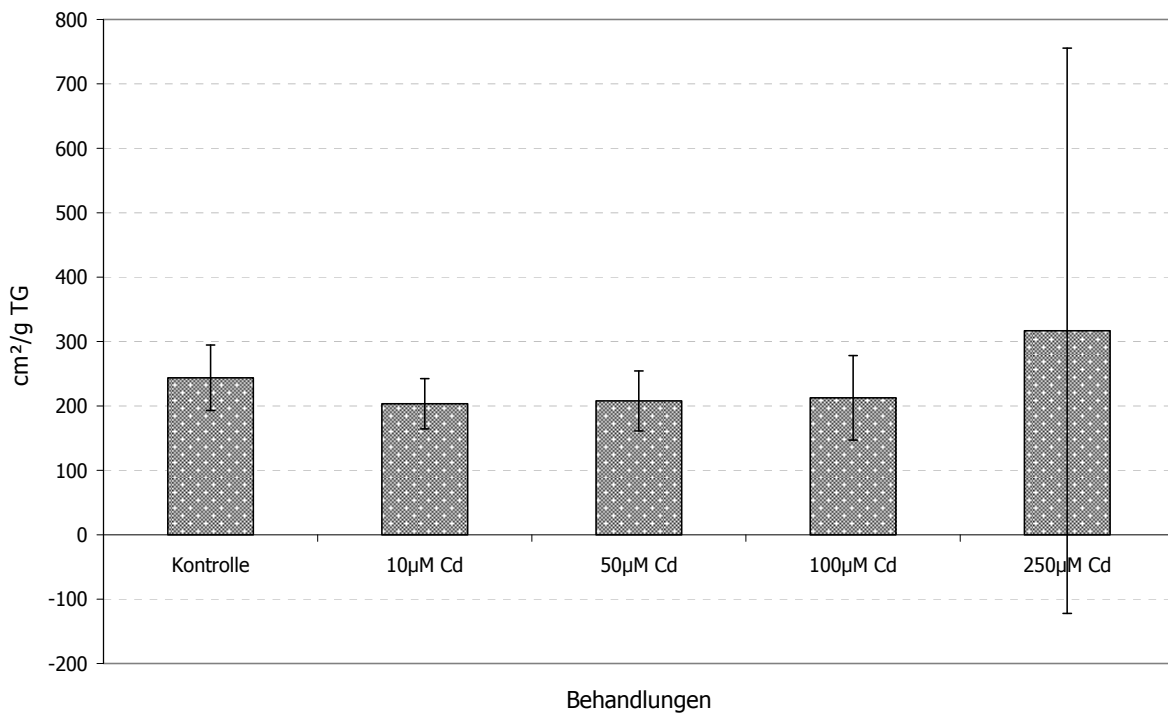
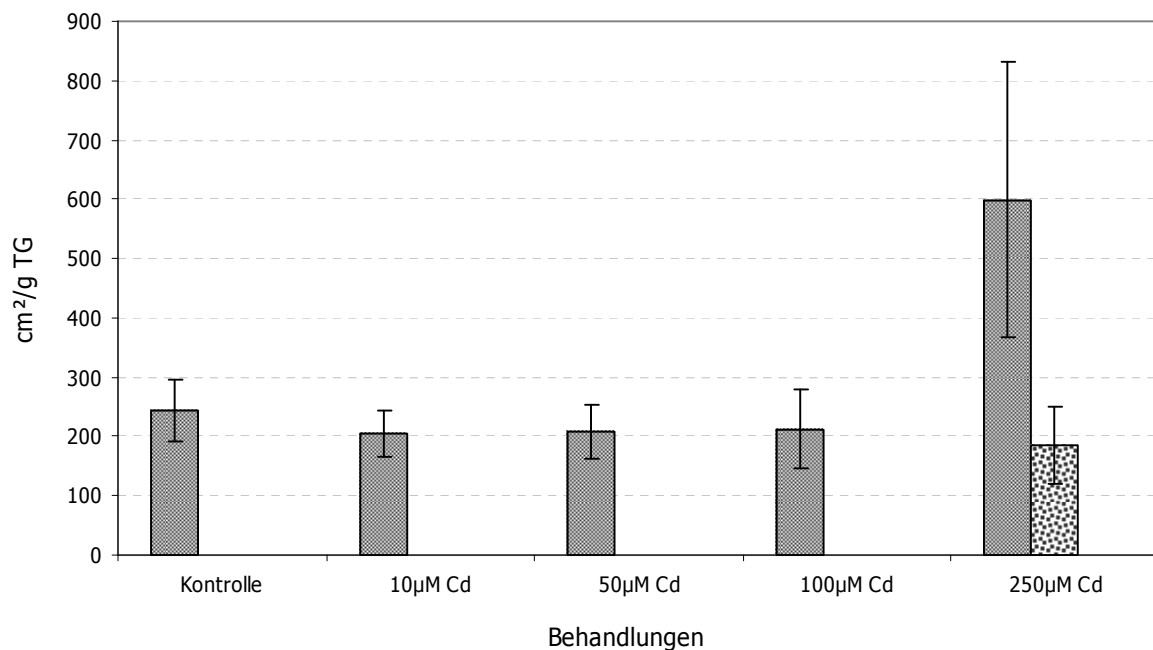
Die Veränderung der Blattzahl ist in allen Behandlungen am 72. Tag des Versuchs zu  $p < 0,01$  signifikant gegenüber der Kontrolle und zwischen den einzelnen Behandlungen (Tabelle 39).

### **3.1.2.6 Untersuchung der Veränderung der Blattfläche in *Typha latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit Cd**

Um weitere Information über den Einfluss von Cd auf die physiologischen Merkmale der behandelten *T. latifolia*-Pflanzen zu bekommen, wurde auch die Veränderung der Blattfläche am 72. Tag der Behandlung bestimmt. Wie in Abbildung 45B zu beobachten ist, konnten keine Unterschiede zwischen einzelnen Behandlungen festgestellt werden. Die geringe Abnahme der Blattfläche behandelter Pflanzen gegenüber der Kontrolle war nicht signifikant.

Die Abbildung 45 wurde in zwei Varianten als A und B dargestellt, weil nur in dieser Form ein sehr interessanter Effekt sichtbar gemacht werden kann. Wie in der Abbildung 45A zu beobachten ist, sind die Unterschiede zwischen den Blattflächen den untersuchten Pflanzen einer Behandlung nicht besonders groß. Die Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Cd hatten die gleichen Auswirkungen auf die Blattfläche. Bei der Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  Cd aber traten sehr starke Unterschiede zwischen den Flächen der einzelnen Blätter auf. Das ist die Ursache für die große Standardabweichung.

Wenn aber die einzelnen Messungen näher betrachtet werden, wird sichtbar, dass es offenbar zwei Gruppen von Blättern gibt (Abbildung 45B). In die erste Gruppe fallen 70% aller *Typha latifolia*-Blätter aus der Behandlungsreihe mit 250  $\mu\text{M}$  Cd. In der zweiten Gruppe befinden sich die restlichen 30% der Blätter dieser Behandlung. Die Mehrheit der Blätter dieser Behandlung zeigt die gleichen Blattflächen wie bei den Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Cd. Die Blattfläche der Kontrollblätter beträgt 244  $\text{cm}^2/\text{g}$  TG. Die Blätter der Behandlungen von 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Cd verfügen über 203  $\text{cm}^2/\text{g}$  TG, 208  $\text{cm}^2/\text{g}$  TG und 213  $\text{cm}^2/\text{g}$  TG (Tabelle 40). Nur ein geringer Anteil der Rohrkolbenblätter

**A****B**

**Abbildung 45** Veränderung der Blattfläche in cm<sup>2</sup>/TG von *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM und 250 µM Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium. Die Darstellung der Blattfläche zeigt bei der Konzentration von 250 µM Cd zwei Balken, weil bei dieser Konzentration zwei stark voneinander abweichende Gruppen von Blättern festgestellt wurden. 70% aller vermessenen Blätter bei 250 µM Cd (in der Graphik punktiert) weisen eine Abnahme der Blattfläche im Vergleich zu den niedrigeren Cd-Konzentrationen der Behandlung auf. 30% der Blätter (in der Graphik im Raster) zeigen keine Verringerung der Blattfläche nach Cd-Behandlung.

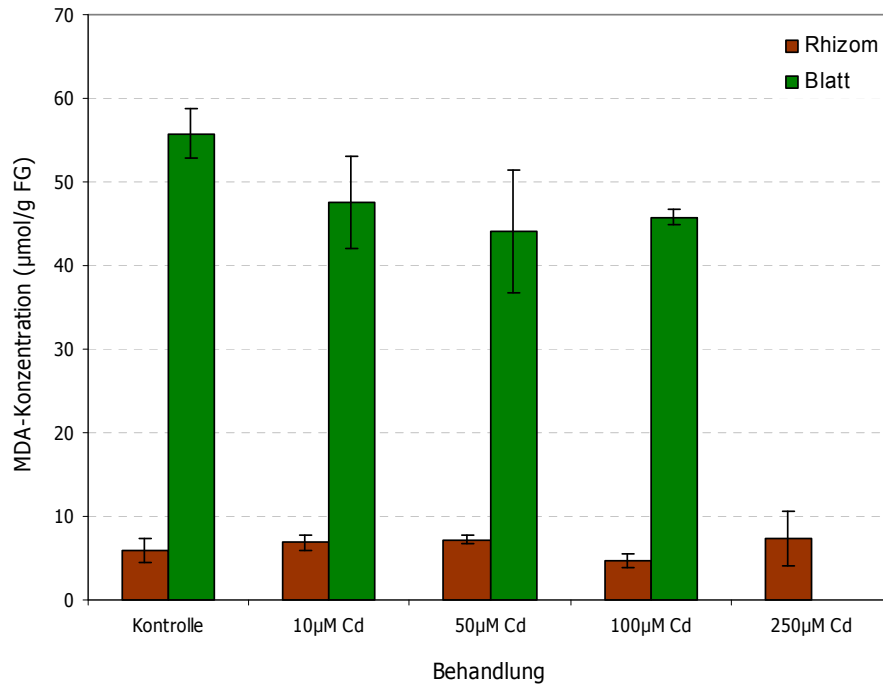
nach der Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  Cd schien keinem Einfluss von Cd zu unterliegen. Diese Blätter waren so lang wie die der Kontrollpflanzen und verfügten über die dreifache Blattfläche. Die Blattfläche der Mehrheit der Blätter nach der Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  Cd betrug 186,27  $\text{cm}^2/\text{g}$  TG (Tabelle 40). Die restlichen 30% der Blätter dieser Behandlung zeigten keine Verringerung des Expansionswachstums und darum auch eine größere Blattfläche: 598,54  $\text{cm}^2/\text{g}$  TG (Tabelle 40). Das Verhältnis der Blattfläche/FG nach der Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  Cd war 107,70  $\text{cm}^2/\text{g}$  FG für 30% der Blätter; 32,44  $\text{cm}^2/\text{g}$  FG (Tabelle 40) für die restlichen 70% der behandelten Blätter. Weil bei den Blattflächen der Pflanzen nach der Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Cd keine signifikanten Unterschiede auftraten (siehe die Standardabweichungen in der Tabelle 40), war es nicht notwendig, deren Blattflächen in zwei Gruppen zu unterteilen. Dies ist mit den Werten der FG und TG der behandelten *Typha latifolia*-Pflanzen (Tabelle 40) korrelierbar.

**Tabelle 40** Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Blattfläche von *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium. Bei den Konzentrationen bis 100  $\mu\text{M}$  Cd wurden andere Blattflächenverhältnisse festgestellt. Es war nicht notwendig eine zweite Gruppe zu bilden. Die Daten wurden von  $n = 14$  (Kontrolle),  $n = 10$  (10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Cd) und  $n = 16$  (250  $\mu\text{M}$  Cd) erworben. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen wurden von der entsprechenden Zahl an behandelten Pflanzen berechnet.

Blattfläche	Kontrolle (alle Blätter)	10 $\mu\text{M}$ Cd (alle Blätter)	50 $\mu\text{M}$ Cd (alle Blätter)	100 $\mu\text{M}$ Cd (alle Blätter)	250 $\mu\text{M}$ Cd (30%/70% der Blätter)
$\text{cm}^2/\text{g}$ FG	34,86 $\pm$ 5,38	32,19 $\pm$ 4,36	34,11 $\pm$ 4,68	32,87 $\pm$ 6,06	107,71 $\pm$ 67,82/ 32,44 $\pm$ 36,22
$\text{cm}^2/\text{g}$ TG	243,71 $\pm$ 50,84	203,42 $\pm$ 39,01	207,73 $\pm$ 46,61	212,53 $\pm$ 65,56	598,54 $\pm$ 231,94/ 186,27 $\pm$ 64,57

### 3.1.2.7 MDA-Konzentration in *Typha latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung

Wie in der Abbildung 46 zu erkennen ist, gibt es in den behandelten Rhizomen keine Effekte, die auf eine extreme Malondialdehydbildung hinweisen würden. Bei der Cadmiumkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  konnte sogar eine niedrigere MDA-Konzentration bestimmt werden als bei der Kontrolle. Bei einem Vergleich der behandelten Blattproben von *Typha latifolia* ist deutlich erkennbar, dass alle Behandlungen zu einer Abnahme der Konzentration im Vergleich zur Kontrolle geführt haben. Sogar die hohe Cadmiumkonzentration von 250  $\mu\text{M}$  konnte keine extreme Malondialdehydbildung bewirken.



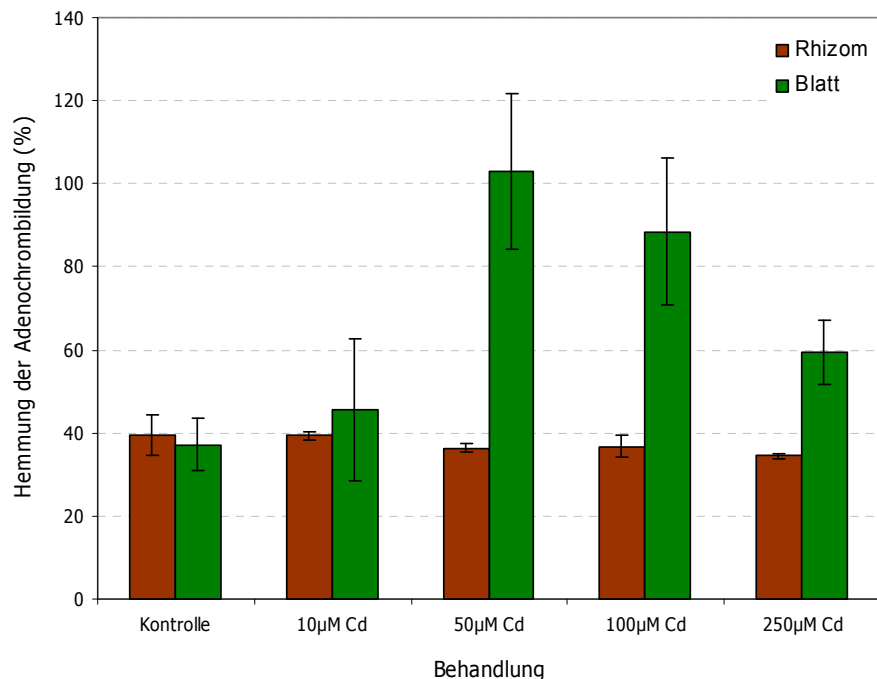
**Abbildung 46** MDA-Konzentration der Rhizome und der Blätter von *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM und 250 µM Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± die Standardabweichung von drei parallel behandelten Proben. Die MDA-Konzentration bei 250 µM Cd in den Blättern konnte wegen Pflanzenmaterialmangel nicht gemessen werden.

### 3.1.2.8 SOD-Aktivität in *Typha latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung

Die Superoxiddismutase (SOD) ist ein Enzym, das die Zellen vor reaktiven Sauerstoffspezies schützt. Die für die Pflanzen giftigen Sauerstoffradikale werden mittels SOD in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid umgewandelt.

Die in der Abbildung 47 dargestellten Ergebnisse zeigen nicht die Superoxide in den Pflanzenextrakten, sondern die prozentuale Hemmung der Adenochrombildung als Maß für die Superoxiddismutase-Aktivität. Diese Hemmung ist der SOD-Aktivität proportional. Wie später bei der Katalase beschrieben wird, nehmen mit steigenden Cadmiumkonzentrationen auch die SOD-Aktivitäten in den Rhizomen leicht ab. Die Veränderungen schwanken um die Kontrollwerte. In diesem Fall waren die stärkeren Effekte auch erst bei den mittleren und höheren Behandlungskonzentrationen festzustellen. Die größte Hemmung der Adenochrombildung konnte in den Blätterextrakten bei der Konzentration von 100 µM gemessen werden. Danach war eine leichte Abnahme dieser Hemmung bis zu 250 µM Cd-Konzentration festzustellen. Die Aktivitäten sind aber ohnehin höher als die in der Kontrolle. Die Werte von 50 und 100 µM Konzentration des Cadmiums sind signifikant höher als die der Kontrolle. Die

größeren Unterschiede in der Hemmung waren bei den Blättern und den Rhizomen bei Metallkonzentrationen ab 100  $\mu\text{M}$  abwärts zu sehen.



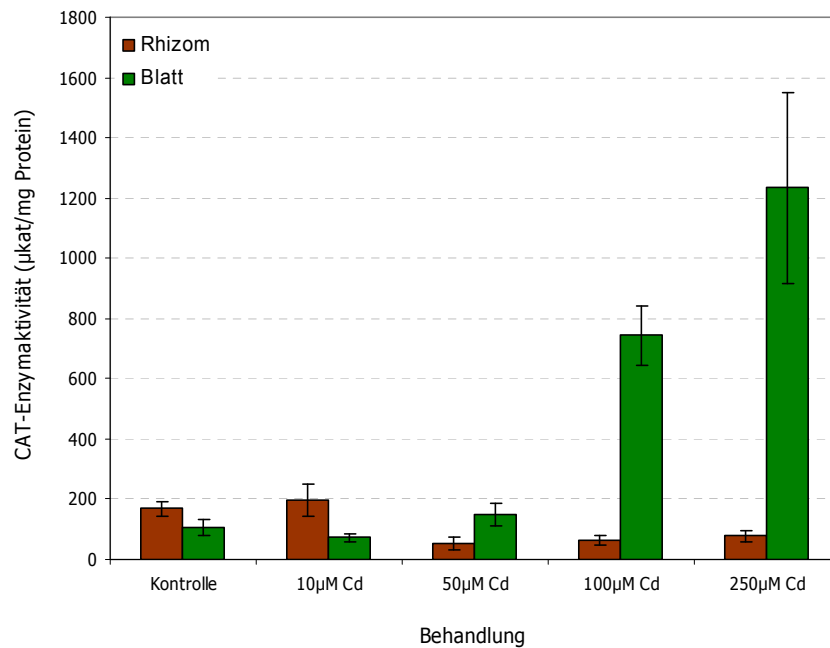
**Abbildung 47** Hemmung der Adenochrombildung von *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung von drei parallel behandelten Proben.

### 3.1.2.9 CAT-Aktivität in *Typha latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung

Die Katalase (CAT) ist ein Zeichen dafür, wie viel oxidativen Stress die behandelte Pflanze hatte. Sie hilft bei der Umwandlung des pflanzengiftigen Wasserstoffperoxids zu Wasser und Sauerstoff. Je höher die Enzymaktivität der Katalase ist, desto höher kann die Belastung der Pflanze mit Wasserstoffperoxid angenommen werden.

Wie in der Abbildung 48 zu sehen ist, waren die *Typha latifolia*-Rhizome insgesamt weniger vom Wasserstoffperoxid beeinflusst als die mit der gleichen Konzentration behandelten Blätter. Der einzig induzierende Effekt auf die Katalase in den untersuchten Rhizomen wurde bei der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  gemessen. Mit der Steigerung der Cadmiumkonzentration wurde eine Hemmung der Katalase-Enzymaktivitäten sichtbar.

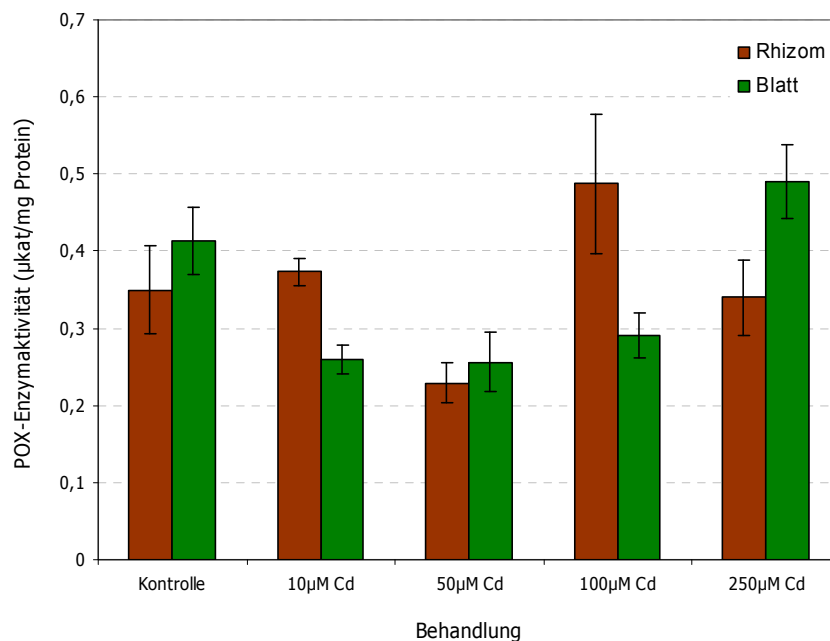
Bezogen auf die Blattenzymaktivitäten soll vermerkt werden, dass die höchsten Katalase-Aktivitäten bei den höheren Metallkonzentrationen festgestellt wurden. Insgesamt waren die Enzymaktivitäten in den Blättern bei den höchsten Cadmiumkonzentrationen bis zu 8mal höher als die spezifischen Katalase-Aktivitäten bei den entsprechend niedrigeren Metallkonzentrationen.



**Abbildung 48** Spezifische CAT-Aktivität der Rhizome und Blätter von *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM und 250 µM Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± die Standardabweichung von drei parallel behandelten Proben.

### 3.1.2.10 POX-Aktivität in *Typha latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung

In der Abbildung 49 sind die spezifischen Enzymaktivitäten der Rhizome und Blätter für Guajacol-Peroxidasen (POX) dargestellt.

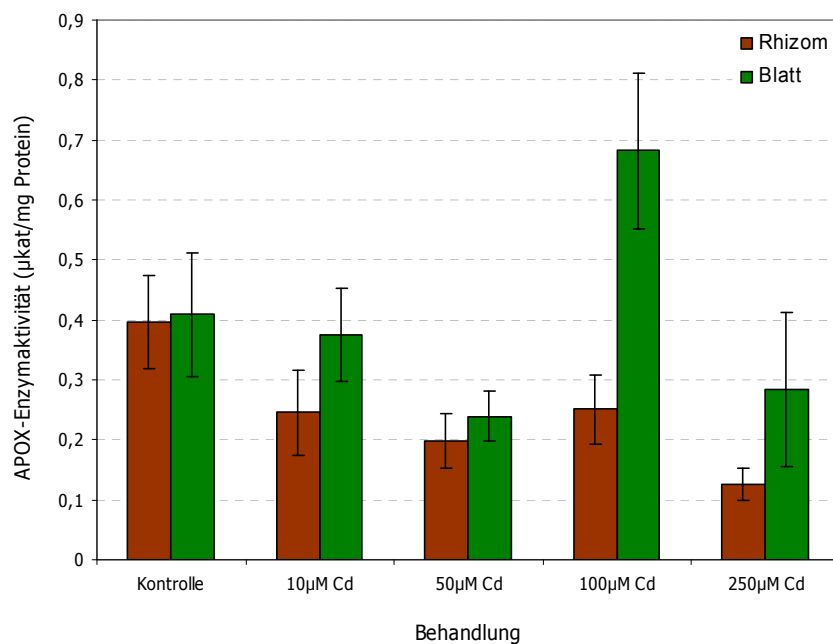


**Abbildung 49** Spezifische POX-Aktivität in Rhizomen und Blättern von *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM und 250 µM Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± die Standardabweichung von drei parallel behandelten Proben.

Es ist deutlich erkennbar, dass die Werte in den Rhizom- und Blätterproben um die Aktivitäten der Kontrollen schwankten, aber vorwiegend darunter lagen. Wie bei den Rhizomen, so wurden auch bei den Blättern die niedrigsten Enzymaktivitäten der POX bei der Cadmiumkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  bestimmt. Die höchsten Aktivitäten wurden in Rhizomproben bei 100  $\mu\text{M}$  Cd und bei den Blättern bei 250  $\mu\text{M}$  Cd in der Nährlösung gemessen.

### 3.1.2.11 APOX-Aktivität in *Typha latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung

Die spezifische Ascorbatperoxidase-Aktivität (APOX) ist in der Abbildung 50 dargestellt. Hier wurde generell eine zunehmende Hemmung der Aktivität beobachtet, wenn diese auch bei den niedrigeren Metallkonzentrationen nicht immer signifikant war. In Blättern wurde nach der Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  Cd eine starke Steigerung der Enzymaktivität beobachtet.



**Abbildung 50** Spezifische APOX-Aktivität der Rhizome und der Blätter von *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung von drei parallel behandelten Proben.

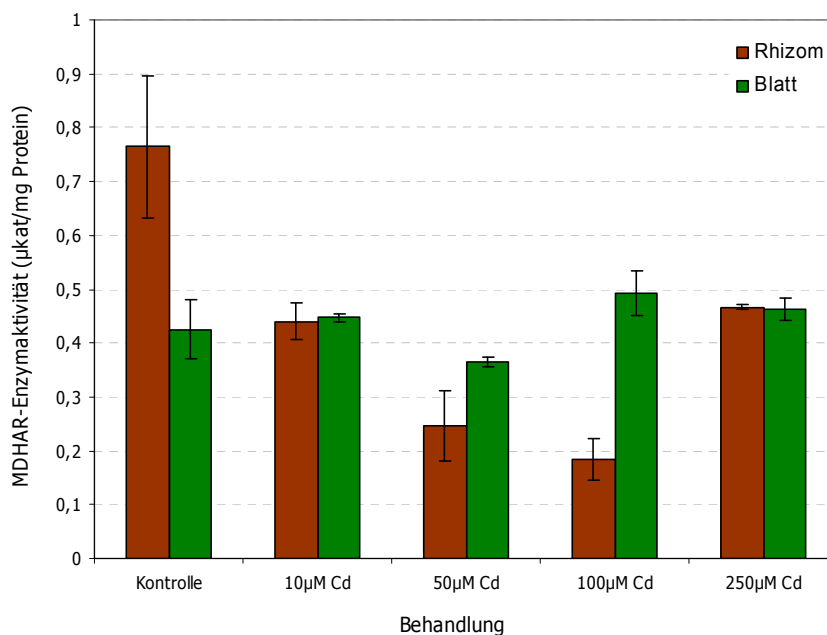
Verglichen mit der gesamten Peroxidaseaktivität war hier eine klare Abnahme, vor allem der Rhizomaktivitäten, bei allen Behandlungen festzustellen. Im Durchschnitt lagen die ermittelten Ascorbat-Peroxidase-Aktivitäten um 20% niedriger als die der gesamten Peroxidase-Aktivität (POX). Anscheinend ist bei Gabe von 100  $\mu\text{M}$  Cadmium die Blattmasse genügend mit Metall angereichert, um eine Stressreaktion der Entgiftungskaskade starten zu können.

Möglicherweise ist bei 250  $\mu\text{M}$  Cd die Entgiftungsgrenze überschritten. Die gleichen Schlussfolgerungen können bezüglich der Rhizomwerte gemacht werden.

### 3.1.2.12 MDHAR-Aktivität in *Typha latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung

Die spezifische Monodehydroascorbatreduktase-Aktivität (MDHAR) ist in Abbildung 51 dargestellt. Die MDHAR-Aktivität unterschied sich wesentlich von der im folgenden Abschnitt gezeigten DHAR-Aktivität. Zum einen waren die Aktivitäten wesentlich niedriger als die der DHAR, zum anderen war die Blattaktivität der Kontrolle niedriger als die der Rhizome.

Bei diesen Enzymaktivitäts-Messungen in den Blättern konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Bei den Enzymextrakten der Rhizome ist hingegen eine starke Abnahme der Enzymaktivität bis zu 100  $\mu\text{M}$  Cd zu erwähnen. Bei 250  $\mu\text{M}$  Cd war wieder eine Erhöhung auf 50% des Kontrollwerts zu verzeichnen.



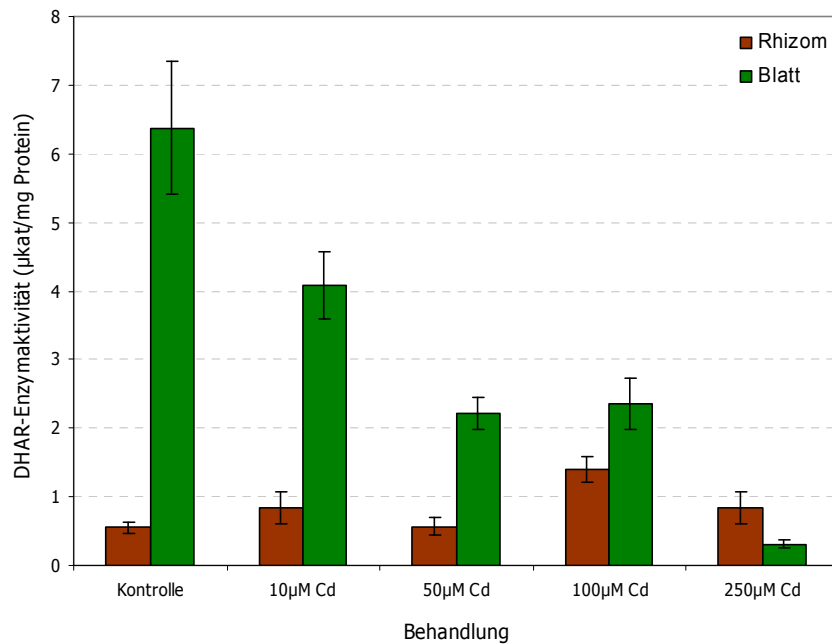
**Abbildung 51** Spezifische MDHAR-Aktivität der Rhizome und der Blätter von *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung von drei parallel behandelten Proben.

Die MDHAR und die DHAR sind in den Chloroplasten und im Cytosol, den Mitochondrien und im Appoplasten vertreten (Mittler, 2002). Während die MDHAR zur Nachlieferung von Ascorbat benutzt wird, besteht die Rolle der DHAR hingegen darin, Ascorbat und GSSG nachzubilden. Damit ist die DHAR am Glutathionverbrauch beteiligt.



### 3.1.2.13 DHAR-Aktivität in *Typha latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung

Bei der Dehydroascorbatreduktase-Aktivität (DHAR) in den Rhizomen und den Blättern von *Typha latifolia* waren klare Tendenzen erkennbar (Abbildung 52). Während in den Rhizomen eine tendenzielle Erhöhung der Enzymaktivität zu beobachten war, war in den Blättern zugleich eine starke und hoch signifikante Abnahme dieser Aktivität zu verzeichnen. Das ist gerade entgegengesetzt wie bei der beschriebenen MDHAR-Aktivität.



**Abbildung 52** Spezifische DHAR-Aktivität der Rhizome und der Blätter von *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM und 250 µM Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± die Standardabweichung von drei parallel behandelten Proben.

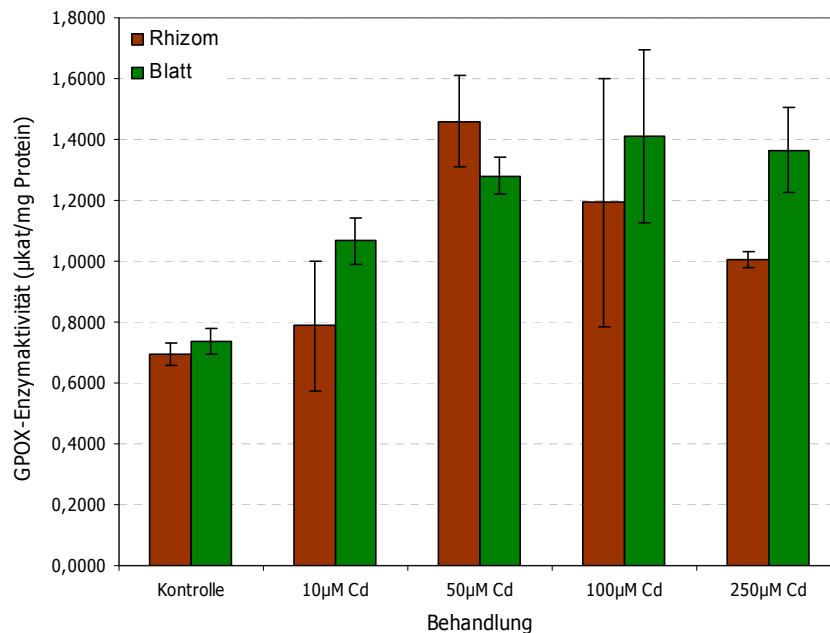
Die höchste Dehydroascorbatreduktase-Aktivität in den Rhizomen wurde bei der 100 µM Cd-Konzentration gemessen und lag bei 1,4 µkat/mg Protein. Dies ist signifikant gegenüber der Kontrolle. Die Enzymaktivitäten bei 10, 50 und 250 µM waren ungefähr gleich hoch.

In den Enzymextrakten der Blattproben war die DHAR-Aktivität bei allen Behandlungsstufen signifikant gegenüber der Kontrolle niedriger. Anscheinend ist bereits die niedrigste Metallkonzentration ausreichend, um die Dehydroascorbatreduktaseaktivität zu hemmen.

### 3.1.2.14 GPOX-Aktivität in *Typha latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung

Die Glutathionperoxidasen (GPOX) sind die nächsten Enzyme der Peroxidasenfamilie, die für die Entgiftung der gefährlichen Substanzen in den Pflanzen verantwortlich sind. Diese Enzymgruppe hatte die höchsten Aktivitäten in *T. latifolia*-Pflanzen. Sie sind zum Teil doppelt so hoch (Abbildung 53) wie die Aktivitäten der POX und der APOX. Bei den Enzymaktivitäten

in den Rhizomproben ist eine wesentliche Steigerung bis zur Cd-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  zu erwähnen. Hier befindet sich auch das Aktivitätsmaximum der Rhizome: 1,45  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Die Enzymaktivitäten bei 50 und 250  $\mu\text{M}$  Cd sind noch immer signifikant höher als in der Kontrolle.

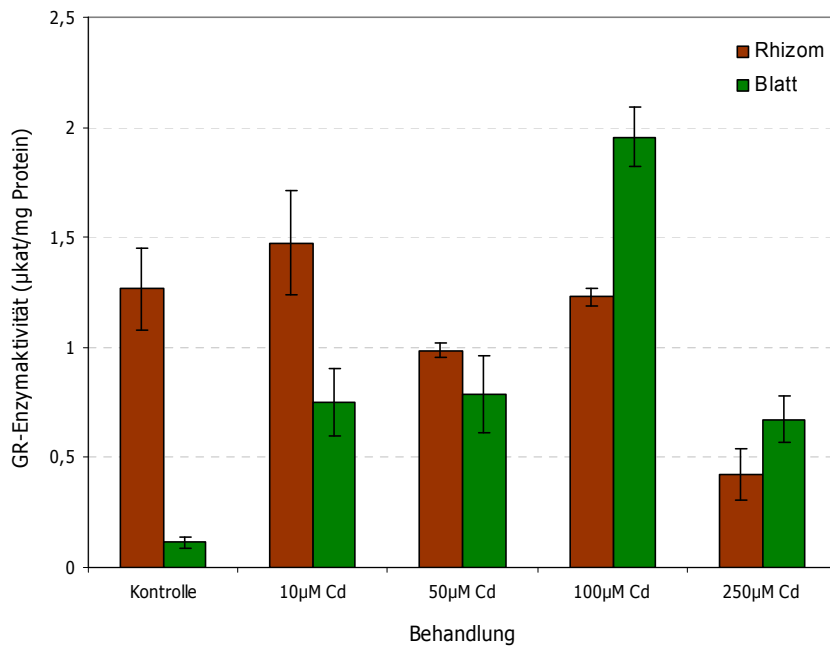


**Abbildung 53** Spezifische GPOX-Aktivität der Rhizome und der Blätter von *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung von drei parallel behandelten Proben.

Die GPOX-Aktivitäten der Blattproben sind im höheren Cadmiumkonzentrationsbereich signifikant höher als die Kontrollaktivitäten. Die drei Werte schwankten an der Grenze zwischen 1,1 und 1,6  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Bei der Enzymaktivität der Blätter bei 250  $\mu\text{M}$  Cd war der Unterschied bezüglich der entsprechenden Inkubation am deutlichsten.

### 3.1.2.15 GR-Aktivität in *Typha latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung

Zwischen den einzelnen Behandlungen in *T. latifolia* sind klare Unterschiede der Glutathionreduktaseaktivitäten (GR) zu verfolgen (Abbildung 54). Cadmium verursachte aber verschiedene Effekte in den Rhizomen und in den Blättern von Rohrkolben in Abhängigkeit von der aufgenommenen Metallmenge. Bei den Rhizomextrakten waren die Enzymaktivitäten bis 100  $\mu\text{M}$  Cd annähernd gleich, danach nahm die GR-Aktivität deutlich ab.



**Abbildung 54** Spezifische GR-Aktivität der Rhizome und der Blätter von *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM und 250 µM Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± die Standardabweichung von drei parallel behandelten Proben.

Was die Blätter betrifft, so waren die Effekte umgekehrt. Dort wurde eine Erhöhung der Enzymaktivität bis zur Cadmiumkonzentration von 100 µM erreicht und danach diese Aktivität bis 250 µM Cd abgebaut. Die Aktivitäten aller *Typha latifolia*-Behandlungen in den Blättern waren signifikant höher als in den Kontrollen.

### 3.1.2.16 Untersuchung der Glutathiongehalte in *Typha latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung

Neben den antioxidativen Enzymen ist der Glutathionshaushalt sehr wichtig für die Pflanzen. Er ist für die ständige Nachlieferung von reduziertem Glutathion verantwortlich und schützt somit ebenfalls von oxidativem Stress.

Wie in der Tabelle 41 ersichtlich, verfügte die Blatt-Kontrolle über den höchsten GSH-Wert (830,59 nmol/g FG) aller Proben, während die mit Cadmium behandelten Blätter niedrigere GSH-Konzentrationen hatten. Die *Typha latifolia*-Blattproben der 10 µM Cd-Behandlung verfügten über 77,98 nmol/g FG GSH, was nur 9% der Kontrolle entspricht (Abbildung 55).

Dieser niedrige Wert von 9% blieb auch bei den Blatt-Proben der 50 µM-Behandlung erhalten (82,80 nmol/g FG). Bei den 100 µM Cd behandelten Blättern war die Abnahme des GSH-Gehaltes mit 20,16 nmol/g FG auf nur 2,5% des Kontroll-Gehalts am stärksten (Abbildung 55). Es ist sehr interessant, dass die Blätter nach der 100 µM Cd sich ein wenig

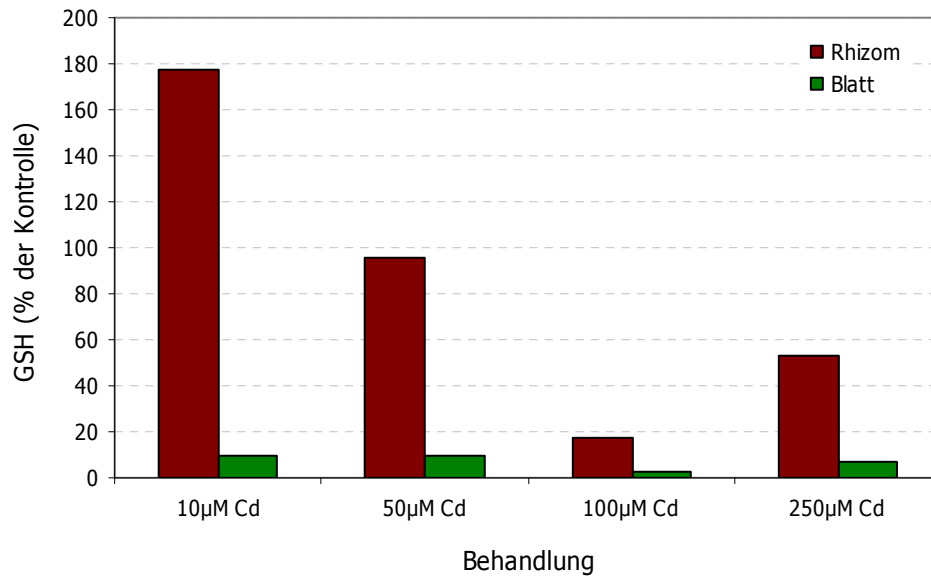
erholt zu haben schienen und GSH-Konzentrationen von 58 nmol/g FG (7%) aufwiesen (Tabelle 41).

**Tabelle 41** Glutathiongehalte in nmol/g FG in *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM und 250 µM Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium. Der Mittelwert ± die Standardabweichung repräsentiert drei parallel behandelte Proben.

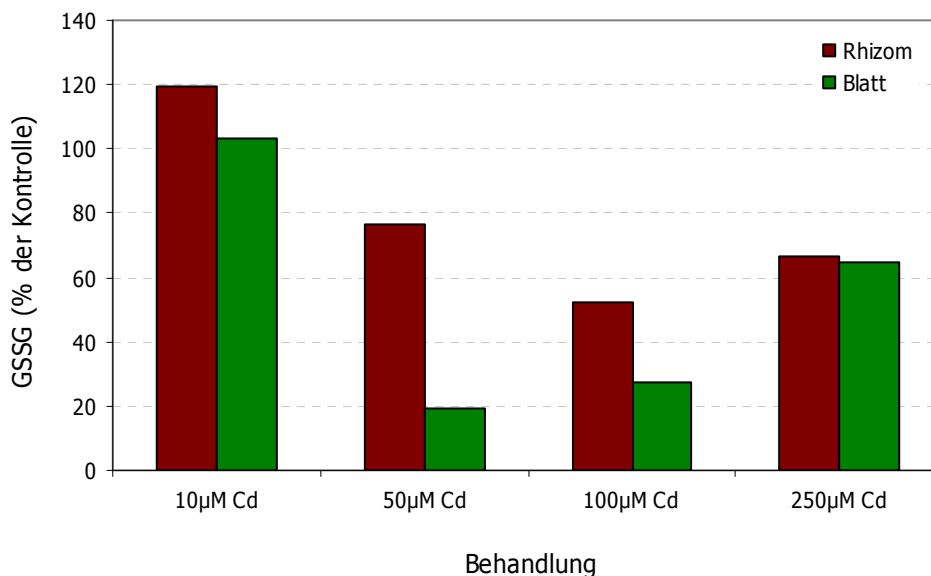
(nmol/g FG)	Kontrolle	10 µM Cd	50 µM Cd	100 µM Cd	250 µM Cd
Rhizomproben					
GSH	282,18±131,41	501,6±127,38	270,13±87,19	48,04±24,23	149,39±47,2
GSSG	33,33±15,95	39,91±12,93	25,59±12,55	17,37±2,84	22,26±6,49
GSH/GSSG	8,47	12,60	10,56	2,77	6,71
Blattproben					
GSH	830,59±224,56	77,98±15,92	82,80±38,01	20,16±13,43	57,99±20,14
GSSG	28,34±4,45	29,25±9,28	5,54±2,33	7,78±2,11	18,31±6,08
GSH/GSSG	29,31	2,67	14,94	2,59	3,17

Die Ergebnisse zum GSH-Haushalt der Rhizome sind im Prinzip denen der Blätter ähnlich. Der größte Unterschied, der hier auftrat, war die höhere GSH-Konzentration (Tabelle 41, Abbildung 55). Während die GSH-Konzentration in der Kontrolle 282 nmol/g FG betrug, konnte nach 10 µM Cd-Behandlung 501 nmol/g FG (178% der Kontrolle) bestimmt werden. Bei der Konzentration von 50 µM Cd wurden in den Rhizomen von *T. latifolia* die Gehalte der Kontrolle erreicht (96% der Kontrolle). Die nächste Behandlung mit 100 µM Cd reduzierte den GSH-Gehalt bis auf 17% der Kontrolle (48 nmol/g FG). Wie auch bei den Blättern nach der Behandlung mit 250 µM, wurde bei dieser Konzentration in den Rhizomen eine Erhöhung der GSH-Gehalte im Vergleich mit den vorherigen Behandlungen festgestellt. Hier wurden 58 nmol/g FG (53% der Kontrolle) gemessen (Tabelle 41, Abbildung 55).

Die Tendenz, die bei den GSH-Gehalten beobachtet werden konnte, bleibt auch für GSSG erhalten. Die Konzentrationen in den behandelten Rhizomen waren generell höher als in den Blättern (Tabelle 41, Abbildung 55). Im Unterschied zu GSH konnte bei GSSG die höchste Konzentration nicht in der Kontrolle, sondern nach der Behandlung mit 10 µM Cd festgestellt werden. Die GSSG-Konzentration der Rhizom-Kontrolle betrug 33 nmol/g FG. Nach 10 µM Cd-Einfluss konnten 39 nmol/g FG (120% der Kontrolle) gemessen werden. Bei den Behandlungen mit 50 µM und 10 µM Cd folgte eine Abnahme der GSSG-Konzentration zu 77% und 52% zur Kontrolle. 250 µM Cd führte zu Erhöhung des GSSG-Gehalts in den *Typha latifolia*-Rhizomen auf 22 nmol/g FG (67% zur Kontrolle).



**Abbildung 55** GSH-Konzentration in *T. latifolia* als % der Kontrolle nach 72tägiger Behandlung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM und 250 µM Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium.



**Abbildung 56** GSSG-Konzentration in *T. latifolia* als % der Kontrolle nach 72tägiger Behandlung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM und 250 µM Cd. Die Kontrolle enthält kein Cadmium.

Die GSSG-Konzentrationen in *Typha latifolia*-Blättern waren aber generell niedriger als die GSSG-Gehalte in den Rhizomen der gleichen Pflanzen. Während bei den Rhizomen eine Abnahme von GSSG von 10 µM Cd zu 100 µM Cd beobachtet werden konnte, ist bei den Blättern eine Abnahme von 10 µM nach 50 µM festzustellen. Bei 10 µM Cd wurden in den Rohrkolben-Blättern 29 nmol/g FG GSSG gemessen, was 103% der Kontrolle ausmacht. Die Konzentration von 50 µM Cd reduzierte den GSSG-Gehalt auf 5,5 nmol/g FG (nur 20% der

Kontrolle). Ab der nachfolgenden Behandlungsstufe mit 100  $\mu\text{M}$  Cd konnte eine leichte Zunahme der GSSG-Konzentration auf 27% der Kontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 56). Bei der höchsten Cd-Konzentration in *T. latifolia* kam es mit 65% zu einer neuerlichen Erhöhung des GSSG-Gehaltes. Damit waren die GSSG-Konzentrationen in den Rhizomen und den Blättern etwa gleich hoch.

Beim Vergleich der GSH/GSSG-Ratio in den Rhizomen und den Blättern von *Typha latifolia* nach der 72tägigen Cd-Behandlung fällt auf, dass die Blätter höhere GSH/GSSG-Verhältnisse in der Kontrolle (29 zu 8 nmol/g FG) und der 50  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung (15 zu 10 nmol/g FG) hatten (Tabelle 41). Im Rest der Behandlungen verfügten die Rhizome über die höheren GSH/GSSG-Verhältnisse. Bei den Behandlungen mit 10  $\mu\text{M}$  Cd und 250  $\mu\text{M}$  Cd konnten 470% und 211% höhere GSH/GSSG-Verhältnisse in den Rhizomen gemessen werden.

Der Glutathionhaushalt unterlag also starken Veränderungen, die sich vor allem im Verbrauch und der Neusynthese von GSH ausdrückten. Die GSSG-Gehalte wurden weniger beeinflusst und lagen eher unter dem Kontrollwert.

### 3.1.2.17 Bestimmung der Aktivitäten der Glutathion S-Transferase

Bei dieser Versuchsreihe, die eine Fortführung der bereits im Kapitel 3.1.1 aufgenommenen Studie ist, wurde die Entgiftungskapazität junger *T. latifolia*-Pflanzen für organische Xenobiotika untersucht, die 72 Tage lang über das Nährmedium mit Cadmium belastet worden waren. Auch hier wurden die bereits genannten Substrate verwendet.

Für die Konjugation des Substrats Chlordinitrobenzol (CDNB) wurden in den Rhizomen von *Typha latifolia*-Enzymaktivitäten zwischen 0,3 und 0,65  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein bestimmt, die sich im Vergleich zu den Aktivitäten in den Blättern als sehr niedrig erwiesen. In den Blätterteilen der gleichen Pflanzen konnten Enzymaktivitäten von 1,8 bis 3,0  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein gemessen werden (Tabelle 42).

In den Rhizomen von *Typha latifolia*, die über 72 Tage mit Cadmium behandelt wurden, war eine starke Abnahme der Aktivität für das Substrat CDNB mit der Zunahme der Schwermetallkonzentration zu vermerken (Tabelle 42). Bei der höchsten Cadmiumkonzentration wurde mit 3,0  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein in den Blättern die höchste Enzymaktivität für CDNB gemessen worden. Dieser Wert ist signifikant höher als in der Kontrolle nach dem Student T-Test ( $p= 0,03$ ). Bei den Cadmiumkonzentrationen von 10 und 50  $\mu\text{M}$  war in den Blättern keine Veränderung festzustellen, bei 100  $\mu\text{M}$  jedoch eine Zunahme der Enzymaktivität zu erkennen.

Was die Rhizombehandlungen bei der gleichen Metallkonzentration betrifft, soll angemerkt werden, dass die *Typha latifolia*-Pflanzen bis zu einer Steigerung der Cadmium-Konzentration bis 100  $\mu\text{M}$  nicht anders reagierten als in der Kontrolle. Erst bei 250  $\mu\text{M}$  Cadmium war ein stärkerer Rückgang der Enzymaktivität zu erkennen, so dass diese Pflanzen nur 40% der Aktivität in der Kontrolle aufwiesen.

Ganz andere Effekte konnten bei der GST-Enzymaktivität gegenüber dem Modellsubstrat Dichlornitrobenzol (DCNB) im gleichen Proteinextrakt beobachtet werden. Die Blätter der mit vier verschiedenen Cadmiumkonzentrationen behandelten *Typha latifolia*-Pflanzen zeigten keine Enzymaktivität für den Umsatz dieses Substrats. Diese war nur in den Rhizomen nachzuweisen (Tabelle 42). Mit der Erhöhung der Cadmiummenge in der Nährlösung wurde auch eine Tendenz zu steigender Aktivität deutlich. Bei 10 und 50  $\mu\text{M}$  Cd waren signifikante Unterschiede zu der Kontrolle erkennbar. Ab dem Cadmiumwert von 100  $\mu\text{M}$  in der Lösung wurde die Abnahme der Aktivität deutlicher und bei 250  $\mu\text{M}$  erreichte sie ihr Minimum, welches aber immer noch höher als die Aktivität in der Kontrolle war.

Unter den Substraten, die für die GST-Aktivität bestimmt wurden, befindet sich auch ein Herbizid (Fluorodifen). Das war das einzige Substrat, für welches die GST-Enzymaktivität in den Enzymextrakten dieser Behandlungsreihe stets gehemmt war (Tabelle 42). In den Blättern wurde zwar Aktivität nachgewiesen, aber deutlich unter der Aktivität der Kontrollen. Die Schwankungen zwischen den Enzymaktivitäten der verschiedenen Behandlungen waren nicht wesentlich. Verglichen mit der Kontrolle lag der niedrigste Wert bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ . Dieser wies eine zur Hälfte niedrigere Enzymaktivität mit 2,5  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein auf. Genau gesehen sind die Konjugationsraten für Fluorodifen zwar niedriger als diese in der Kontrolle, aber trotzdem immer noch wesentlich höher als die Aktivitäten der restlichen Substrate. Diese Ergebnisse könnten relevant sein für den Einsatz von *Typha* bei multipler Belastung von Gewässern, zum Beispiel mit Schwermetallen und Pestiziden.

**Tabelle 42** Spezifische GST-Aktivität in den *T. latifolia*-Proben, behandelt mit Cd über 72 Tage. Die Enzymaktivitäten wurden für die fünf Substrate CDNB, NBoC, NBC, DCNB und Fluorodifen bestimmt. Jede Behandlung hat drei Wiederholungen. Jede einzelne Probe wurde im Triplikat gemessen. Die Standardabweichungen wurden von insgesamt neun Messungen bestimmt. Die Aktivitäten wurden in  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein dargestellt. Mit „k.A.“ ist keine Aktivität gekennzeichnet.

Behandlungen von <i>Typha latifolia</i>	Spezifische Aktivität der GSTs für fünf verschiedene Substrate					
	Cd (mg/Kg TG)	CDNB	NBC	NBoC	DCNB	Fluorodifen
GST-Aktivitäten der Rhizomproben						
Kontrolle	6,5	0,548±0,13	0,159±0,01	k.A.	0,150±0,02	k.A.
10 $\mu\text{M}$ Cd	63,8	0,548±0,08	0,142±0,02	k.A.	0,526±0,10	k.A.
50 $\mu\text{M}$ Cd	258,6	0,370±0,12	0,124±0,02	k.A.	0,584±0,06	k.A.
100 $\mu\text{M}$ Cd	354	0,630±0,13	0,926±0,31	k.A.	0,436±0,11	k.A.
250 $\mu\text{M}$ Cd	1262,5	0,215±0,04	0,249±0,03	k.A.	0,301±0,04	k.A.
GST-Aktivitäten der Blattproben						
Kontrolle	0,8	1,868±0,25	0,206±0,07	0,573±0,05	k.A.	5,566±1,12
10 $\mu\text{M}$ Cd	4,7	1,879±0,33	0,146±0,04	1,389±0,29	k.A.	3,812±,02
50 $\mu\text{M}$ Cd	10,9	1,811±0,49	0,224±0,05	0,545±0,21	k.A.	2,567±0,29
100 $\mu\text{M}$ Cd	17,2	2,772±0,40	0,327±0,02	0,407±0,04	k.A.	3,035±0,79
250 $\mu\text{M}$ Cd	35,2	2,980±0,39	0,636±0,06	k.A.	k.A.	3,686±0,32



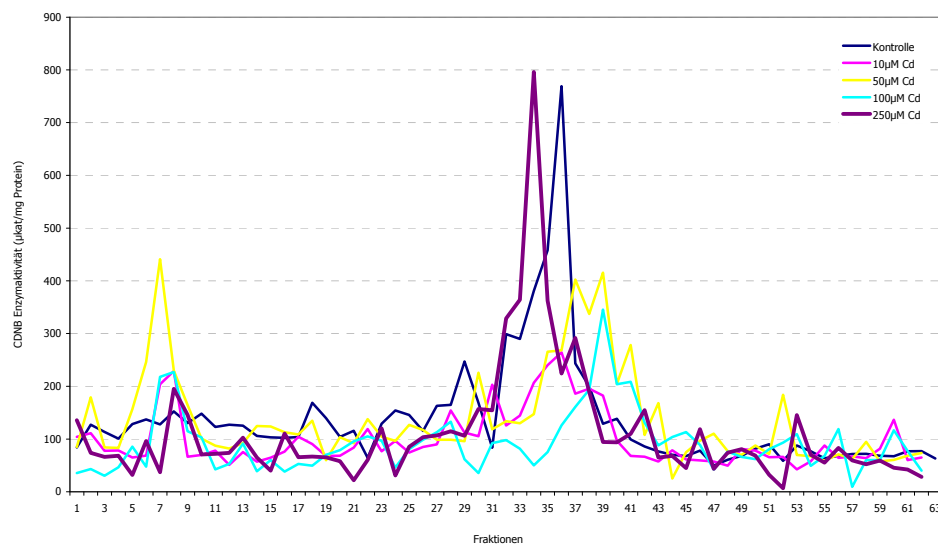
Es soll erwähnt werden, dass von allen in der Arbeit verwendeten Modellsubstraten zur Bestimmung der GST-Enzymaktivitäten die Konjugation des Nitrobenzylchlorid (NBC) am stärksten durch Cd-Behandlungen beeinflusst wurde (Tabelle 42). Wie bei den Rhizomen, so ist auch bei den Blättern mit der Zunahme der Cadmiumkonzentrationen eine Erhöhung der Enzymaktivitäten deutlich erkennbar. Bei den Rhizomen waren die stärksten Effekte bei der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zu sehen. Hier lag der Wert mit 0,9  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein fast 5mal höher als in der Kontrolle mit ihrem Wert von 0,18  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein.

Bei den Messungen der Enzymextrakte der Blätter für NBC-GSTs konnten zwei signifikante Veränderungen der Aktivität bestimmt werden: die Cadmiumkonzentrationen von 100 und 250  $\mu\text{M}$ . Die GST-Aktivität bei der höchsten Metallkonzentration war doppelt so hoch wie die der Kontrolle, aber auch gleichzeitig niedriger als nach der Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  in Rhizomen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen für die GST mit dem Modellsubstrat DCNB, bei dem eine Konjugation dieses Substrats mit reduziertem Glutathion nur in den Rhizomen bestimmbar war, war mit dem Substrat Nitrobenzoychlorid (NBoC) eine GST-Enzymaktivität nur in den Blättern messbar. Mit der Zunahme der Cadmiumkonzentration in der Nährlösung wurde schon bei 10  $\mu\text{M}$  eine wesentliche Erhöhung der GST-Aktivität gemessen (Tabelle 42). Die Ergebnisse bei dieser Konzentration waren signifikant höher als die in der Kontrolle: sie hatten eine 1,5mal höhere Aktivität als die Kontrolle. Bei den nächsthöheren Konzentrationen von Cadmium wurde ein Rückgang der Enzymaktivität deutlich. Bei der Behandlung von *Typha latifolia* mit 250  $\mu\text{M}$  Cadmium über 72 Tage blieb die Aktivität der GSTs in den Blättern komplett gehemmt.

### 3.1.2.18 FPLC (Mono Q) Reinigung der *Typha latifolia* GSTs

Nach der Durchführung der Affinitätschromatographie wurden die *Typha latifolia*-GSTs mittels Anionenaustauschchromatographie weiter gereinigt. Unabhängig von der Behandlung und der Dauer der Inkubation ergab sich eine Aufteilung der GST-Aktivität in vier Cluster mit höchsten Aktivitäten im Bereich der Fraktionen 6-11 (R1 bzw. B1) und 21-30 (R2 bzw. B2) sowie zwei kleineren Aktivitätszonen zwischen den Fraktionen 31-42 (R3 bzw. B3) und 52-56 (R4 bzw. B4) (Abbildung 57). Während diese Cluster also recht stabil zu sein scheinen und mit geringen Unterschieden eine ähnlich spezifische Aktivität für das Substrat CDNB zeigen, kann durch weitere Auftrennung der Cluster in GST-Untereinheiten eine deutliche und konzentrationsabhängige Veränderung der GST erzielt werden.



**Abbildung 57** Mono Q-Lauf von *T. latifolia*-Rhizom-GSTs nach 72tägiger Cd-Behandlung. Als Substrat für die Bestimmung wurde CDNB benutzt.

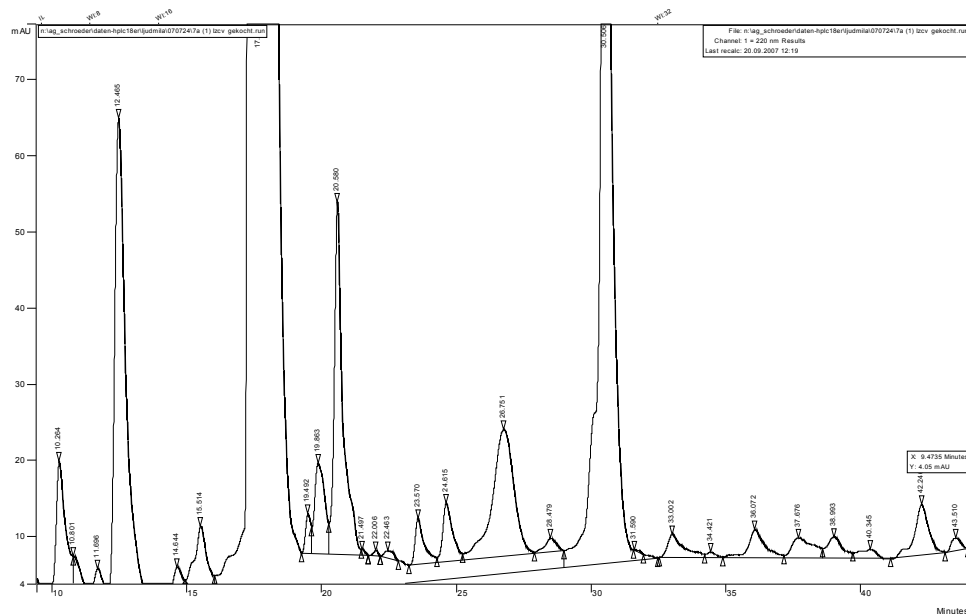
### 3.1.2.19 HPLC-Bestimmung der GST-Fractionen von *Typha latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung

Nach der Durchführung der Enzymreinigung mittels Affinitätschromatographie und FPLC konnten einzelne GST-Fractionen eingengt werden. Weil eine quantitative Bestimmung nicht möglich war, wurde eine qualitative Zuordnung der einzelnen GSTs mittels HPLC durchgeführt (Abbildung 58).

Die nach der Affinitätschromatographie und nach der FPLC ausgewählten GST-Fractionen wurden weiter mittels HPLC in ihre Untereinheiten getrennt. So wurden GST-Isoformen identifizierbar, die nur für die Kontrolle oder für einzelne Behandlungen spezifisch waren (Tabelle 43 und Tabelle 44). Es sind folgende wesentliche Unterschiede zwischen den behandelten Blättern und Rhizomen von *Typha latifolia* zu vermerken:

1. *T. latifolia*-Rhizome haben mindestens eine Isoform mehr als die gleichbehandelten Blätter.
2. in den Rhizomen von *T. latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung von 10 µM bis 100 µM konnten deutlich mehr GST-Isoformen nachgewiesen werden, die in den Fraktionen 3,7 und 9 akkumulieren.
3. die 72tägige Behandlung mit 250 µM Cd führte zu einer Reduktion der vorhandenen Isoformen in den Rhizomen, die nach den Behandlungen mit 10, 50 und 100 µM Cd vorhanden waren. Dafür konnten nach der 250 µM Behandlung neue und nur für diese Behandlung spezifische GST-Isoformen bestimmt werden (Tabelle 43).

4. nach 10  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung der Blätter (Tabelle 44) von *T. latifolia* konnten behandlungs-spezifische GST-Isoformen nachgewiesen werden, die nur bei dieser Cd-Konzentration zu finden sind; zum Beispiel bei der Fraktion 3 nach 10  $\mu\text{M}$  Cd, Fraktion 12 bei der 10 und 50  $\mu\text{M}$  Cd oder Fraktion 10 bei 100  $\mu\text{M}$  Cd.



**Abbildung 58** HPLC-Untersuchung der GST-Untereinheiten einer einzelnen *T. latifolia*-GST-Fraktion aus einem FPLC-Lauf (Abb. 57)

5. in den Rhizomen treten öfter als in den Blättern GST-Isoformen auf, die in den Kontrollen vorhanden, aber nach der Behandlung nicht mehr nachzuweisen sind.
6. in den Blättern konnten wesentlich weniger GST-Isoformen nachgewiesen werden, die eine erheblich niedrigere Peakfläche als die Kontrolle zeigten.
7. in Rhizomen werden also unter Schwermetallstress GSTs herunterreguliert; in den Blättern kommt es zu verstärkter Induktion, obwohl sie mit einer geringeren Konzentration an Cadmium konfrontiert sind.

**Tabelle 43** Darstellung der GST-Fractionen nach einer HPLC-Bestimmung von *T. latifolia*-Rhizomen nach 72tägiger Cd-Behandlung. Die Enzyme wurden nach der Extraktion mittels Affinitätschromatographie und FPLC (Mono Q-Säule) gereinigt und nachfolgend lyophilisiert. Die HPLC-Trennung wurde mittels C-18-Kieselgel-Säule durchgeführt. Die an den HPLC bestimmten Peak-Flächen der Behandlungen wurden in Relation zu den Peak-Flächen der Kontrolle gesetzt und prozentual berechnet. Mit R1 bis R4 sind die mit der FPLC aufgereinigten Fraktionen der Rhizome nummeriert. Für die Darstellung wurden folgende Symbole verwendet: ↓ unter 75% der Kontrolle, ● 75-150% der Kontrolle, \* 150-200% der Kontrolle, ↑ 200-400% der Kontrolle, ↑↑ 400-600% der Kontrolle, ↑↑↑ 600-800% der Kontrolle, ↑↑↑↑ 800-1000% der Kontrolle, ✦ über 1000% der Kontrolle, ○ die GSTs sind nach den Behandlungen vorhanden, fehlen aber in der Kontrolle, ◆ die GSTs wurden in der Kontrolle gemessen, fehlen aber nach den Behandlungen.

Fraktion	10 µM Cd				50 µM Cd				100 µM Cd				250 µM Cd			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
1	✦	*	✦	●	✦	●	↑↑↑↑	↑	✦	↑↑	●	↓	✦	●	↓	↓
2	↑	●	●	↓	*	●	↓	●	✦	↑	↓	●	●	↓	↓	●
3	↑	↑↑↑	✦	●	↑	↑↑↑	↑↑↑↑	●	✦	↑↑↑	●	↓	●	↓		●
4	●	●	●	●	●	↓	↓	●	◆	*	↓	*	↓	↓	↓	●
5	○	↓	○	○	○	*	◆	◆	○	◆	○	○	○	↓	○	○
6	○	●	●	✦	○	↓	●	✦	○	●	◆	◆	○	↓	↓	✦
7	↓	↑↑	○	◆	↓	↑↑	○	●	↓	↑↑	◆	◆	↓	●	○	↑
8	↑	*	↓	✦	●	●	↓	↑↑↑	*	↑	●	↑	↓	●	↓	↑
9	↑↑	●	↑↑↑↑	✦	↑↑	↑	↑↑	✦	↑	↑	↑	✦	↑	●	↓	✦
10	●	●	●	↓	↑	*	↓	●	↑↑	↑	↓	●	●	↓	↓	●
11	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	✦	◆	◆	◆	✦	↓	◆	◆
12	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	✦	*	↑	◆	◆	↑	●	↓	↑↑↑↑
13	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	✦	↑↑	↓	*	↓	↓	◆	◆
14	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑↑↑	✦	◆	○	◆	↑	*	↓	↓

**Tabelle 44** Darstellung der GST-Fractionen nach einer HPLC-Bestimmung von *T. latifolia*-Blättern nach 72tägiger Cd-Behandlung. Die Enzyme wurden nach der Extraktion mittels Affinitätschromatographie und FPLC (Mono Q-Säule) gereinigt und nachfolgend lyophilisiert. Die HPLC-Trennung wurde mittels C-18-Kieselgel-Säule durchgeführt. Die an den HPLC bestimmten Peak-Flächen der Behandlungen wurden in Relation zu den Peak-Flächen der Kontrolle gesetzt und prozentual berechnet. Mit B1 bis B4 sind die mit der FPLC aufgereinigten Fraktionen der Blätter nummeriert. Für die Darstellung wurden folgende Symbole verwendet: ↓ unter 75% der Kontrolle, ● 75-150% der Kontrolle, \* 150-200% der Kontrolle, ↑ 200-400% der Kontrolle, ↑↑ 400-600% der Kontrolle, ↑↑↑ 600-800% der Kontrolle, ↑↑↑↑ 800-1000% der Kontrolle, ✦ über 1000% der Kontrolle, ○ die GSTs sind nach den Behandlungen vorhanden, fehlen aber in der Kontrolle, ◆ die GSTs wurden in der Kontrolle gemessen, fehlen aber nach den Behandlungen, ➔ hier fehlende GSTs, die auch in der Kontrolle nicht vorhanden sind und nur im einzelne Behandlungen gemessen wurden, „n.g.“ – nicht gemessen.

Fraktion	10 µM Cd				50 µM Cd				100 µM Cd				250 µM Cd			
	B1	B2	B3	B4	B1	B2	B3	B4	B1	B2	B3	B4	B1	B2	B3	B4
1	●	↑↑	n.g	↓	●	↑	↑↑↑↑	●	●	↓	↑↑	*	●	↓	✦	●
2	↓	●	n.g	●	●	●	●	↑	↓	↓	↓	*	●	↓	↑↑↑↑	↑
3	○	○	n.g	○	➔	➔	➔	➔	➔	➔	➔	➔	➔	➔	➔	➔
4	↓	●	n.g	✦	●	●	✦	↑↑↑↑	↓	↓	✦	↑↑↑↑	●	↑	✦	↑
5	●	●	n.g	✦	●	●	↓	↑↑↑↑	↓	↓	↓	✦	●	↓	↑↑↑↑	✦
6	●	↑	n.g	↑↑↑↑	●	↑↑↑↑	◆	◆	↓	✦	*	✦	●	◆	↓	✦
7	●	●	n.g	↑	↓	●	↑	↑	●	*	●	✦	↓	↑↑↑↑	●	↑
8	●	↑↑	n.g	*	●	●	●	●	●	↓	↓	*	●	↑↑↑↑	↑↑	↑
9	↓	↓	n.g	↑	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆
10	➔	➔	n.g	➔	➔	➔	➔	➔	○	○	○	○	➔	➔	➔	➔
11	*	●	n.g	●	●	●	↑	●	◆	◆	◆	◆	●	↓	↑↑	*
12	○	○	n.g	○	○	○	○	○	➔	➔	➔	➔	➔	➔	➔	➔
13	↓	*	n.g	↓	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆

### 3.1.2.20 Vergleich der Aktivitäten aller antioxidativen Enzyme und der GSTs in Blättern und Rhizomen von *Typha latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung

Die bisher dargestellten Ergebnisse sind so vielfältig, dass es ratsam erscheint, die Veränderungen der einzelnen Enzymaktivitäten und Metaboliten in einer zusammenfassenden Tabelle (Tabelle 45) darzustellen, in der keine absoluten Zahlen, sondern nur noch Tendenzen bezüglich der jeweiligen unbehandelten Kontrollen wiedergegeben werden.

Die Effekte des Cadmiums auf die einzelnen Enzyme und Metaboliten werden weiterhin dahingehend unterteilt, ob die Aktivitäten in Blättern oder Rhizomen gemessen wurden.

**Tabelle 45** Vergleich aller Enzymaktivitäten in *T. latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung. Die Tabelle repräsentiert die Aktivitäten der einzelnen Enzyme, verglichen mit der Kontrolle. Die Kontrolle ist gleich 100% gesetzt und in der Tabelle nicht aufgetragen. Symbolerläuterungen: ↓ Enzymaktivität unter 75% im Vergleich zur Kontrolle, ● 75-150% zur Kontrolle, \* 150-200% zur Kontrolle, ↑↑ signifikant höher als die Kontrolle, k.A = keine Aktivität in Kontrolle und Behandlung. B = Blätter, R = Rhizome

Behandlungen	10 µM Cd		50 µM Cd		100 µM Cd		250 µM Cd	
	B	R	B	R	B	R	B	R
Konzentration des Malondialdehyds								
MDA	●	●	●	●	●	●	↓	●
Enzymaktivitäten anderen Enzymen								
SOD	●	●	↑↑	●	↑↑	●	↑↑	●
CAT	↓	●	●	↓	↑↑	↓	↑↑	↓
Enzymaktivitäten des Ascorbat-Glutathion Zyklus								
POX	↓	●	↓	↓	↓	●	●	●
APOX	●	↓	↓	↓	↑↑	↓	↓	↓
MDHAR	●	↓	●	↓	●	↓	●	↓
DHAR	↓	*	↓	●	↓	↑↑	↓	●
Enzymaktivitäten des Glutathionperoxidase Zyklus								
GPOX	●	●	↑↑	↑↑	↑↑	*	↑↑	↑↑
GR	↑↑	●	↑↑	●	↑↑	●	↑↑	↓
GSH/GSSG	↓	●	↓	●	↓	↓	↓	●
Enzymaktivitäten der GSTs								
CDNB	●	●	●	↓	●	●	↑↑	↓
DCNB	k.A	↑↑	k.A	↑↑	k.A	↑↑	k.A	↑↑
NBC	↓	↓	●	↓	↑↑	↑↑	↑↑	*
NBoC	↑↑	k.A	●	k.A	↓	k.A	k.A	k.A
Fluorodifen	↓	k.A	↓	k.A	↓	k.A	↓	k.A

In der Tabelle 45 sieht man, dass die Cd-Behandlung die Konzentration des Malondialdehyds als Stressmarker nach 72tägiger Behandlung kaum beeinflusst. Vielmehr bleiben die MDA-Werte in allen Proben stets im Bereich der Kontrollen (75–150%).

Die antioxidativen Enzyme SOD und Katalase zeigen signifikante Erhöhungen ihrer Aktivitäten in den Blättern ab einer Konzentration von 50 µM. Die der Vollständigkeit halber mitbestimmte Peroxidase-Aktivität, die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Cosubstrat bei der Hydroxylierung von organischen Substraten verwendet, reagiert nicht auf den Schwermetallstress.

Die Enzymaktivitäten der Enzyme des Ascorbat-Glutathion Zyklus sind zumeist gehemmt. Nur nach der Behandlung mit 100 µM Cd kommt es zur Erhöhung von APOX und DHAR.

Dasselbe kann allerdings nicht über die Enzymaktivitäten im Glutathionperoxidase Zyklus gesagt werden. Hier führten alle Cd-Konzentrationen ab 50 µM aufwärts zur signifikanten Steigerung der GPOX-Aktivität. Bei 250 µM Cd war die Glutathionreduktase-Aktivität überraschend gehemmt. Die gegenüber den unbehandelten Pflanzen niedrigeren GSH/GSSG-Verhältnisse in nahezu allen behandelten Proben deuten an, dass die Glutathiongehalte nach der Behandlung angestiegen sind.

Nur mittelbar wird die Aktivität der GST, die organische Schadstoffe mit Glutathion konjugieren, beeinflusst. In der Tabelle 45 sieht man aber deutlich, dass die Cd-Behandlung die Konjugationsreaktion für CDNB, das klassische Standardsubstrat der GST, kaum beeinflusst. Die einzige Steigerung der Aktivität der CDNB-GSTs zur Kontrolle wurde bei einer Konzentration von 250 µM Cd in den Blättern beobachtet. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Bestimmung der CDNB-Konjugation als GST-Standardtest nicht geeignet ist, um Auskunft über die Reaktion der Pflanzen auf organische Schadstoffe unter zusätzlichem Schwermetallstress zu geben.

Dafür war die Konjugation von DCNB in den Rhizomen bei allen Behandlungen signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht, allerdings ohne dass eine GST-Aktivität für dieses Substrat in den Blattextrakten gemessen werden konnte. Die DCNB-Aktivitäten stimmen jedoch nicht vollständig mit den Isoenzym-Mustern überein.

Beim Substrat NBC waren signifikante Effekte auf die Konjugation nur bei den höchsten Cd-Konzentrationen sowohl in den Blättern als auch in den Rhizomen gemessen worden. Die GST-Aktivität für die Konjugation von NBoC nahm nach jeder Behandlung ab. NBC und NBoC folgen in ihren Aktivitäten den durch die Isoenzym-Trennung nahegelegten Mustern.

Besonders interessant ist die Konjugation von Fluorodifen. Sie war nur in den Blättern vorhanden und dort stets gegenüber den Kontrollen inhibiert, was eine genaue Umkehrung der Aktivität der Konjugation von DCNB bedeutet. Insgesamt war bei den niedrigeren Cd-Konzentrationen häufiger eine Hemmung der Reaktion zu beobachten, während bei den höheren Konzentrationen die Induktion der Konjugation überwog.

### 3.2 Ergebnisse der Enzymmessungen in Sonnenblumen

Eine wichtige Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist die generelle Klärung von Zusammenhängen zwischen der Aufnahme von Schwermetallen in Pflanzen, den darauf möglicherweise folgenden Stressreaktionen und zum anderen der Entgiftungskapazität für gleichzeitig vorhandene organische Schadstoffe.

Die PHYTOTECH (Schweiz) hatte Sonnenblumenkeimlinge der Sorten „IBL 04“ und „Salut“ nach chemischer Mutagenese auf Biomasseproduktion und Schwermetallextraktion selektiert und in einen Feldversuch gebracht. Nach weiterer Selektion waren die jeweiligen M3-Generationen als stabile Mutanten identifiziert und auf metallbelastete Flächen ausgepflanzt worden (siehe 2.1.2). Sie standen nach der Ernte für unsere Versuche zur Verfügung. Ziel der hier durchgeführten Messungen war es somit, die Entgiftungskapazität der einzelnen Mutanten für verschiedene Chlorbenzol-Substrate (CDNB, NBC, NBoC, DCNB) und ein ausgewähltes Herbizid (Fluorodifen) durch Glutathion-Konjugation zu prüfen.

#### 3.2.1 Pigmentanalyse

Neben den antioxidativen Enzymen und der Lipidperoxidation wurden auch die Effekte der Schwermetalle auf den Pigmenthaushalt der Sonnenblumen untersucht. Bei einem größeren Pigmentabbau könnten Störungen bei der Photosynthese auftreten, was fatale Auswirkungen auf die Pflanzen haben könnte.

In allen Sonnenblumenmutanten der IBL 04 lagen die Chlorophyll a-Werte zwischen 5 und 14 µg/g FG (Tabelle 46). In der Kontrolle IBL 04 wurden 12,746 µg/g FG gemessen. Der niedrigste Wert lag in der Sonnenblumenmutante 17/14-185-04 bei 5,621 µg/g FG und am meisten Chlorophyll a enthielt die Sonnenblumenmutante 8/2-110-04 mit 14,402 µg/g FG.

Insgesamt nur vier Pflanzen der IBL 04 Sonnenblumenmutanten zeigten höhere Chlorophyll a-Gehalte als die Kontrolle, und das waren: 12/50-190-04, 20/3-185-04, 12/3-185-04 und 12/50-190-04. Ihre Chlorophyllgehalte lagen alle im Schwankungsbereich der Kontrolle. Eine ganze Reihe von Pflanzen hatte charakteristisch niedrigere Chlorophyll a-Werte um 8-9 µg/g FG. In diesen Pflanzen ist auch Chlorophyll b niedriger, daher ergibt sich beim a/b-Verhältnis kein stabiles Bild: Die Chlorophylle reagieren gemeinsam.

Was das Chlorophyll b betrifft, konnte gezeigt werden, dass 80% der Sonnenblumenmutanten zwischen 2,5 und 4 µg/g FG enthielten. Im Unterschied zu den IBL 04-Mutanten gab es bei den Sonnenblumenmutanten der Hybride Salut (Tabelle 46) nur eine Mutante, deren Chlorophyll a-Gehalt höher als der in der Kontrolle war: 9/64-19-S mit 13,164 µg/g FG.



Die gleiche Schlussfolgerung kann auch bezüglich des Gehalts an Chlorophyll b und Carotinoiden gemacht werden. Die höchste Gesamtchlorophyllmenge bei den Sonnenblumenmutanten der beiden Gruppen lag bei 19,008 µg/g FG in 8/2-110-04 (IBL 04) und die niedrigste mit 7,616 µg/g FG in der IBL 04-Sonnenblumenmutante 17/14-185-04.

Bei der Bestimmung des a+b/x+c-Verhältnisses fällt auf, dass die Sonnenblumenmutanten mit dem höchsten Gesamtchlorophyllgehalt nicht über das höchste Verhältnis verfügten. Im Fall der IBL 04 lag das höchste a+b/x+c-Verhältnis bei der Sonnenblumenmutante 12/3-185-04: 5,476. Die Sonnenblumenmutante 10/55-19-S verfügte über das höchste a+b/x+c-Verhältnis.

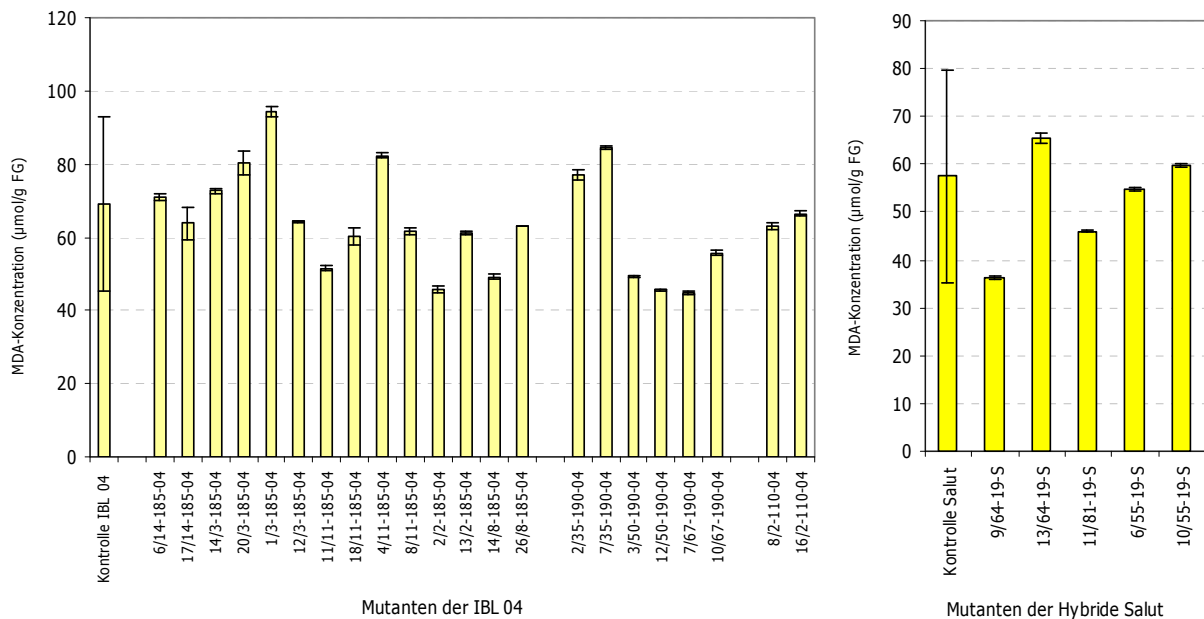
**Tabelle 46** Pigmentanalyse der M3-Sonnenblumenmutanten der IBL 04 und der Hybride Salut. Jeder Wert repräsentiert drei unabhängige Messungen einer Probe mit drei Replikaten. Die Standardabweichungen wurden aus den Replikaten berechnet. Chlorophyll a+b repräsentiert Gesamtchlorophyll, das a/b-Verhältnis stellt die Beziehung Chlorophyll a zu Chlorophyll b dar und das a+b/x+c-Verhältnis, dieses zwischen dem Gesamtchlorophyll und den Carotinoiden. Die Aktivitäten sind im  $\mu\text{g/g}$  FG bestimmt worden.

Pigmentanalyse in M3-Sonnenblumenmutanten						
	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Chlorophyll a+b	Carotinoide (Cx+c)	a/b	a+b/x+c
Sonnenblumenmutanten der IBL 04						
Kontrolle IBL 04	25,49±0,24	8,72±0,10	34,21±0,35	7,40±0,02	2,92	4,62
17/14-185-04	11,24±0,01	3,99±0,03	15,23±0,02	4,29±0,01	2,82	3,54
14/3-185-04	17,52±0,01	5,71±0,02	23,24±0,02	5,94±0,01	3,07	3,91
20/3-185-04	27,55±0,02	9,28±0,02	36,83±0,04	7,40±0,01	2,97	4,97
1/3-185-04	21,98±0,01	9,16±0,02	31,14±0,01	5,90±0,01	2,39	5,28
12/3-185-04	26,81±0,02	9,87±0,01	36,69±0,02	6,70±0,01	2,71	5,48
11/11-185-04	19,60±0,02	6,13±0,02	25,73±0,02	5,28±0,01	3,19	4,87
18/11-185-04	19,06±0,01	6,07±0,01	25,13±0,01	5,92±0,01	3,14	4,24
4/11-185-04	16,05±0,01	4,83±0,01	20,89±0,01	6,22±0,01	3,32	3,35
8/11-185-04	22,93±0,01	6,91±0,08	29,85±0,03	7,03±0,01	3,32	4,24
2/2-185-04	20,60±0,02	6,50±0,02	27,10±0,03	5,87±0,01	3,17	4,68
13/2-185-04	23,52±0,03	7,39±0,01	30,92±0,03	7,27±0,01	3,18	4,25
14/8-185-04	16,59±0,01	5,08±0,01	21,67±0,02	6,28±0,01	3,23	3,45
26/8-185-04	18,29±0,02	5,54±0,02	23,838±0,02	5,75±0,01	3,30	4,14
2/35-190-04	15,52±0,01	5,16±0,01	20,69±0,01	4,96±0,01	3,01	4,16
7/35-190-04	16,99±0,02	5,81±0,02	22,80±0,02	6,16±0,02	2,92	3,69
3/50-190-04	25,94±0,02	7,87±0,01	33,81±0,01	9,22±0,02	3,29	3,66

12/50-190-04	28,10±0,01	9,41±0,02	37,51±0,02	7,47±0,01	2,98	5,02
7/67-190-04	19,82±0,01	6,45±0,01	26,27±0,01	5,57±0,01	3,07	4,72
10/67-190-04	18,40±0,01	5,53±0,02	23,94±0,02	5,80±0,01	3,32	4,13
8/2-110-04	28,80±0,04	9,21±0,01	38,01±0,05	8,12±0,01	3,13	4,68
16/2-110-04	17,55±0,01	5,95±0,01	23,50±0,01	6,19±0,01	2,95	3,79
Sonnenblumenmutanten der Hybride Salut						
Kontrolle Salut	18,43±0,65	5,94±0,26	24,37±0,92	5,49±0,4	3,09	4,44
9/64-19-S	26,23±0,03	8,11±0,04	34,35±0,05	8,48±0,02	3,23	4,05
13/64-19-S	16,51±0,01	5,10±0,01	21,62±0,02	5,28±0,01	3,24	4,09
11/81-19-S	16,49±0,01	5,24±0,01	21,73±0,02	4,76±0,01	3,15	4,57
6/55-19-S	15,66±0,01	5,07±0,01	20,74±0,01	5,02±0,01	3,09	4,13
10/55-19-S	21,21±0,01	7,13±0,01	28,35±0,01	5,93±0,01	2,97	4,78

### 3.2.2 MDA-Konzentration der Sonnenblumenmutanten

Malondialdehyd (MDA) ist ein Endprodukt der Lipidperoxidation. Seine Entstehung ist ein Zeichen dafür, dass die Schutzmechanismen der Pflanzen überwunden wurden und dass freie Radikale mit den ungesättigten Fettsäuren der Zellmembranen reagieren konnten. Bei den Mutanten der Behandlungslinie IBL 04 war keine ausgeprägte Malondialdehyd-Bildung festzustellen (Abbildung 59). Die Sonnenblumenmutante, bei der die höchste Konzentration bestimmt werden konnte, war 17/3-185-04 mit 93  $\mu\text{mol/g}$  FG. Die Konzentration in den Kontrollen lag knapp über 70  $\mu\text{mol/g}$  FG. Die niedrigste MDA-Konzentration wurde bei 42  $\mu\text{mol/g}$  FG festgestellt. Eine Korrelationsanalyse der MDA-Konzentrationen mit den extrahierten Schwermetallmengen in den Pflanzen ergab relativ geringe Bestimmtheitsmaße für die Aufnahme von Cd ( $r^2=0,32$ ), Pb ( $r^2=0,35$ ) und Zn ( $r^2=0,52$ ). Interessanterweise folgt dabei die Bildung von MDA unter dem Einfluss von Cd und Pb der gleichen Steigung.



**Abbildung 59** MDA-Konzentration in Blättern der Sonnenblumenmutanten der IBL 04 (links) und der Hybride Salut (rechts). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei Replikaten jeder Probe.

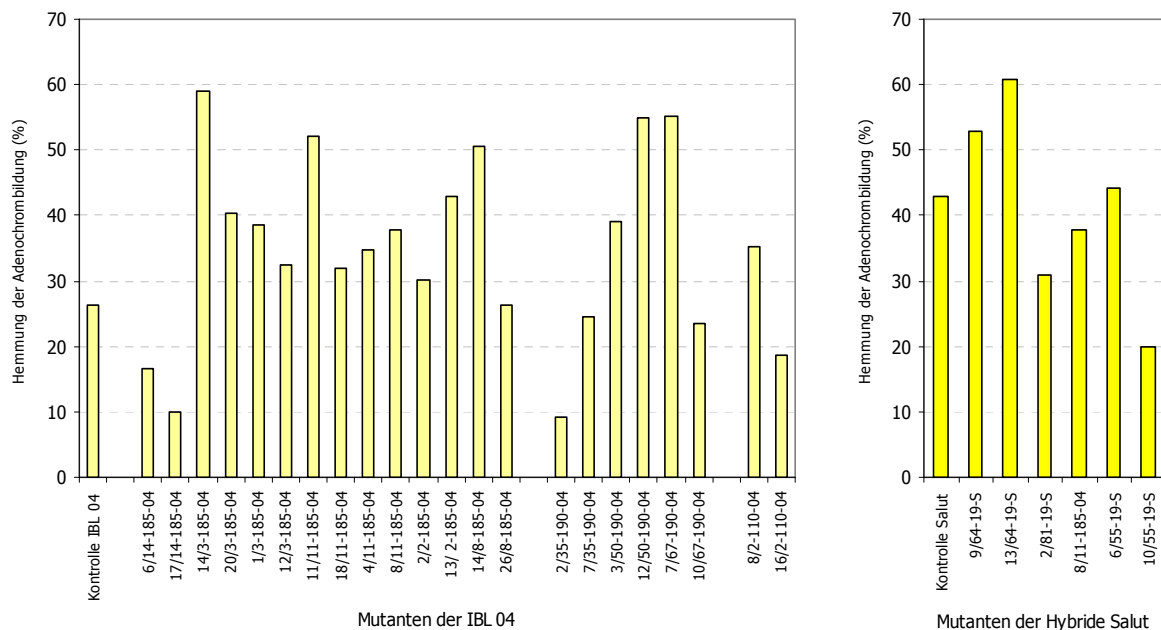
Im Vergleich der MDA-Konzentration der Mutanten von Salut (Abbildung 59) zu denen der IBL 04 sind keine bedeutsamen Unterschiede sichtbar. Die MDA-Konzentrationen aller Sonnenblumenmutanten waren um die Werte der Kontrolle verteilt. Die Kontrolle hatte eine Konzentration von 58  $\mu\text{mol/g}$  FG und die höchste MDA-Konzentration lag bei 65  $\mu\text{mol/g}$  FG. Die niedrigste Konzentration wurde bei 38  $\mu\text{mol/g}$  FG gemessen.

### 3.2.3 SOD-Aktivität der Sonnenblumenmutanten

Wie bereits oben erwähnt, dient die Superoxiddismutase (SOD) in erster Linie der Abwehr (Mittler, 2002), weil sie die gefährlichen  $O_2^-$  Radikale in  $H_2O_2$  umwandelt. Damit liefert die SOD der Katalase und dem Glutathionperoxidase-Zyklus sowie dem Ascorbat-Glutathion Zyklus das Substrat. Die Katalase setzt bei diesem Prozess  $O_2$  frei, die GPOX entsprechend oxidiertes Glutathion (im Glutathionperoxidase-Zyklus) und die APOX das MDHA (im Ascorbat-Glutathion Zyklus, Mittler, 2002).

Die SOD-Aktivitäten der Sonnenblumenmutanten IBL 04 sind in der Abbildung 60 dargestellt. Im Unterschied zu den anderen Aktivitäten ist hier die Aktivität als prozentuale Hemmung der Adenochrombildung dargestellt (Kröniger, 1994). Eine höhere Hemmung entspricht daher einer höheren Enzymaktivität.

Drei Viertel aller Sonnenblumenmutanten der IBL 04 zeigten höhere SOD-Aktivitäten als in der Kontrolle. Die Hälfte davon besaß die doppelte Aktivität in der Kontrolle. Die höchste Aktivität der Superoxiddismutase lag bei 59% Hemmung der Adenochrombildung und die niedrigste bei 9,5%. Der Aktivitätswert der Kontrolle lag bei 26%.

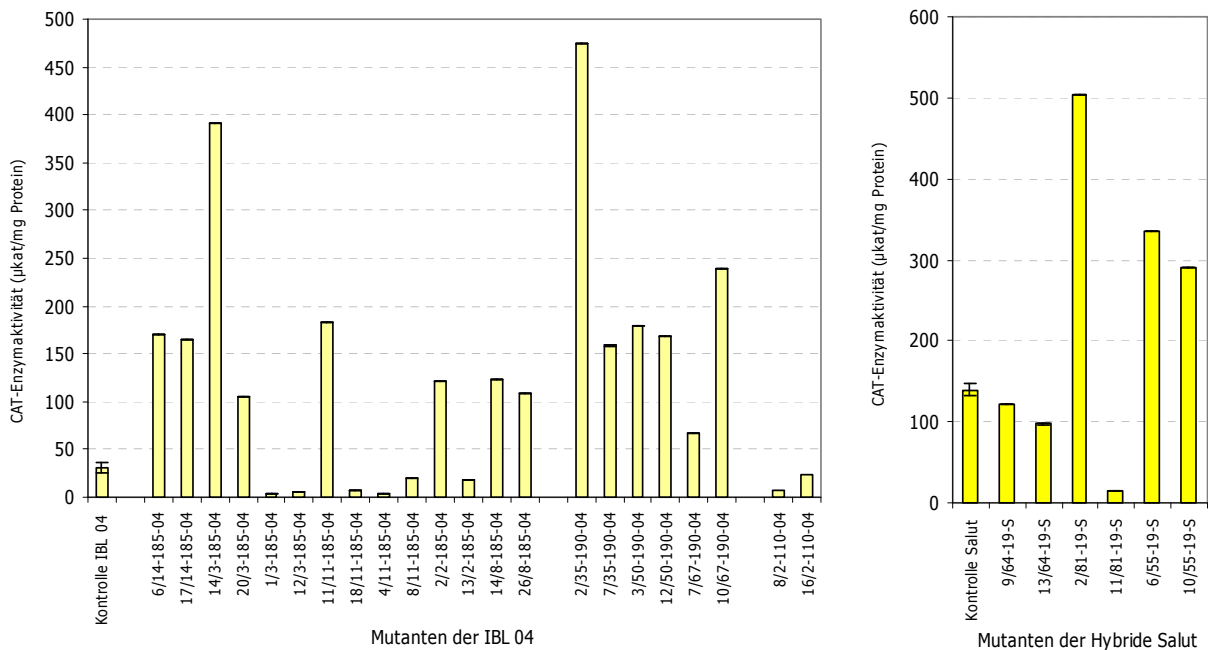


**Abbildung 60** Hemmung der Adenochrombildung (in %) in Blättern der Sonnenblumenmutanten der IBL 04 (links) und der Hybride Salut (rechts). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei Replikaten jeder Probe.

Während bei der IBL 04 die Kontrolle bei 26% lag, wies die Kontrolle von Salut 42% auf. Die Aktivität (ausgedrückt als Hemmung der Adenochrombildung) der restlichen Mutanten lag zwischen 18% und 40%. Nur zwei Mutanten von Salut zeigten eine höhere SOD-Aktivität als in der Kontrolle. Damit ergibt sich ein grundsätzlich anderes Bild als beim IBL 04.

### 3.2.4 CAT-Aktivität der Sonnenblumenmutanten

Die Katalase ist ein Enzym, das das pflanzengiftige Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff abbauen kann. In den untersuchten Sonnenblumenmutanten der IBL 04 (Abbildung 61) war die Katalase in ihrer prozentualen Verteilung der Aktivität nur mit der MDHAR zu vergleichen, die zu dem Ascorbat-Glutathion Zyklus gehört. Die niedrigste in IBL 04 gemessene Aktivität lag bei 10  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (1/3-185-04), während die höchste Aktivität bei der Sonnenblumenmutante 2/35-190-04 gemessen wurde: 470  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Zwei der Sonnenblumenmutanten, außer der schon erwähnten 2/35-190-04, zeigten eine Enzymaktivität höher als 200  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein: 14/3-185-04 und 10/67-190-04. Weitere zehn Sonnenblumenmutanten hatten eine Katalase-Aktivität höher als 100  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Hier ist zu erwähnen, dass die Aktivität in der Kontrolle bei 30  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein lag, vierzehn mal niedriger als die Aktivität der Sonnenblumenmutanten 2/35-190-04.



**Abbildung 61** Spezifische Katalase-Aktivität in Blättern der Sonnenblumenmutanten der IBL 04 (links) und der Hybride Salut (rechts). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei Replikaten jeder Probe.

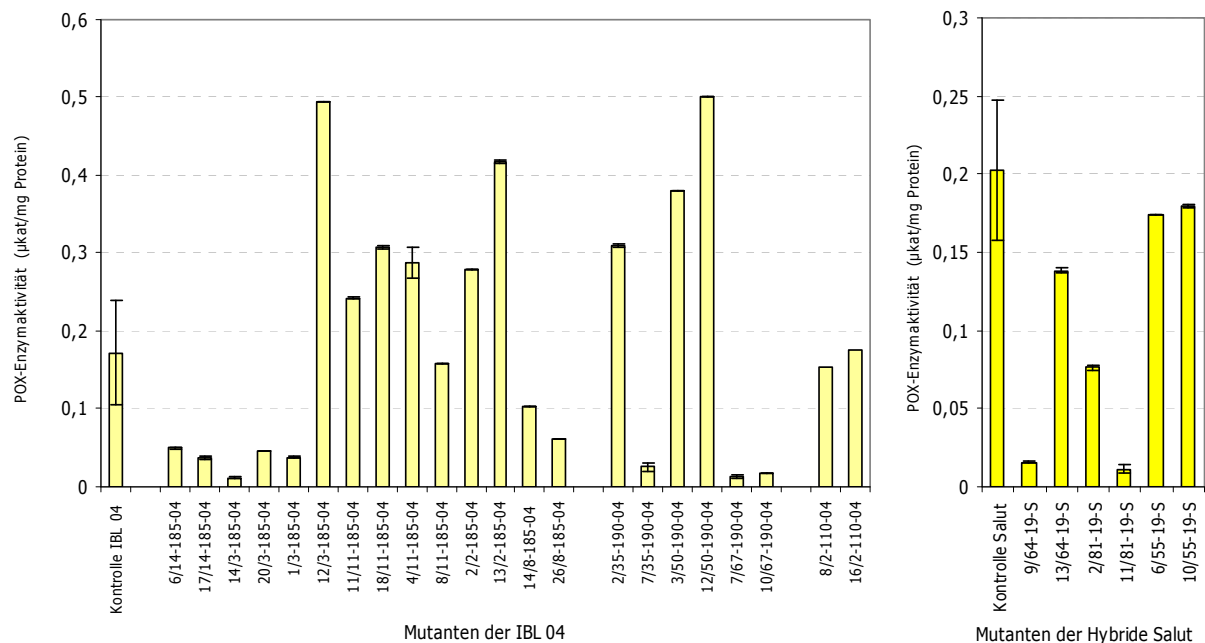
Bezugnehmend auf die Katalase-Aktivität der Sonnenblumenmutanten der Hybride Salut (Abbildung 61) können ähnliche Feststellungen gemacht werden wie für die IBL 04.

In diesem Fall lag die höchste Katalase-Aktivität knapp über 500  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (2/81-19-S). Die niedrigste Enzymaktivität der Katalase konnte bei 30  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein in der Mutante 11/81-19-S gemessen werden. Mit Werten um die 100  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein gab es zwei weitere Sonnenblumenmutanten, deren Aktivitäten niedriger als die der Kontrolle waren: 9/64-19-S

und 13/64-19-S. Die Salut-Sonnenblumenmutanten, deren Katalase-Enzymaktivität unterhalb der der Kontrolle lag, zeigten eine hohe GPOX- aber keine APOX-Enzymaktivität.

### 3.2.5 POX-Aktivität der Sonnenblumenmutanten

Peroxidasen sind Enzyme mit Häm im aktiven Zentrum, die Wasserstoffperoxid als Elektronenakzeptor benutzen, um Substrate, wie zum Beispiel Guajacol, zu oxidieren. Sie sind häufig in die allgemeine Abwehr der Pflanzen gegen Xenobiotika und oxidativen Stress involviert. In allen Sonnenblumenmutanten der IBL 04 konnte Peroxidaseaktivität (POX) nachgewiesen werden (Abbildung 62). Diese spezifische Aktivität lag wesentlich niedriger als die GR-Aktivität bei den gleichen Pflanzen (Abbildung 62). Einige der Mutanten, die über Glutathionreduktase-Aktivität verfügen, hatten nur geringe POX-Enzymaktivität und umgekehrt. Die niedrigste gemessene POX-Aktivität lag bei 0,03  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein und die beiden höchsten bei 0,5  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Der für die Kontrolle bestimmte Wert war 0,17  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein.



**Abbildung 62** Spezifische POX-Aktivität in Blättern der Sonnenblumenmutanten der IBL 04 (links) und der Hybride Salut (rechts). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei Replikaten jeder Probe.

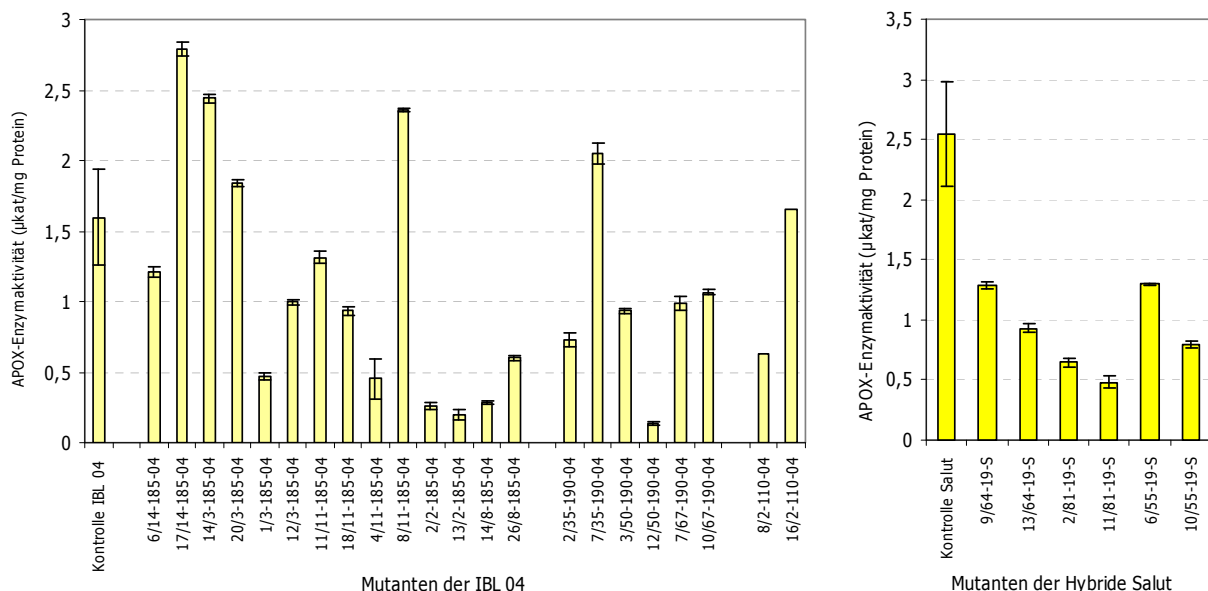
Anders als beim IBL 04 besaß die Kontrolle die höchste Peroxidase-Aktivität unter den Mutanten der Hybride Salut (Abbildung 62). Ihr Wert von 0,2  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein war ver-

gleichbar mit der Kontrolle der IBL 04. Die Kontrolle verfügte über eine fast 10mal so hohe Aktivität wie die niedrigste POX-Aktivität der Hybride Salut. Alle spezifischen Enzymaktivitäten sind gegenüber der Kontrolle gehemmt, nur zwei der Sonnenblumenmutanten, nämlich 6/55-19-S und 10/55-19-S, lagen in einem mit der Kontrolle vergleichbaren Bereich. Nur die Mutante 10/55-19-S verfügte über sehr hohe Glutathionreduktase-Aktivität. Insgesamt sind die Enzymaktivitäten der Salutmutanten bis zu 2mal niedriger als die der Mutanten der IBL 04.

### 3.2.6 APOX-Aktivität der Sonnenblumenmutanten

Die Ascorbatperoxidase (APOX) ist als wesentliches Enzym des Halliwell-Asada Zyklus in den Pflanzen dafür verantwortlich, dass giftiges Wasserstoffperoxid in Wasser umgewandelt wird. Als Cosubstrat dient Ascorbinsäure (Mittler, 2002).

Diese Funktion des Enzyms zeigt, wie wichtig es für das pflanzliche Entgiftungssystem ist. Die Enzymaktivität der Ascorbatperoxidase in den Sonnenblumenmutanten der IBL 04 (Abbildung 63) schwankte zwischen 2,5 und 0,1  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Die Aktivität der Kontrolle lag bei 1,5  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Die Sonnenblumenmutanten mit der höchsten spezifischen Aktivität hatten damit eine höchstens 85% höhere Aktivität als in der Kontrolle.



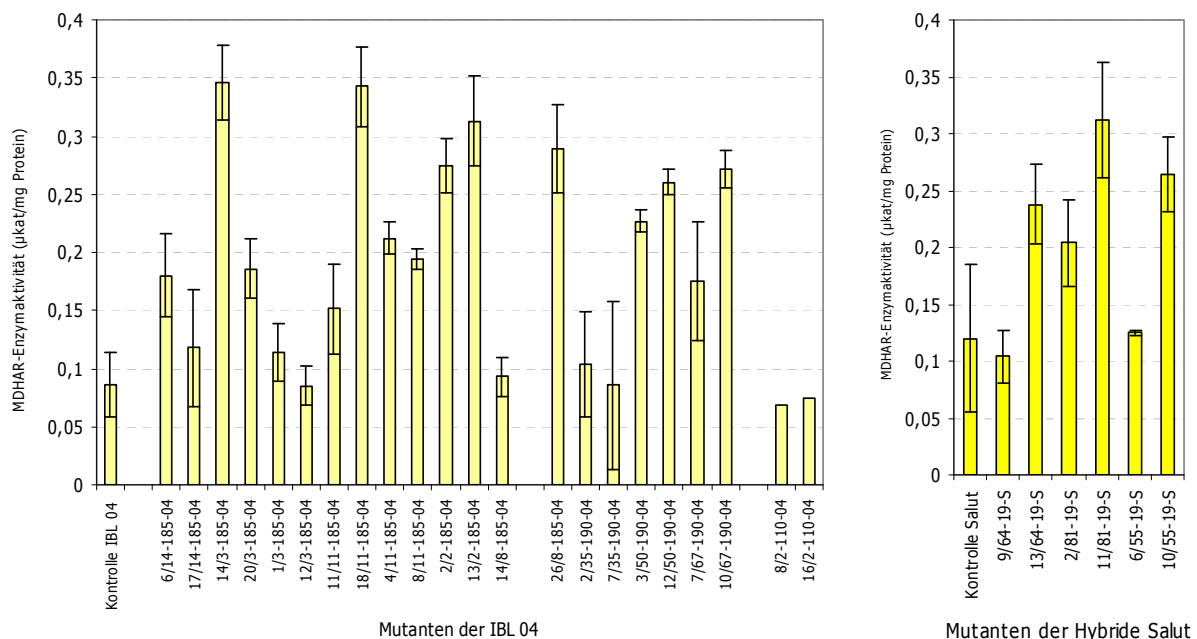
**Abbildung 63** Spezifische APOX-Aktivität in Blättern der Sonnenblumenmutanten der IBL 04 (links) und der Hybride Salut (rechts). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei Replikaten jeder Probe.



Die Sonnenblumenmutante mit höchster APOX (17/14-185-04) hatte auch eine hohe Glutathionreduktase-Aktivität sowie eine hohe Katalase-Aktivität, aber keine besonders hohe Enzymaktivität bezüglich der restlichen Enzyme. Außer der erwähnten Sonnenblumenmutante hatten nur noch drei Sonnenblumenmutanten höhere APOX-Aktivitäten als in der Kontrolle: 7/35-190-04, 14/3-185-04 und 8/11-185-04. Alle anderen Vertreter der IBL 04 verfügten über Aktivität im Bereich der Kontrolle. Die niedrigste Ascorbatperoxidase-Aktivität in dieser Gruppe lag bei 0,2  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (12/50-190-04). Diese Pflanze hatte aber eine sehr hohe Katalase-Aktivität und könnte das Wasserstoffperoxid wahrscheinlich ausschließlich durch diesen alternativen Enzymweg entgiften. Bei der Messung der APOX-Enzymaktivität in den Mutanten der Hybride Salut (Abbildung 63) konnten keine höheren Aktivitäten als in der Kontrolle gemessen werden. Alle sechs Pflanzen zeigten eine niedrigere Aktivität als die Kontrolle, deren Enzymaktivität bei 2,5  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein lag. Die beiden nächstliegenden Aktivitäten in den Mutanten 9/64-19-S und 6/55-19-S waren fast zu Hälfte niedriger als die in der Kontrolle. Die restlichen Sonnenblumenmutanten besaßen APOX-Enzymaktivitäten im Bereich von 1/5 der Kontrolle.

### 3.2.7 MDHAR-Aktivität der Sonnenblumenmutanten

Die Monodehydroascorbatreduktase (MDHAR) ist ein wichtiges Enzym des Ascorbat-Glutathion Zyklus, das für die ständige Nachlieferung von reduziertem Ascorbat



**Abbildung 64** Spezifische MDHAR-Aktivität der in Blättern der Sonnenblumenmutanten der IBL 04 (links) und der Hybride Salut (rechts). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei Replikaten jeder Probe.

verantwortlich ist, indem das Monodehydroascorbat unter NADPH-Verbrauch wieder in Ascorbat überführt wird. MDHAR ist ein stark ausgeprägtes Enzym des Ascorbat-Glutathion Zyklus bei der Entwicklungsreihe IBL 04.

Vierzehn der dreiundzwanzig Mutanten zeigten sehr hohe MDHAR-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Zwei davon, die Mutanten 14/3-185-04 und 18/11-185-04, hatten 2,5mal höhere Enzymaktivitäten als die Kontrolle.

Die MDHAR-Aktivitäten der Mutanten der Hybride Salut (Abbildung 64) sind mit denen der IBL 04 vergleichbar. Ähnlich wie die DHAR-Aktivitäten gab es bei den MDHAR-Aktivitäten nur eine einzige Sonnenblumenmutante, die niedrigere Enzymaktivitäten als die in der Kontrolle hatte: (9/64-19-S). Die gleiche Sonnenblumenmutante verfügte nicht über eine messbare APOX-Aktivität und ihre Katalase-Aktivität war ebenso nicht stark ausgeprägt. Dafür lagen ihre GPOX- und GR-Enzymaktivitäten sehr hoch. Die niedrigste MDHAR-Aktivität bei dieser Mutante lag bei 0,1  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (9/64-19-S) und die höchste Aktivität um die 3,1  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (11/81-19-S). Die Sonnenblumenmutante mit der höchsten Enzymaktivität verfügte auch über die höchsten Aktivitäten bei der GPOX und der DHAR. Dafür zeigte sie nur extrem niedrige POX-, APOX- und Katalase-Aktivitäten.

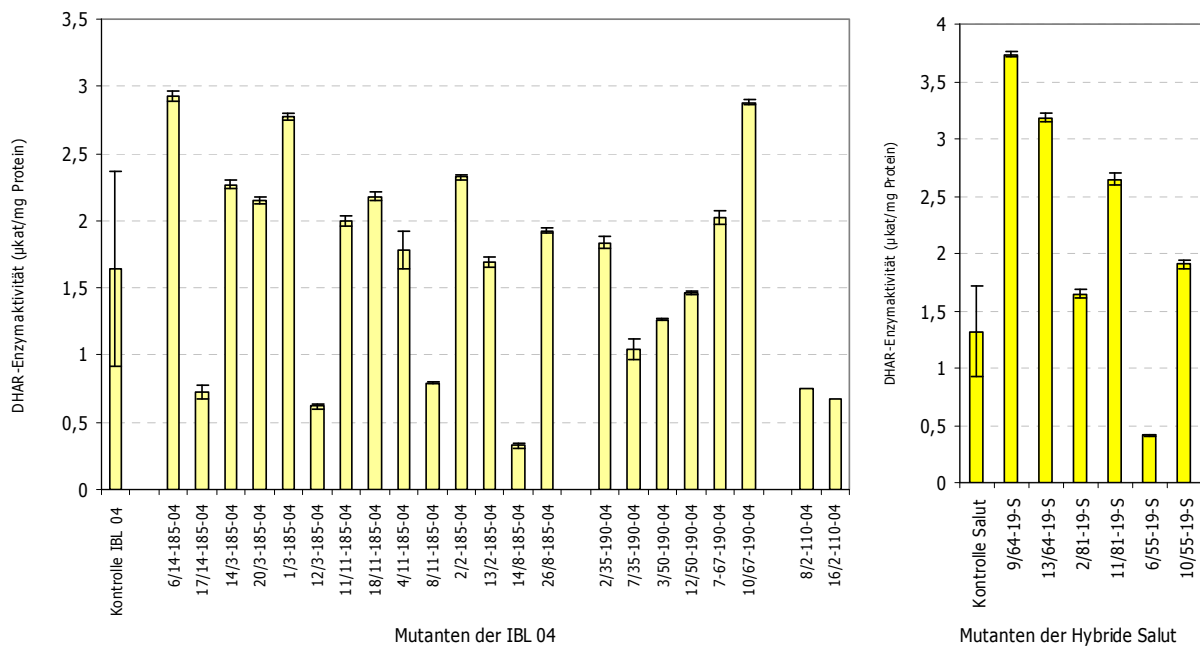
### 3.2.8 DHAR-Aktivität der Sonnenblumenmutanten

Die Dehydroascorbatreduktase (DHAR) ist ein Teil des Ascorbat-Glutathion Zyklus, in dem aus Dehydroascorbat (spontan gebildet aus dem Monodehydroascorbat), Ascorbat und oxidiertes Glutathion freigesetzt werden. Die DHAR hat generell höhere Aktivitäten als die MDHAR in denselben Proben.

Bei den Mutanten der IBL 04 konnten keine hohen Aktivitäten für dieses Enzym bestimmt werden (Abbildung 65). Nur die Sonnenblumenmutanten 6/14-185-04, 1/3-185-04 und 10/67-190-04 hatten höhere Enzymaktivitäten als in der Kontrolle. Die vorwiegende Mehrheit der restlichen Sonnenblumenmutanten zeigte DHAR-Aktivitäten im Bereich der Kontrolle. Sechs der Sonnenblumenmutanten, nämlich 17/14-185-04, 8/2-110-04, 16/2-110-04, 12/3-185-04, 8/11-185-04 und 14/8-185-04, zeigten wesentlich niedrigere Aktivitäten als in der Kontrolle. Die Proben 17/14-185-04 und 8/11-185-04 hatten dabei eine ausgeprägte Katalase-Aktivität, während in den anderen Sonnenblumenmutanten weder eine APOX- noch eine Katalase-Aktivität messbar waren. Die niedrigste DHAR-Aktivität bei den IBL 04-Mutanten lag bei 0,4  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein und die höchste bei 2,9  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein.

Die Sonnenblumenmutanten der Hybride Salut wiesen ausgeprägte Unterschiede in den Aktivitäten für die Dehydroascorbatreduktase auf (Abbildung 65). Eine einzige Mutante hatte

niedrigere DHAR-Enzymaktivitäten als in der Kontrolle: (6/55-19-S). Ihre Aktivität betrug nur 0,4  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein, während die höchste Aktivität bei 3,7  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein lag (9/64-19-S). Die höchste in den Salutmutanten gemessene Aktivität war minimal höher als die der Mutanten von IBL 04. Die Mutanten der Hybride Salut, die eine hohe DHAR-Aktivität aufweisen, hatten zugleich geringe APOX-Enzymaktivität.



**Abbildung 65** Spezifische DHAR-Aktivität in Blättern der Sonnenblumenmutanten der IBL 04 (links) und der Hybride Salut (rechts). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei Replikaten jeder Probe.

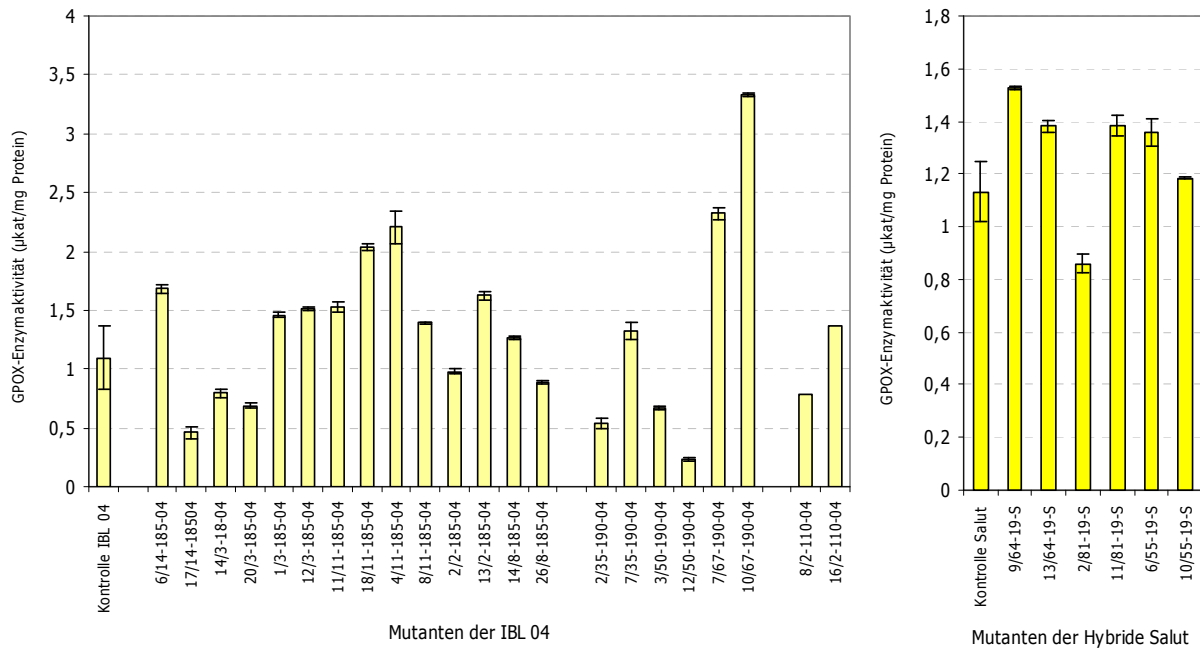
### 3.2.9 GPOX-Aktivität der Sonnenblumenmutanten

Die Glutathionperoxidase (GPOX) ist ein cytosolisches Enzym, das die glutathionabhängige Reduktion von organischen Peroxiden und Wasserstoffperoxid katalysiert (Aoyama et al., 2006). Ihre Enzymaktivität für die Sonnenblumenmutanten der IBL 04 ist in der Abbildung 66 dargestellt. Ihre Aufgabe ist, ähnlich wie die der Katalase und der Ascorbatperoxidase, Peroxide zu reduzieren und Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff abzubauen.

Anscheinend verwendeten mehrere der Sonnenblumenmutanten der IBL 04 die Entgiftungsmöglichkeiten der GPOX für Wasserstoffperoxid. Die eindrucksvollste war die Mutante 10/67-90-04, die über eine 2,5mal höhere Aktivität verfügte. Die gleiche Probe zeigte zwar eine geringe APOX-Aktivität, aber wie nachfolgend zu sehen ist, hatte sie auch eine sehr hohe Katalase-Enzymaktivität. Bei der Sonnenblumenmutante 10/67-90-04 konnten zudem

verhältnismäßig hohe Glutathionreduktase-Aktivitäten im Vergleich zur Kontrolle und den anderen Sonnenblumenmutanten festgestellt werden.

Bei der GPOX-Aktivität der Sonnenblumenmutanten der Hybride Salut, die in der Abbildung 66 dargestellt ist, hatte nur eine einzelne Sonnenblumenmutante (2/81-19-S) eine niedrigere Enzymaktivität als die Kontrolle. Dabei handelt es sich um die Sonnenblumenmutante, die die höchsten GST-Aktivitäten zeigte, aber bei den restlichen Entgiftungsenzymen zeigte sie nur bei der Katalase eine messbare Aktivität.



**Abbildung 66** Spezifische GPOX-Aktivität in Blättern der Sonnenblumenmutanten der IBL 04 (links) und der Hybride Salut (rechts). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei Replikaten jeder Probe.

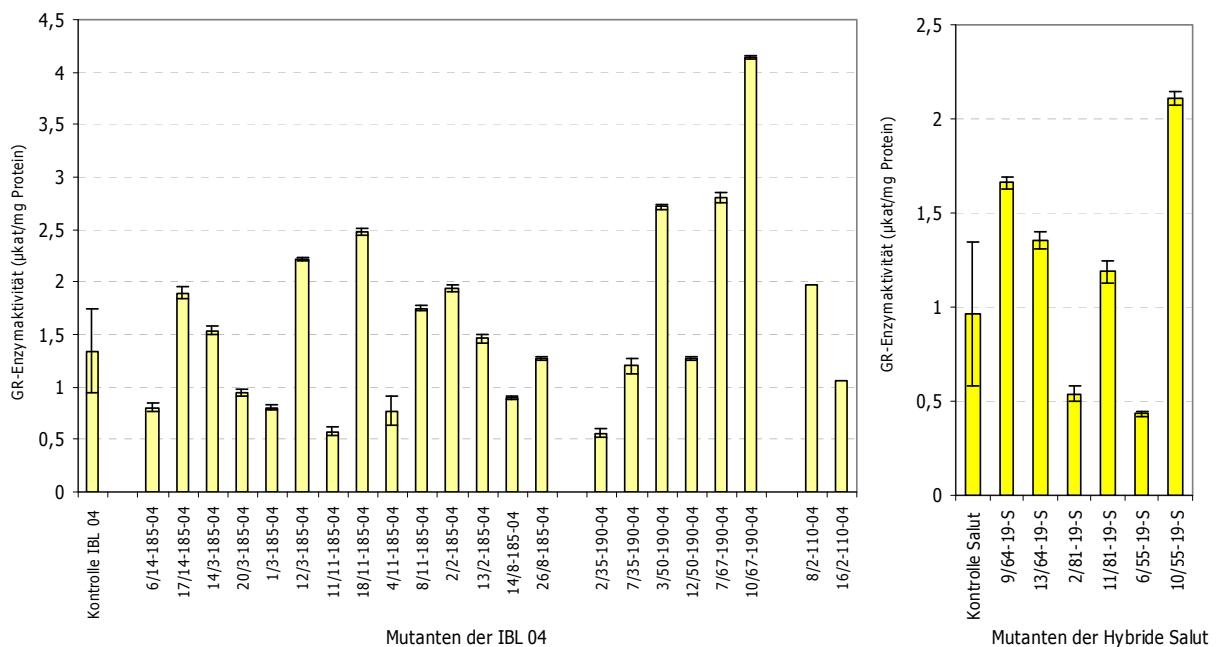
Die höchste Enzymaktivität der restlichen Sonnenblumenmutanten wurde bei der Hybride 9/64-19-S gemessen. Die anderen Proben, bei denen eine höhere GPOX-Aktivität als in der Kontrolle gemessen wurde, waren: 13/64-19-S, 11/89-19-S und 6/55-19-S. Alle ausgewählten Proben zeigten eine geringere APOX-Enzymaktivität als in der Kontrolle; die Katalase- und Superoxiddismutase-Aktivität waren ungleichmäßig verteilt.

### 3.2.10 GR-Aktivität der Sonnenblumenmutanten

Die Glutathionreduktase (GR) spielt eine wesentliche Rolle in den Entgiftungssystemen, weil sie unter NADPH+H<sup>+</sup>-Verbrauch reduziertes Glutathion aus GSSG bereitstellen soll.

Die Ergebnisse der Messungen dieses Enzyms sind in der Abbildung 67 dargestellt. Es soll erwähnt werden, dass mit einer einzigen Ausnahme alle Proben, die erhöhte GR-Aktivität zeigten, auch über eine hohe Enzymaktivität für die Konjugation des Herbizids Fluorodifen verfügten. Die Ausnahme war hier die Sonnenblumenmutante 17/14-185-04, welche hohe GR-Aktivität, aber gleichzeitig gehemmte Fluorodifen-Aktivität hatte. Die restlichen Mutanten 8/2-110-04, 12/3-185-04, 18/11-185-04, 3/50-190-04, 7/67-190-04 und 10/67-190-04 zeigten hohe Enzymaktivität für die GR.

Der niedrigste GR-Wert lag bei 0,5  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein und der höchste knapp über 4  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Die höchste Glutathionreduktase-Aktivität war damit 300% höher als die in der Kontrolle.



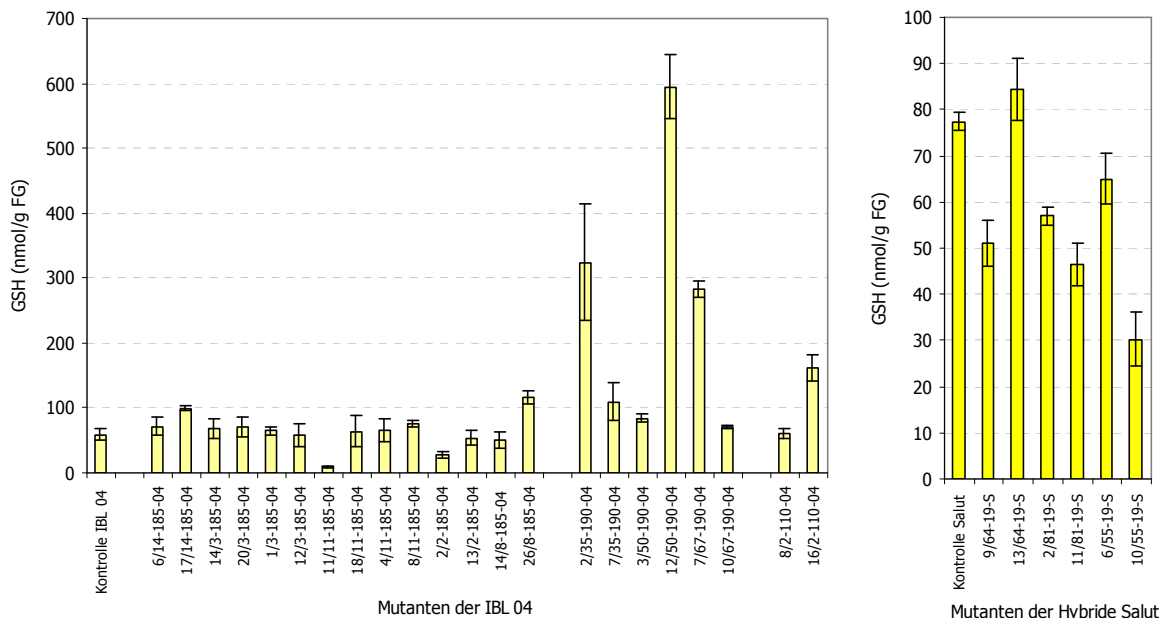
**Abbildung 67** Spezifische GR-Aktivität in Blättern der Sonnenblumenmutanten der IBL 04 (links) und der Hybride Salut (rechts). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei Replikaten jeder Probe.

Im Vergleich zu den Sonnenblumenmutanten der IBL 04 verfügten die Mutanten Salut über niedrigere GR-Aktivitäten (Abbildung 67). Überraschend lagen die höchsten GR-Aktivitäten bei den Mutanten, die die niedrigsten Aktivitäten bei den Modellsubstraten zeigten. Die Sonnenblumenmutanten 9/64-19-S und 10/55-19-S weisen beide einen sehr schlechten Umsatz für das Substrat DCNB auf. Die Pflanze 2/81-19-S, die hier mit die geringste GR-Aktivität hatte (0,5  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein), zeigte interessanterweise eine stark erhöhte GST- und MDHAR-Aktivität.

### 3.2.11 Glutathionhaushalt der Sonnenblumenmutanten

Neben den antioxidativ wirksamen Enzymen verfügen Pflanzen wie alle anderen aeroben Organismen über einen weiteren Mechanismus, um oxidativen Stress zu mildern. Glutathion spielt eine sehr wichtige Rolle beim Transport und der Lagerung, der Proteinsynthese und der Modulation von Enzymaktivitäten (May et al., 1998). Es ist bewiesen, dass das Niveau des Glutathion mit dem oxidativen Stress korreliert. In diesem Zusammenhang wurde auch der Glutathionhaushalt der Sonnenblumenmutanten, die unter realem Schwermetallstress aufwuchsen, untersucht.

In der Abbildung 68 sind die GSH-Gehalte der Mutanten IBL 04 dargestellt. Alle -185-04 Mutanten verfügten über sehr geringe Gehalte an reduziertem Glutathion. Der niedrigste GSH-Gehalt dieser Proben lag bei knapp 10 nmol/g FG (11/11-185-04) und der höchste GSH-Gehalt bei 116 nmol/g FG (26/8-185-04), der auch 190% der Kontrolle ausmacht.



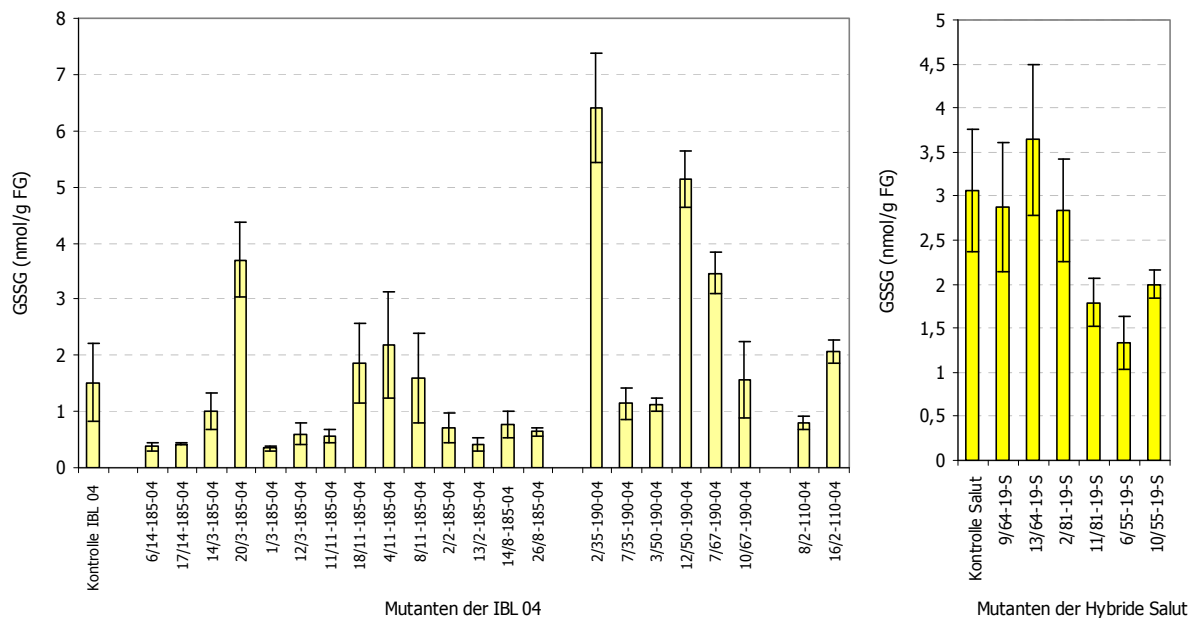
**Abbildung 68** GSH-Konzentration in Blättern der Sonnenblumenmutanten der IBL 04 (links) und der Hybride Salut (rechts). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei Replikaten jeder Probe.

Unter den -190-04-Mutanten wurden die höchsten GSH-Gehalte aller IBL 04-Pflanzen gemessen. Die Mutante 12/50-190-04 verfügte über den 10fachen GSH-Gehalt der Kontrolle (600 nmol/g FG). Zwei weitere Mutanten dieser Gruppe hatten eine deutlich höhere GSH-Konzentration im Vergleich zu der Kontrolle. In der Mutante 2/35-190-04 konnten 547% der Kontrolle gemessen werden; bei der Mutante 7/67-190-04 wurden 474% der Kontrolle

bestimmt. In der Sonnenblumenmutante 16/2-110-04 konnten noch GSH-Gehalte von über 272% der Kontrolle gemessen werden.

GSSG ist die oxidierte Form des Glutathion, die zum Beispiel in der Reaktion der Glutathionperoxidase oder der Dehydroascorbatreduktase mit Peroxiden oder oxidativen Metaboliten entsteht. Damit ist das GSSG/GSH-Verhältnis ein Marker für oxidative Abwehrvorgänge.

Die Kontrolle der IBL 04 verfügte über 1,52 nmol/g FG GSSG (Abbildung 69). Im Unterschied zu den GSH-Gehalten der Kontrolle konnten in mehreren -185-04-IBL 04-Mutanten höhere Konzentrationen als in der Kontrolle gemessen werden. Die Mutante 20/3-185-04 wies 245% des GSSG-Gehaltes der Kontrolle auf. Die gleichen -190-04-Mutanten, deren GSH-Gehalte wesentlich höher als die der Kontrolle waren, hatten auch zwischen 103% und 422% GSSG-Gehalte der Kontrolle.



**Abbildung 69** GSSG-Konzentration in Blättern der Sonnenblumenmutanten der IBL 04 (links) und der Hybride Salut (rechts). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung zwischen drei Replikaten jeder Probe.

Der Glutathionhaushalt der Proben der Salut-Mutanten wurde ebenfalls untersucht. Was als erstes erwähnt werden muss ist, dass diese Proben insgesamt 7mal niedrigere GSH-Gehalte als die IBL 04-Mutanten hatten. Dafür waren aber die GSH-Gehalte der Mutanten von Salut näher um die Kontrolle verteilt. Die Kontrolle Salut verfügte über 77 nmol/g FG GSH, was sogar 10 nmol/g FG über der IBL 04-Kontrolle lag (Abbildung 68). Nur eine einzige Salut-Mutante hatte einen höheren GSH-Gehalt als die Kontrolle und das war 13/64-19-S (109%

der Kontrolle). Die Gehalte der restlichen Mutanten der Hybride Salut wiesen zwischen 40% und 84% der Kontrolle auf.

Dieser wesentliche Unterschied in der GSH-Konzentration der Salut-Mutanten im Vergleich zu den IBL 04-Mutanten bezieht sich nur auf die -190-04-Mutanten der IBL 04. Die Vergleichbarkeit der GSH-Konzentration in den -185-04-IBL 04-Mutanten und den Sonnenblumenmutanten der Hybride Salut war ansonsten sehr hoch (Abbildung 68).

Wie bei den GSH-Gehalten in den Kontrollen von IBL 04 und denen der Hybride Salut festgestellt wurde, verfügte die Salut-Kontrolle über eine höhere GSH-Konzentration. Dies spiegelte sich auch bei der GSSG-Messung wider. Die Salut-Kontrolle enthielt 3 nmol/g FG GSSG gegenüber 1,52 nmol/g FG GSSG in der Kontrolle der IBL 04. Die Mutante 13/64-19-S verfügte über eine 18% höhere GSSG-Konzentration als die Kontrolle. Alle restlichen Pflanzen, außer der Mutante 6/55-19-S, haben ca. 20% höhere GSSG-Konzentrationen im Vergleich zu ihrer GSH-Konzentrationen in der Kontrolle. Bei der Mutante 11/81-19-S konnte keine Veränderung der gesamten Glutathiongehalte (GSH/GSSG) festgestellt werden. Ihre GSH-Konzentration blieb unverändert.

### **3.2.12 Bestimmung der Enzymaktivitäten der GSTs**

#### **3.2.12.1 CDNB-GST-Aktivität der Sonnenblumenmutanten**

In der Tabelle 47 ist die spezifische GST-Aktivität in Proteinextrakten der Mutanten der IBL 04 dargestellt. Die in den Extrakten gemessenen CDNB-GST-Aktivitäten lagen zwischen 0,08 und 0,6  $\mu$ kat/mg Protein. Bei fünf Sonnenblumenmutanten dieser Gruppe konnten sehr stark erhöhte GST-Enzymaktivitäten gemessen werden. Die höchste war die Aktivität der Sonnenblumenmutante 14/8-185-04. Drei weitere Mutanten mit höherer Aktivität für das Substrat Chlordinitrobenzol (CDNB) als in der Kontrolle gehörten zu der Gruppe der -185-04 Sonnenblumenmutanten. Es ist zu bemerken, dass die hier erwähnten hohen Aktivitäten der *Helianthus*-Blätterextrakte immer noch vergleichsweise niedriger waren als die GST-Aktivitäten anderer Pflanzenarten, zum Beispiel die der Blätter von *T. latifolia*.

Bei den Mutanten, die aus der Hybride Salut entwickelt worden waren, hatten vier von sechs Pflanzen höhere CDNB-GST-Aktivitäten als die Kontrollen. Die höchste GST-Aktivität wurde bei den Sonnenblumenmutanten 13/64-19-S gemessen. Deren spezifische GST-Aktivität war im Vergleich wesentlich höher als die der restlichen drei Mutanten, die verglichen mit der Kontrolle über eine höhere CDNB-GST-Aktivität verfügten. Dieselbe Pflanze hatte auch die höchste Trockenmasse von allen Sonnenblumenmutanten aus der Hybride Salut (Tabelle 47). Trotz der insgesamt höheren spezifischen CDNB-GST-Aktivität im Enzymextrakt der einzelnen Mutanten dieser Hybride war die höchste GST-Aktivität hier niedriger als bei der IBL 04.



**Tabelle 47** Spezifische GST-Aktivität in den Sonnenblumenmutanten der IBL 04 und der Hybride Salut. Die Enzymaktivitäten wurden für vier Substrate (CDNB, NBoC, NBC, DCNB) und ein Herbizid (Fluorodifen) bestimmt. Jede Probe wurde im Triplikat gemessen und die Standardabweichungen wurden von diesen drei Messungen bestimmt. Die Aktivitäten sind in  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein angegeben. Mit „n.g“ ist nicht gemessen gekennzeichnet.

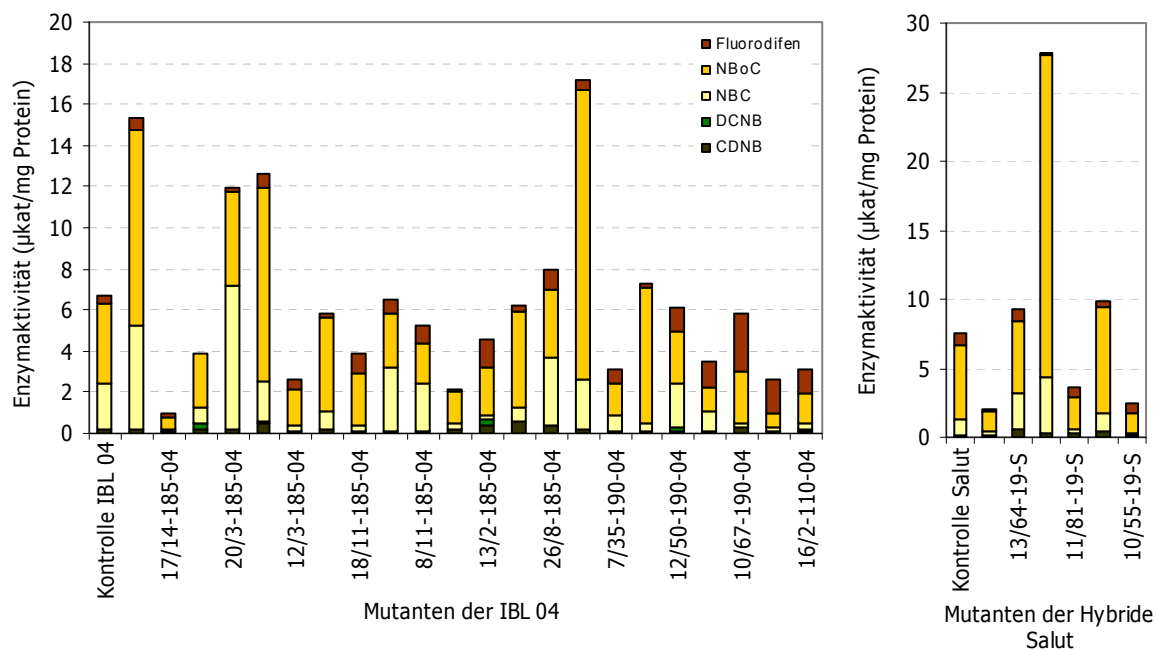
M3-Sonnenblumenmutanten	Spezifische Aktivität der GSTs für fünf verschiedene Substrate					
	Cd (mg/Kg TG)	CDNB	NBoC	NBC	DCNB	Fluorodifen
Sonnenblumenmutanten der Entwicklungslinie IBL 04						
Kontrolle IBL 04	1,2	0,171±0,06	3,932±1,45	2,207±1,16	0,038±0,02	0,303±0,01
6/14-185-04	n.g	0,172±0,01	9,590±0,01	5,011±0,03	0,021±0,01	0,538±0,01
17/14-185-04	1,04	0,089±0,03	0,610±0,03	0,096±0,03	0,027±0,03	0,149±0,03
14/3-185-04	1,2	0,169±0,05	2,581±0,05	0,778±0,5	0,348±0,05	0,033±0,05
20/3-185-04	0,96	0,169±0,03	4,545±0,03	7,038±0,04	0,025±0,03	0,207±0,03
1/3-185-04	0,8	0,501±0,02	9,388±0,16	1,973±0,02	0,040±0,02	0,743±0,02
12/3-185-04	1,04	0,099±0,02	1,791±0,02	0,239±0,02	0,016±0,02	0,450±0,02
11/11-185-04	0,8	0,173±0,01	4,570±0,01	0,872±0,01	0,006±0,001	0,250±0,01
18/11-185-04	0,96	0,112±0,03	2,588±0,03	0,216±0,03	0,021±0,03	0,907±0,04
4/11-185-04	0,8	0,099±0,03	2,618±0,03	3,073±0,03	0,0169±0,03	0,712±0,03
8/11-185-04	n.g	0,108±0,01	1,949±0,13	2,274±0,13	0,015±0,01	0,943±0,13
2/2-185-04	0,96	0,202±0,01	1,632±0,01	0,210±0,01	0,025±0,01	0,061±0,01
13/2-185-04	0,88	0,364±0,02	2,291±0,02	0,226±0,02	0,280±0,02	1,399±0,02
14/8-185-04	0,8	0,572±0,04	4,619±0,03	0,692±0,03	0,020±0,01	0,347±0,03
26/8-185-04	0,88	0,360±0,02	3,315±0,01	3,262±0,017	0,023±0,01	1,024±0,02
2/35-190-04	1,28	0,172±0,01	14,075±0,02	2,420±0,01	0,029±0,01	0,505±0,01

7/35-190-04	0,88	0,104±0,03	1,514±0,03	0,784±0,04	0,011±0,03	0,674±0,03
3/50-190-04	1,12	0,126±0,04	6,630±0,04	0,336±0,04	0,016±0,014	0,208±0,04
12/50-190-04	1,04	0,128±0,07	2,580±0,07	2,058±0,07	0,201±0,07	1,111±0,07
7/67-190-04	1,04	0,057±0,01	1,137±0,01	1,006±0,01	0,031±0,01	1,294±0,01
10/67-190-04	1,04	0,298±0,01	2,496±0,01	0,166±0,01	0,030±0,01	2,822±0,01
8/2-110-04	0,96	0,098±0,05	0,709±0,05	0,168±0,05	0,012±0,005	1,607±0,05
16/2-110-04	1,12	0,122±0,01	1,484±0,01	0,290±0,01	0,030±0,01	1,184±0,01
Sonnenblumenmutanten der Hybride Salut						
Kontrolle Salut	1,12	0,159±0,02	5,338±1,10	1,126±0,31	0,005±0,002	0,958±0,30
9/64-19-S	1,2	0,140±0,02	1,409±0,02	0,236±0,02	0,042±0,01	0,243±0,02
13/64-19-S	1,12	0,513±0,03	5,177±0,03	2,727±0,03	0,020±0,01	0,766±0,03
2/81-19-S	n.g	0,289±0,03	23,315±0,09	4,042±0,04	0,034±0,02	0,188±0,03
11/81-19-S	1,12	0,275±0,05	2,298±0,05	0,334±0,05	0,033±0,05	0,663±0,05
6/55-19-S	1,04	0,385±0,01	7,780±0,01	1,287±0,01	0,007±0,001	0,431±0,01
10/55-19-S	1,04	0,094±0,03	1,451±0,03	0,174±0,03	0,022±0,01	0,667±0,03

### 3.2.12.2 NBoC-GST-Aktivität der Sonnenblumenmutanten

Zur weiteren Charakterisierung der Entgiftungskapazität wurden in der Folge Chlorbenzole eingesetzt, die nur selten zur GST-Aktivitätsbestimmung benutzt werden, denn es hatte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit herausgestellt, dass diese differenzierte Betrachtungsweise wertvolle Hinweise auf die Entgiftungskapazität der untersuchten Pflanzen unter multipler Belastung geben konnte.

Nur vier Vertreter der Mutantenlinie IBL 04 hatten höhere NBoC-GST-Enzymaktivitäten als die Kontrolle (8-10/IBL 04). Der Verlauf kann in der Tabelle 47 und auf der Abbildung 70 gesehen werden. Die vier erwähnten Proben 6/14-185-04, 2/35-190-04, 1/3-185-04 und 3/50-190-04 verfügten aber jeweils über 50 bis zu 250% höhere GST-Aktivitäten. Insgesamt zeigten alle untersuchten Sonnenblumenmutanten dieser Linie wesentliche Steigerungen der Nitrobenzoylchlorid (NBoC) GST-Aktivität, da sie fast 12mal höher als die Chlordinitrobenzol-Aktivitäten waren.



**Abbildung 70** GST-Aktivität für alle Modellsubstrate in Blättern der Mutanten der IBL 04 (links) und der Hybride Salut (rechts) gestapelt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert zwischen drei Replikaten jeder Probe.

In der Abbildung 70 sind die spezifischen GST-Aktivitäten der Sonnenblumenmutanten der Hybride Salut dargestellt. Die niedrigste GST-Aktivität lag ungefähr bei 2 µkat/mg Protein und die höchste bei 24 µkat/mg Protein (2/81-19-S). Die letztgenannte Mutante hatte damit die höchste GST-Aktivität von allen untersuchten Pflanzen. Die Sonnenblumenmutante 2/81-19-S hatte im Vergleich zu der Kontrolle Salut eine um 400% höhere spezifische Aktivität.

Hier kann wie bei der Sonnenblumenmutantenlinie IBL 04 die Aussage getroffen werden, dass das Modellsubstrat NBoC die höchste GST-Aktivität aller Chlorbenzolsubstrate für die Enzymextrakte des Pflanzenmaterials der Hybride Salut hatte.

### **3.2.12.3 NBC-GST-Aktivität der Sonnenblumenmutanten**

Wie man in der Tabelle 47 erkennt, gab es nur zwei Proben unter den Mutanten der IBL 04, die eine ausgeprägt höhere GST-Aktivität für NBC als die Kontrolle hatten: 6/14-185-04 mit entsprechend 5  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein und 20/3-185-04 mit 7  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein spezifische Enzymaktivität. Die vorwiegende Mehrheit der restlichen Mutanten hatte eine wesentlich niedrigere NBC-GST-Aktivität als die Kontrolle. Die niedrigste NBC-GST-Aktivität in IBL 04 Mutanten betrug 0,3  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein und die höchste GST-Aktivität lag bei knapp 7  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein.

Bei der Beobachtung der Sonnenblumenmutanten Salut, Tabelle 47, soll erwähnt werden, dass erneut die Pflanzen 13/64-19-S und 2/81-19-S am aktivsten waren und über die höchsten spezifischen GST-Aktivitäten im Vergleich zur Kontrolle verfügten. Diese beiden Mutanten hatten eine ausgeprägt hohe Aktivität für den Umsatz der Substrate CDNB und DCNB (13/64-19-S) und CDNB, DCNB und NBoC (2/81-19-S). So wurde das Modellsubstrat NBC mit einer spezifischen Enzymaktivität von 2,7 beziehungsweise 4  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein umgesetzt. Die GST-Aktivitäten der erwähnten Mutanten waren fast 1,5 und 3mal höher als die der Kontrolle. Solche Unterschiede der GST-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ist nur bei den Mutanten und den erwähnten Modellsubstraten der Hybride Salut beobachtet worden. Die restlichen Pflanzen der Hybride Salut hatten für die anderen Modellsubstrate gleiche oder niedrigere Enzymaktivität als die Kontrolle.

### **3.2.12.4 DCNB-GST-Aktivität der Sonnenblumenmutanten**

Die spezifische Aktivität der GSTs für das Modellsubstrat Dichlornitrobenzol (DCNB) ist in der Tabelle 47 dargestellt. Keine der Sonnenblumenmutanten der IBL 04, außer: 12/50-190-04 zeigte eine höhere DCNB-GST-Aktivität als die Kontrolle selbsts. Die Enzymaktivität dieser Mutante war 4mal höher als in der Kontrolle (6-10/IBL 04). Für die Konjugation des Modellsubstrats NBoC zeigte die gleiche Sonnenblumenmutante eine 10mal höhere Aktivität: 2,3  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein.

Im Vergleich mit den GST-Aktivitäten der IBL 04 hatten alle Salut-Mutanten höhere Enzymaktivitäten als die Kontrolle (Tabelle 47). Die niedrigste GST-Aktivität, die hier gemessen wurde, lag bei 0,005  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (Kontrolle) und die höchste Enzymaktivität für die DCNB-Messungen der Hybridmutanten lag bei 0,043  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Dieser Wert stellte das Aktivitätsminimum für die Salutenzymextrakte dar. Die Sonnenblumenmutante 2/81-19-S wies, verglichen mit der Kontrolle, erneut eine substratspezifische Steigerung der Enzymaktivität auf, wie es auch bei NBoC und NBC der Fall war. Vergleiche zwischen den Proben der Hybride Salut und die Proben der IBL 04 zeigten, dass die letztgenannten im Durchschnitt über eine höhere DCNB-Enzymaktivitäten verfügten.

#### **3.2.12.5 Fluorodifen-GST-Aktivität der Sonnenblumenmutanten**

Es wird vermutet, dass es GST-Isoenzymgruppen gibt, die eine Aktivität für die Konjugation von xenobiotischen Diphenylethern, wie z.B. das Herbizid Fluorodifen, zeigen. Um dieses nachzuforschen, wurden die Sonnenblumenextrakte der IBL 04-Proben mit diesem Substrat untersucht. Im Unterschied zu CDNB (Tabelle 47) konnten nach den Messungen mit Fluorodifen höhere GST-Aktivitäten nachgewiesen werden. Die höchste Aktivität lag bei dem Mutanten 10/67-190-04 mit 2,822  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Die niedrigste GST-Enzymaktivität wurde mit 0,061  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein in 2/2-185-04 gemessen. Die Hälfte der IBL 04-Mutanten hatte eine mehr als 200% höhere Enzymaktivität als die Kontrolle. Im Gegensatz dazu gab es drei Mutanten, deren Fluorodifen-GST-Aktivität niedriger als 90% der Kontrolle war.

Während es unter den IBL 04-Mutanten mehrere Proben gab, deren GST-Enzymaktivität über 1  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein lag, gab es bei den Salut-Mutanten keinen Vertreter, der diese Marke überschreiten konnte. Die niedrigste GST-Fluorodifen-Aktivität lag bei 0,188  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (2/81-19-S). Damit war diese Aktivität höher als die niedrigste GST-Enzymaktivität, die bei den IBL 04-Mutanten gemessen werden konnte. Die höchste Fluorodifen-GST-Aktivität lag in der Kontrolle mit 0,958  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (Tabelle 47). Damit war aber diese Enzymaktivität 2,5fach niedriger als die höchste GST-Aktivität der IBL 04.

#### **3.2.12.6 Zusammenfassende Auswertung der Sonnenblumen-Versuche**

Um die Zusammenhänge zwischen den bei den Sonnenblumenmutanten beschriebenen Effekten auf einzelne Enzyme des antioxidativen Zyklus korrelierbar zu machen, wurden die

Tabellen 48 und 49 erstellt. In diesen Tabellen wurden die einzelnen Enzymaktivitäten, die Konzentration von Malondialdehyd und die Pigmentgehalte relativ zu den Kontrollen für beide Sonnenblumenmutanten beschrieben.

Bei der Betrachtung der beiden Tabellen wird die Aufmerksamkeit mehr auf die Aktivität der einzelnen Enzyme als auf die Unterschiede zwischen den Mutanten fokussiert.

#### **Vergleich der Antioxidantienkapazität der Sonnenblumenmutanten der IBL 04**

Bei den Untersuchungen der Entgiftungskapazität der einzelnen Enzyme in den Mutanten der IBL 04 konnte festgestellt werden, dass das Maximum bezüglich der Aktivität bei der Mehrheit der Mutantepflanzen dieser Gruppe im Ascorbat-Glutathion Zyklus lag. Wenn die in diesem Zyklus gemessenen Enzymaktivitäten vertieft betrachtet wurden, war auffällig, dass das lokale Maximum in der Monodehydroascorbatreduktase lag (Tabelle 48), gefolgt von der Peroxidase. Dreizehn der dreiundzwanzig untersuchten Sonnenblumenmutanten der IBL 04 zeigten 200 bis 400% höhere MDHAR-Enzymaktivität als die Kontrolle und in einem Fall konnte sogar eine 400 bis 600% höhere MDHAR-Aktivität gemessen werden.

Bei der erwähnten Peroxidase Aktivität wurde bei acht Proben (ein Drittel aller Messungen) 150 bis zu 400% erhöhte POX-Aktivitäten gemessen.

Bei den Enzymaktivitäten der GSTs wurden zwar die höchsten GST-Aktivitäten für die Konjugation von NBOC gemessen, die höchste Induzierbarkeit wurde jedoch für die Fluorodifen-konjugierende-GST bestimmt. In dreizehn der Mutanten der IBL 04 konnten Fluorodifen-GST-Aktivitäten um 200 bis 1000% (10/67-190-04) höher als die Fluorodifen-GST-Aktivität der Kontrolle gemessen werden. Die Induzierbarkeit der restlichen GST-Aktivitäten war eher gering.

Die Enzymaktivitäten des Glutathionperoxidase-Zyklus sind niedriger als die des Ascorbat-Glutathion Zyklus (Tabelle 48). Das Interessante hierbei ist, dass die höchsten Aktivitäten von GPOX und von GR in den gleichen Sonnenblumenmutanten auftraten: 18/11-185-04, 3/50-190-04 und 10/67-190-04.

Die Verteilung der höchsten Enzymaktivitäten bei der SOD und der Katalase ist von der Anzahl der aktiven Sonnenblumenmutanten ungefähr gleich: 15 zu 14. Was aber die Höhe der Enzymaktivitäten beträgt, lag die Katalase vorne. Vierzehn von den IBL 04-Mutanten hatten CAT-Aktivität über 200% im Vergleich zu der Kontrolle und bei vier davon lag diese Aktivität zwischen 600 und 1500%.

Zusammenfassend kann erwähnt werden, dass die zwei Sonnenblumenmutanten der IBL 04, 6/14-185-04 und 10/67-190-04, bei sieben unterschiedlichen Enzymmessungen sehr hohe Aktivitäten gezeigt haben und damit die aktivsten aller IBL 04-Mutanten darstellten.

**Vergleich der Antioxidantienkapazität in den Sonnenblumenmutanten der Hybride Salut**

Wie in der Tabelle 49 zu sehen ist, konnten bei den Enzymen der Hybrid Salut nicht so hohe Aktivitäten gemessen werden wie in den Mutanten der IBL 04. Die Steigerung der Aktivitäten konnte nur die Marke von 400-600% erreichen.

Im Ascorbat-Glutathion Zyklus sind, genau wie bei den IBL 04-Mutanten, die höchsten Aktivitäten bei der MDHAR festgestellt worden, die im Unterschied zu den Enzymaktivitäten der IBL 04 nicht von der POX, sondern von der DHAR gefolgt wird. Keine der Mutanten von Salut hatte extrem hohe Peroxidasenaktivität gezeigt.

Die Katalase ist ein anderes Enzym, bei dem in drei Salut-Mutanten-Aktivitäten über 200% im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden konnten.

Keine der Pflanzen der Hybride Salut zeigte eine relevante Erhöhung der Konzentration von Malondialdehyd (Tabelle 49).

Überraschend hatten die Salut-Mutanten keine GST-Enzymaktivität für das Herbizid Fluorodifen, dafür konnten 400 bis 600% erhöhte GST-Aktivitäten für die Konjugation des Modells substrats DCNB festgestellt werden. Hier liegt also offenbar ein anderes GST-Isoenzymmuster vor als bei IBL 04.

Als aktivste aller Salutmutanten zeigte sich die Sonnenblumenmutante 2/81-19-S, bei der auch die höchste GST-Enzymaktivität gemessen werden konnte. Die Salut-Mutante, bei der die niedrigste Enzymaktivitäten gezeigt wurden, war: 6/55-19-S.

**Tabelle 48** Vergleich aller Antioxidantien-Enzymaktivitäten der Sonnenblumenmutanten der IBL 04. Die Tabelle repräsentiert die Aktivitäten der einzelnen Enzyme, verglichen mit der Kontrolle. Die Kontrolle ist gleich 100% gesetzt und in der Tabelle nicht aufgetragen. Symbolerläuterungen: ↓ Enzymaktivität unter 75 % im Vergleich mit der Kontrolle, ● 75-150% zur Kontrolle, \* 150-200% zur Kontrolle, ↑ 200-400% zur Kontrolle, ↑↑ 400-600% zur Kontrolle, ↑↑↑ 600-1000% zu Kontrolle, ↑↑↑↑ 1000-1500% zur Kontrolle. Mit „n.g.“ ist nicht gemessen gekennzeichnet worden.

IBL 04-Mutanten	6/14-185-04	17/14-185-04	14/3-185-04	20/3-185-04	1/3-185-04	12/3-185-04	11/11-185-04	18/11-185-04	4/11-185-04	8/11-185-04	2/2-185-04	13/2-185-04	14/8-185-04	26/8-185-04	2/35-190-04	7/35-190-04	3/50-190-04	12/50-190-04	7/67-190-04	10/67-190-04	8/2-110-04	16/2-110-04
Cd (mg/Kg TG)	n.g	1,04	1,2	0,96	0,8	1,04	0,8	0,96	0,8	n.g	0,96	0,88	0,8	0,88	1,28	0,88	1,12	1,04	1,04	1,04	0,96	1,12
Konzentration des Malondialdehyds																						
MDA	●	●	●	●	●	●	↓	●	●	●	↓	●	↓	●	●	●	↓	↓	↓	●	●	●
Enzymaktivitäten der anderen Enzyme																						
SOD	↓	↓	↑	*	●	●	*	●	●	●	●	*	*	●	↓	●	●	↑	↑	●	●	↓
CAT	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑	↓	↓	↑↑↑	↓	↓	↓	↑	↓	↑↑	↑	↑↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑↑	↓	●
Enzymaktivitäten des Ascorbat-Glutathion Zyklus																						
POX	↓	↓	↓	↓	↓	↑	●	*	*	●	*	↑	↓	↓	*	↓	↑	↑	↓	↓	●	●
APOX	●	*	*	●	↓	↓	●	↓	↓	●	↓	↓	↓	↓	↓	●	↓	↓	↓	↓	↓	●
MDHAR	↑	●	↑↑	↑	●	●	*	↑	↑	↑	↑	↑	●	↑	●	●	↑	↑	↑	↑	●	●
DHAR	*	↓	●	●	*	↓	●	●	●	↓	●	●	↓	●	●	↓	●	●	●	*	↓	↓



Fortsetzung Tabelle 48

Enzymaktivitäten des Glutathionperoxidase Zyklus																						
GPOX	*	↓	↓	↓	•	•	•	*	↑	•	•	•	•	•	↓	•	↓	↓	↑	↑	↓	•
GR	↓	•	•	↓	↓	*	↓	*	↓	•	•	•	↓	•	↓	•	↑	•	↑	↑	•	•
GSH/GSSG	↑	↑	*	↓	↑	↑	↓	•	•	•	•	↑	*	↑	•	↑	*	↑	↑	•	*	↑
	↑	↑			↑							↑		↑							*	↑
Enzymaktivitäten der GSTs																						
CDNB	•	↓	•	•	↑	↓	•	↓	↓	↓	•	↑	↑	↑	•	↓	↓	↓	↓	*	↓	↓
DCNB	↓	↓	•	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	•	↓	↓	↑	•	•	↓	•
NBC	↑	↓	↓	↑	•	↓	↓	↓	•	•	↓	↓	↓	•	•	↓	↓	•	↓	↓	↓	↓
NBoC	↑	↓	↓	•	↑	↓	•	↓	↓	↓	↓	↓	•	↓	↑	↓	*	↓	↓	↓	↓	↓
Fluorodifen	↑	↓	•	↓	↑	•	•	↑	↑	↑	↓	↑	•	↑	*	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑
												↑								↑	↑	↑

**Tabelle 49** Vergleich aller Antioxidantien-Enzymaktivitäten der Sonnenblumenmutanten der Hybride Salut. Die Tabelle repräsentiert die Aktivitäten der einzelnen Enzyme, verglichen mit der Kontrolle. Die Kontrolle ist gleich 100% gesetzt, und in der Tabelle nicht aufgetragen. Symbolerläuterungen: ↓ Enzymaktivität unter 75% im Vergleich zur Kontrolle, ● 75-150% zur Kontrolle, \* 150-200% zur Kontrolle, ↑ 200-400% zur Kontrolle, ↑↑ 400-600% zur Kontrolle. Mit „n.g.“ ist nicht gemessen gekennzeichnet worden.

Salut Mutanten	9/64-19-S	13/64-19-S	2/81-19-S	11/81-19-S	6/55-19-S	10/55-19-S
Konzentration des Malondialdehyds						
MDA	↓	●	n.g	●	●	●
Enzymaktivitäten der anderen Enzyme						
SOD	●	●	↓	●	●	↓
CAT	●	↓	↑	↓	↑	↑
Enzymaktivitäten des Ascorbat-Glutathion Zyklus						
POX	↓	↓	↓	↓	●	●
APOX	↓	↓	↓	↓	↓	↓
MDHAR	●	*	*	↑	●	↑
DHAR	↑	↑	●	↑	↓	●
Enzymaktivitäten des Glutathinperoxidase Zyklus						
GPOX	●	●	●	●	●	●
GR	*	●	↓	●	↓	↑
GSH/GSSG	↓	●	●	●	*	↓
Enzymaktivitäten der GSTs						
CDNB	●	↑	*	*	↑	↓
DCNB	*	*	↑↑	↑↑	●	●
NBC	↓	*	↑	↓	●	↓
NBoC	↓	●	n.g	●	●	●
Fluorodifen	↓	●	↓	↓	↓	↓

### 3.3 Ergebnisse der Enzymmessungen in Tabak

Im Labor der PHYTO TECH (Schweiz) waren die Metallaufnahmekapazität und das Metall-extraktionsvermögen ausgewählter Tabakklone untersucht worden. Bis dahin lagen keine Untersuchungen dieser Tabakvarianten bezüglich ihrer möglichen GST-Enzymaktivität für organische Kontaminanten vor. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die spezifischen Enzymaktivitäten der GSTs bestimmt. Daneben wurden auch die Aktivitäten mehrerer Enzyme, die am Antioxidationszyklus beteiligt sind sowie Veränderungen im Pigmenthaushalt unter Schwermetall-Einfluss beschrieben. Im Feldversuch hatten alle Tabakvarianten, außer einer einzigen (1/NBCu 10-4 F1 WT), eine 1-, 1,5- und 2fache Menge an Ammoniumsulfat (AS) und Ammoniumnitrat (AN) als Dünger erhalten, um die Metallaufnahmekapazität zu erhöhen. Unsere Hypothese war, dass diese zusätzliche Behandlung auch Auswirkungen auf die Antioxidationsenzyme und die Entgiftung organischer Schadstoffe haben könnte.

#### 3.3.1 Pigmentanalyse der Tabakklone

Die Daten über die aus diesen Tabakpflanzen isolierten Chlorophyll- und Carotinoidkonzentrationen sind in der Tabelle 50 dargestellt. Hier ist besonders interessant, dass die höchste und die niedrigste Chlorophyll a-Konzentration in den von FoP stammenden Tabakklonen und ihrer Mutterpflanze gemessen wurde:  $21,043 \pm 0,08 \mu\text{g/g FG}$  (2/NFCu 7-19 F1 2AN) und  $8,859 \pm 0,06 \mu\text{g/g FG}$  (FoP 1AN+1AS). Die andere Mutterpflanze (BAG), die mit der anderen Düngungskombination gedüngt worden war, zeigte interessanterweise den gleichen Chlorophyll a-Gehalt wie FoP, nämlich  $8,886 \pm 0,03 \mu\text{g/ FG}$  (3/BAG 1,5AN+1,5AS).

In den von BAG stammenden Tabakklonen konnte der größte Gehalt an Chlorophyll a in der Probe 1/NBCu 10-8 F1 1AN+1AS bestimmt werden, die über  $18,898 \pm 0,17 \mu\text{g/g FG}$  verfügte. Anscheinend hatte die Düngung einen besonderen Einfluss auf die Chlorophyll-Konzentration der Tabakklone mit FoP-Ursprung, aber nicht auf die der Mutterpflanze BAG. Dies spiegelt sich auch bei der Chlorophyll b-Bestimmung und in der Gesamtchlorophyll-Konzentration wider. Während die Unterschiede zwischen der niedrigsten und der höchsten Chlorophyllkonzentration den Faktor 3 ausmachten, konnten bei den Carotinoiden nur geringe Konzentrationsunterschiede festgestellt werden. Trotz der größeren Schwankungen im Bereich der Pigmente konnten keine großen Unterschiede im Verhältnis der Pigmente untereinander festgestellt werden. Die Werte für das a/b-Verhältnis aller Tabakklone lagen zwischen 2,7 und 3,07. Die a+b/x+c-Verhältnisse betragen 3,8 und 4,4 für alle Tabakklone. Der unbehandelte Tabakklon hatte in jeder Hinsicht Pigmentkonzentrationen im mittleren Bereich.

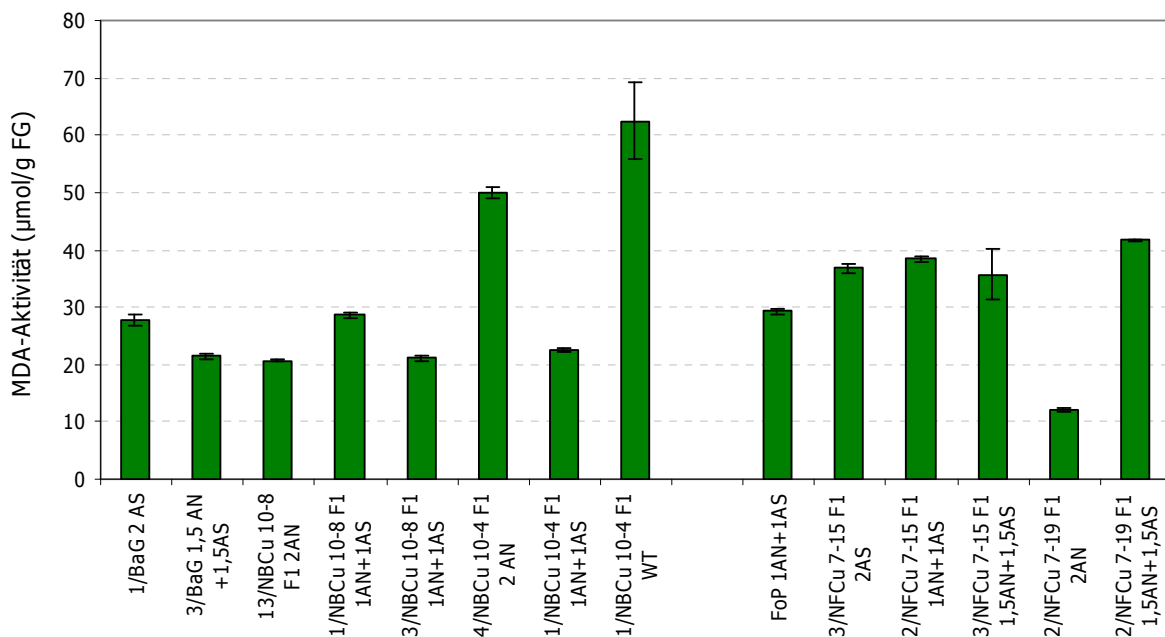
**Tabelle 50** Pigmentanalyse der Tabakkclone, die mit unterschiedlichen Düngungen behandelt wurden. Jeder Wert repräsentiert drei unabhängige Messungen einer Probe mit drei Replikaten  $\pm$  die Standardabweichungen. Chlorophyll a+b repräsentiert Gesamtchlorophyll, das a/b-Verhältnis stellt die Beziehung Chlorophyll a zu Chlorophyll b dar; das a+b/x+c stellt das Verhältnis zwischen dem Gesamtchlorophyll und den Carotinoiden dar. Die Konzentrationen wurden in  $\mu\text{g/g}$  FG dargestellt. Mit „n.g“ ist nicht gemessen gekennzeichnet worden.

Pigmentanalyse der Tabakkclone behandelt mit verschiedenen Düngungen						
	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Chlorophyll a+b	Carotinoide (Cx+c)	a/b	a+b/x+c
BAG Tabakmutanten						
1/BAG 2AS	15,402 $\pm$ 0,94	5,561 $\pm$ 0,17	20,964 $\pm$ 1,11	4,851 $\pm$ 0,20	2,77	4,32
3/BAG 1.5AN+1.5AS	8,886 $\pm$ 0,03	3,026 $\pm$ 0,03	11,913 $\pm$ 0,05	2,839 $\pm$ 0,02	2,94	4,19
NBCu 10-8 F1 2AN	n.g	n.g	n.g	n.g	n.g	n.g
1/NBCu 10-8 F1 1AN+1AS	18,898 $\pm$ 0,17	6,349 $\pm$ 0,07	25,247 $\pm$ 0,24	6,053 $\pm$ 0,05	2,98	4,17
3/NBCu 10-8 F1 1AN+1AS	14,702 $\pm$ 0,03	4,794 $\pm$ 0,02	19,496 $\pm$ 0,04	4,743 $\pm$ 0,03	3,07	4,11
4/NBCu 10-4 F1 2AN	12,001 $\pm$ 0,04	4,121 $\pm$ 0,02	16,123 $\pm$ 0,05	3,772 $\pm$ 0,02	2,91	4,27
1/NBCu 10-4 F1 1AN+1AS	12,992 $\pm$ 0,04	4,350 $\pm$ 0,02	17,342 $\pm$ 0,04	4,337 $\pm$ 0,01	2,99	3,99
1/NBCu 10-4 F1 WT	12,389 $\pm$ 0,26	4,851 $\pm$ 0,07	17,241 $\pm$ 0,33	4,458 $\pm$ 0,07	2,55	3,87
FoP Tabakmutanten						
FoP 1AN+1AS	8,859 $\pm$ 0,06	3,188 $\pm$ 0,01	12,048 $\pm$ 0,06	2,782 $\pm$ 0,03	2,78	4,33
3/NFCu 7-15 F1 2AS	17,021 $\pm$ 0,06	5,982 $\pm$ 0,02	23,003 $\pm$ 0,07	5,848 $\pm$ 0,03	2,85	3,93
3/NFCu 7-15 F1 1,5AN+1,5AS	12,050 $\pm$ 0,06	3,919 $\pm$ 0,02	15,969 $\pm$ 0,06	3,612 $\pm$ 0,02	3,07	4,42
2/NFCu 7-15 F1 1AN+1AS	17,594 $\pm$ 0,07	5,724 $\pm$ 0,02	23,318 $\pm$ 0,07	5,529 $\pm$ 0,03	3,07	4,22
2/NFCu 7-19 F1 2AN	21,043 $\pm$ 0,08	7,510 $\pm$ 0,07	28,558 $\pm$ 0,14	6,360 $\pm$ 0,04	2,80	4,49
2/NFCu 7-19 F1 1,5AN+1,5AS	14,322 $\pm$ 0,05	4,900 $\pm$ 0,02	19,223 $\pm$ 0,06	4,662 $\pm$ 0,02	2,92	4,12

### 3.3.2 MDA-Konzentration der Tabakklone

Malondialdehyd (MDA) ist das Endprodukt der Lipidperoxidation. Wenn es gebildet wird, haben freie Radikale mit den ungesättigten Fettsäuren der Membranlipide reagiert.

Die niedrigste MDA-Konzentration (Abbildung 71) ist in dem *in vitro* Tabakklon 2/NFCu 7-19 F1 2AN bestimmt worden (11  $\mu\text{mol/g}$  FG), der über eine sehr niedrige Biomasse (216 g/TG) und Cd-Extraktionskapazität (0,26 mg/Pflanze) verfügt. Es ist sehr interessant, dass die höchste MDA-Konzentration in dem unbehandelten *in vitro* Tabakklon NBCu 10-4 F1 WT gemessen werden konnte (61  $\mu\text{mol/g}$  FG), der in der Biomasse (217 g/TG) und Cd-Extraktionskapazität (0,23 mg/Pflanze) dem Klon mit der niedrigsten MDA-Konzentration am ähnlichsten ist. Außer bei dem Tabakklon NBCu 10-4 F1 2AN (50  $\mu\text{mol/g}$  FG) mit Biomasse von 726 g/TG und Cd-Extraktionskoeffizient von 0,98 mg/Pflanze, liegen die Konzentrationen aller restlichen Proben unter 42  $\mu\text{mol/g}$  FG.

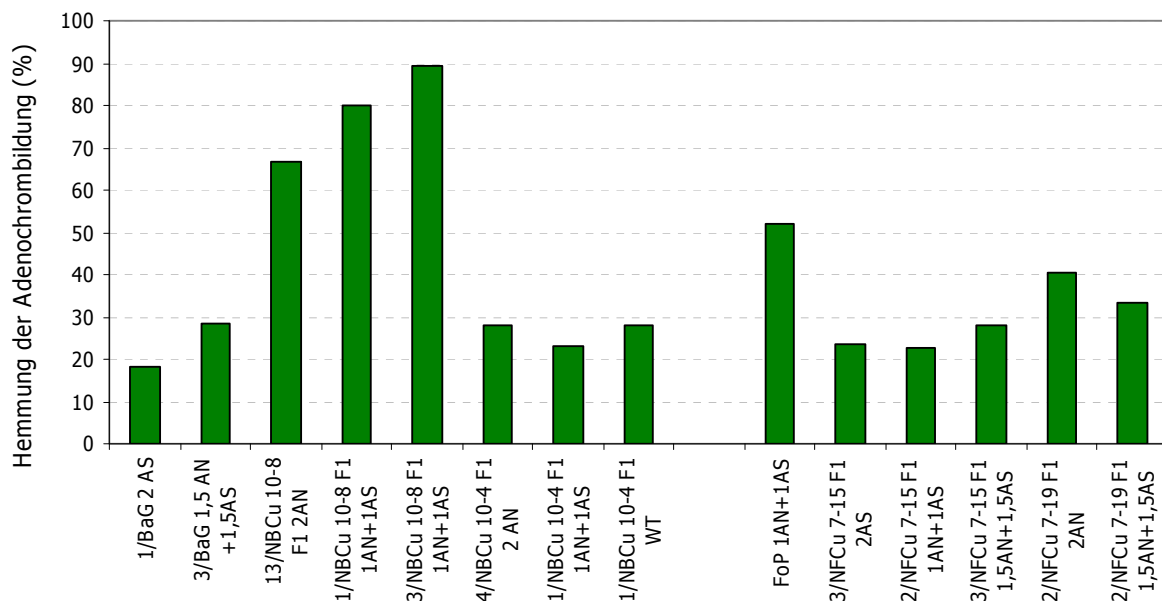


**Abbildung 71** MDA-Konzentration in Blättern der Tabakklone, die mit unterschiedlichen Düngungen behandelt wurden. Die Abkürzungen AS (Ammoniumsulfat) und AN (Ammoniumnitrat) sind für die Düngervarietäten verwendet worden. Mit WT wurde die unbehandelte Probe gekennzeichnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung für drei Replikate jeder Probe.

### 3.3.3 SOD-Aktivität der Tabakklone

Die Superoxiddismutase (SOD)-Aktivität ist in der Reihe von Tabakklonen NBCu 10-8 F1 (13/NBCu 10-8 F1 2AN, 1/NBCu 10-8 F1 1AN+1AS, 3/NBCu 10-8 F1 1AN+1AS) auffällig hoch (Abbildung 72). Deren Aktivitäten sind bis zu dreimal höher als die Aktivität aller anderen Tabakklone. In Mutterpflanzen von BAG (3/BAG 1,5AN+1,5AS) und FoP (FoP 1AN+1AS) führt die Behandlung mit gemischtem Dünger auch zu erhöhter SOD-Aktivität. Die beiden

Tabakkclone verfügen auch über eine höhere Biomasse und Cd-Extraktionskapazität von 1,14 bzw. 0,81 mg/Pflanze. Von den restlichen Tabakklonen mit Ursprung FoP hat der 2/NFCu 7-19 F1 2AN die höchste Aktivität. Das ist andererseits der Tabakklon mit der niedrigsten Cd-Extraktionskapazität von 0,26 mg/Pflanze. Aber wenn wir diese Mutterpflanzen mit der BAG Mutterpflanze (1/BAG 2AS) vergleichen, die auch die doppelte AS-Menge bekommen hat und über eine 4,5fach höhere Cd-Extraktionskapazität verfügt, sieht man, dass in der ersten Probe eine 30% höhere SOD-Aktivität gemessen worden ist: 52 zu 19%.

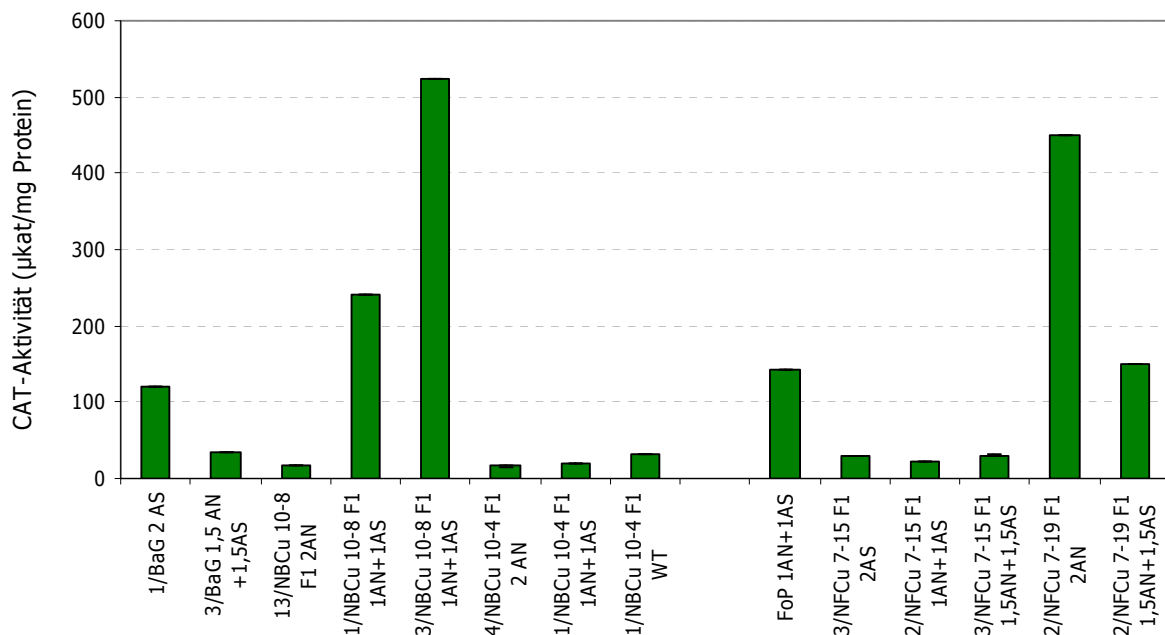


**Abbildung 72** Hemmung der Adenochrombildung in Blättern der Tabakkclone, die mit unterschiedlichen Düngungen behandelt wurden. Die Abkürzungen AS (Ammoniumsulfat) und AN (Ammoniumnitrat) sind für die Düngervarietäten verwendet worden. Mit WT wurde die unbehandelte Probe gekennzeichnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung für drei Replikate jeder Probe.

### 3.3.4 CAT-Aktivität der Tabakkclone

Wie in der Abbildung 73 deutlich wird, ist die Katalase in den Tabakklonen in bis zu dreißigmal höheren Aktivitäten als GPOX zu finden. Die höchste CAT-Enzymaktivität liegt bei 5220  $\mu$ kat/mg Protein (3/NBCu 10-8 F1 1AN+1AS). Das ist der Tabakklon, der über die höchste Biomasse von 798 g/TG und die dritthöchste Cd-Extraktionskapazität von 1,15 mg/Pflanze verfügt. Die niedrigsten Aktivitäten liegen bei ungefähr 110  $\mu$ kat/mg Protein. Im Vergleich der MDHAR-Aktivität der *in vitro* Tabakkclone von NBCu F1 und NFCu F1 fällt auf, dass die Tabakkclone mit der höheren MDHAR-Aktivität über geringere CAT-Enzymaktivität verfügen und umgekehrt. Während die doppelte AS-Düngung zu einer sehr starken Hemmung der Katalase im NFCu F1 *in vitro* Tabakklon führt

(7  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein), kann mit der doppelten Menge an AN eine ganz andere Wirkung auf die gleichen Tabakkclone erzielt werden (450  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein). Bezüglich Biomasse und Cd-Extraktion verhalten sich Pflanzen, die mit der 2fachen AS- bzw. mit AN gedüngt wurden, gegenläufig. Die doppelte Menge an AS führte im Unterschied zu AN zur 3fachen Steigerung der Biomasseproduktion und Cd-Extraktion. Der unbehandelte Tabakklon NBCu 10-4 F1 dagegen zeigt die gleiche Enzymaktivität wie der gehemmte NFCu F1 Klon.

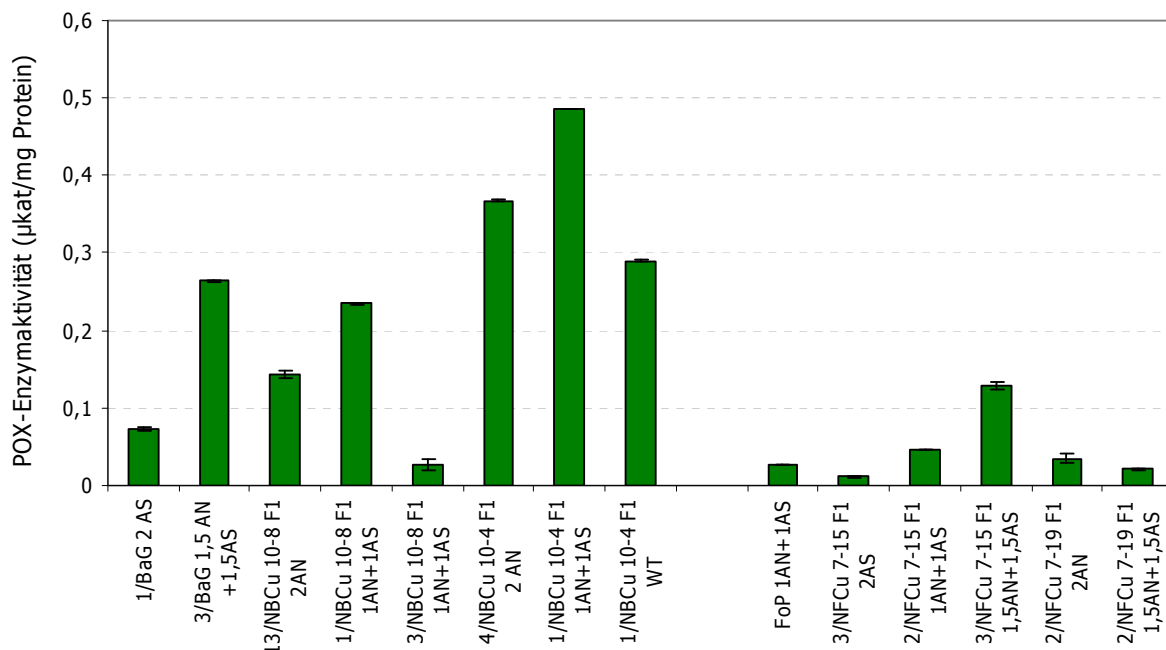


**Abbildung 73** Spezifische Katalase-Aktivität in Blättern der Tabakkclone, die mit unterschiedlichen Düngungen behandelt wurden. Die Abkürzungen AS (Ammoniumsulfat) und AN (Ammoniumnitrat) sind für die Düngervarietäten verwendet worden. Mit WT wurde die unbehandelte Probe gekennzeichnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung für drei Replikate jeder Probe.

### 3.3.5 POX-Aktivität der Tabakkclone

Die Aktivitäten dieses Enzyms variieren zwischen 0,003  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein und 0,49  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (Abbildung 74). Insgesamt ist in den Tabakklonen der NBCu-Reihe eine höhere POX-Enzymaktivität gemessen worden als in denen der NFCu-Reihe. Die höchste Peroxidaseaktivität überhaupt ist auch unter den NBCu-Tabakklonen gemessen worden (1/NBCu 10-4 F1 1AN+1AS) und war viermal so hoch wie die niedrigste Aktivität (3/NBCu 10-8 F1 1AN+1AS). Es ist interessant zu erwähnen, dass diese beiden so weit auseinander liegenden Aktivitäten bei der gleichen Düngung (1AN+1AS) festgestellt worden sind. Dabei hat der Tabakklon mit der höheren POX-Aktivität nur mittelhohe Biomasse und

Cd-Extraktion im Gegensatz zum Tabakklon mit der niedrigsten POX-Aktivität, der über die höchste Biomasse (809 g/TG) und Cd-Extraktion (1,29 mg/Pflanze) verfügt. Außer der Mutterpflanze 1/BAG 2AS, die auch eine POX-Aktivität unter 0,1  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein hat, verfügen die restlichen Tabakkclone über eine POX-Aktivität höher als 0,2  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein.



**Abbildung 74** Spezifische POX-Aktivität in Blättern der Tabakkclone, die mit unterschiedlichen Düngungen behandelt wurden. Die Abkürzungen AS (Ammoniumsulfat) und AN (Ammoniumnitrat) bezeichnen die Düngervarietäten. Mit WT wurde die unbehandelte Probe gekennzeichnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung für drei Replikate jeder Probe.

Der Tabakklon (1/NBCu 10-4 F1 WT) mit Ursprung BAG, der nicht mit Dünger behandelt wurde, zeigt POX-Aktivitäten im mittleren Bereich bei 0,29  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein.

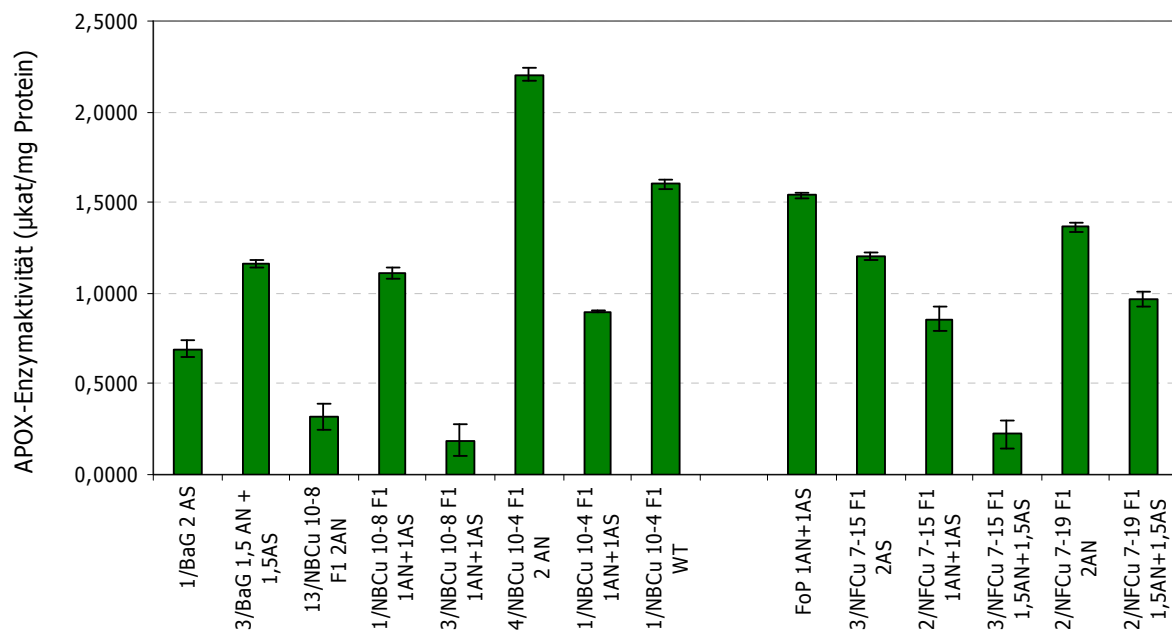
Wie aus der Abbildung 74 zu entnehmen ist, hemmt die hohe Düngungsrate mit 2AS die POX-Aktivität in BAG sowie auch die 2AN Düngung bei den NBCu 10-4 F1 Klonen. Das ist aber mit der Biomasseproduktion und die Cd-Extraktion nicht in Verbindung zu setzen, weil die erwähnten Parameter dieser beiden Tabakkclone sehr unterschiedlich sind (über 700 g/TG und um 1 mg/Pflanze). Die NFCu-Tabakkclone haben, ohne besonderen Einfluss der verwendeten Düngungskombination, POX-Enzymaktivität weit unter 0,2  $\mu\text{kat}/\text{mg}$ .

### 3.3.6 APOX-Aktivität der Tabakkclone

Das absolute APOX-Aktivitäts-Maximum hat der Tabakklon NBCu10-4 F1. In diesem Fall aber, im Unterschied zu der POX-Aktivität, erwies sich die doppelte Düngung als besserer APOX-



Aktivator, der auch zu erhöhten TG von 726 g und verbesserten Cd-Extraktionskapazität von 0,98 mg/Pflanze führt. Die Düngung der gleichen Tabakkclone mit 1AN+1AS führte zu 50% niedrigerem TG und Cd-Extraktionskapazität und zu einer Hemmung der APOX-Enzymaktivität. Bei dem NBCu-Tabakklonen findet man die gleichen Effekte wie bei der POX. Die doppelte Düngung (BAG 2AS: 0,7  $\mu$ kat/mg Protein) bewirkt eine geringere Aktivität (Abbildung 75).



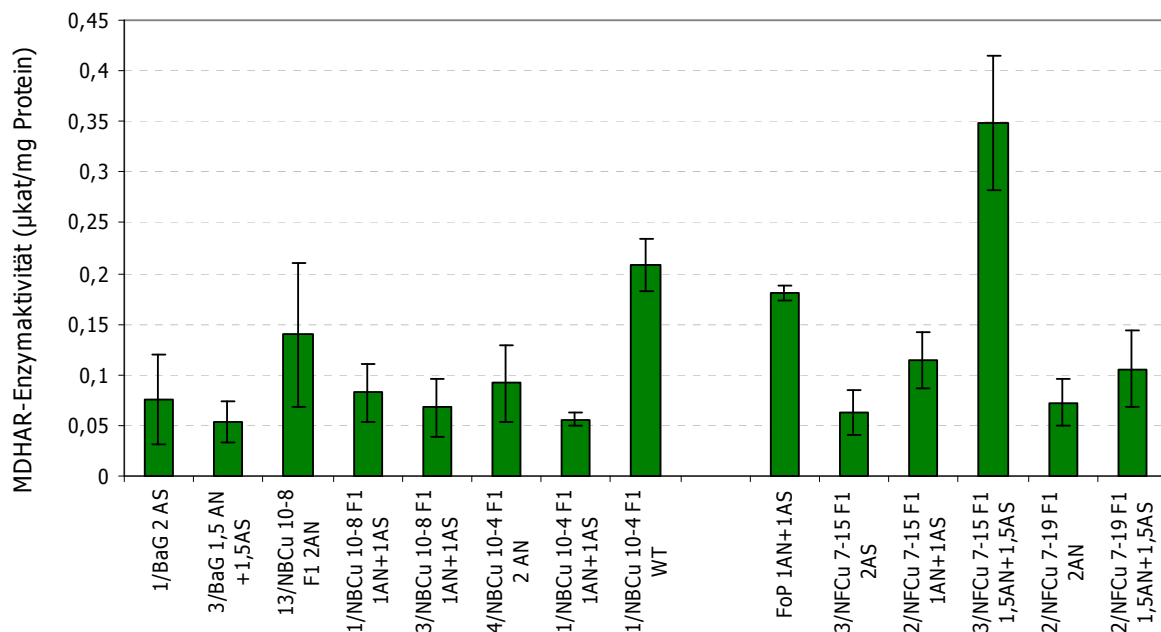
**Abbildung 75** Spezifische APOX-Aktivität in Blättern der Tabakkclone, die mit unterschiedlichen Düngungen behandelt wurden. Die Abkürzungen AS (Ammoniumsulfat) und AN (Ammoniumnitrat) sind für die Düngervarietäten verwendet worden. Mit WT wurde die unbehandelte Probe gekennzeichnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung für drei Replikate jeder Probe.

Die stärksten APOX-Effekte sind in Tabakklonen mit FoP-Ursprung gemessen worden. Insgesamt sind die Enzymaktivitäten bis zu 4mal so hoch wie die von POX. Der Tabakklon, der die doppelte AN-Düngung erhalten hatte, weist erneut die niedrigsten Enzymaktivitäten auf: 2/NFCu 7-19 F1 2AN (0,2  $\mu$ kat/mg Protein). Dafür scheint es, dass die doppelte Menge an AS eine Wirkung auf die APOX-Enzymaktivität hat: 3/NFCu 7-15 F1 2AS hat 1,2  $\mu$ kat/mg Protein, geringes TG und mittlere Cd-Extraktionskapazität. Die Enzymaktivitäten bei den Klonen von FoP ist 10 bis 15-mal höher als die POX-Aktivitäten.

### 3.3.7 MDHAR-Aktivität der Tabakklone

Die Monodehydroscorbatreduktase (MDHAR) ist ein weiteres Enzym des Ascorbat-Glutathion Zyklus, das dafür sorgt, dass Ascorbat im System nachgeliefert wird. Die höchste und beständigste MDHAR-Enzymaktivität bei den NBCu F1-Tabakklonen konnte im unbehandelten NBCu 10-4 F1 WT (0,2  $\mu$ kat/mg Protein) gemessen werden (Abbildung 76). Alle restlichen Tabakklone von NBCu weisen MDHAR-Aktivitäten zwischen 0,05 und 0,09  $\mu$ kat/mg Protein auf. Die Düngungsvorgaben scheinen keinen großen Einfluss auf die MDHAR-Aktivität zu haben.

Über die höchste MDHAR-Enzymaktivität unter den Tabakklonen verfügt NFCu 7-15 F1 1AN+AS (0,35  $\mu$ kat/mg Protein). Diese Pflanze hat das höchste TG von 716 g und eine bemerkenswerte Cd-Extraktionskapazität von 1,08 mg/Pflanze. Bei den restlichen Tabakklonen der NFCu F1 Gruppe ist zwar ein Düngungseffekt zu sehen, aber dieser ist nicht signifikant. Es ist lediglich eine leichte Abnahme der Enzymaktivität mit der zunehmenden Düngungskonzentration zu beobachten. Die stärkste Hemmung ist bei 2AN und 2AS gemessen worden: NFCu 7-15 F1 2AS und NFCu 7-19 F1 2AN. Dabei verfügt der Tabakklon NFCu 7-15 F1 2AS über 622 g TG und einer Extraktionskapazität von 0,65 mg/Pflanze im Vergleich zu dem Tabakklon NFCu 7-19 F1 2AN, dessen TG und Cd-Extraktionskapazität bei einem Drittel der eben genannten liegen.

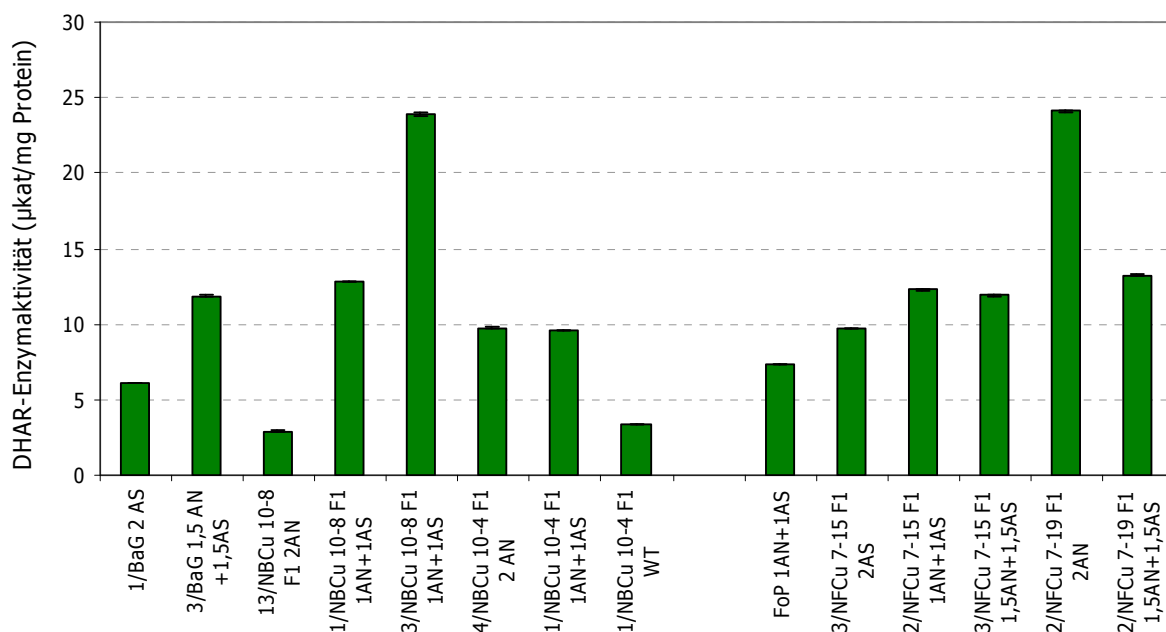


**Abbildung 76** Spezifische MDHAR-Aktivität der in Blättern der Tabakklone, die mit unterschiedlichen Düngungen behandelt wurden. Die Abkürzungen AS (Ammoniumsulfat) und AN (Ammoniumnitrat) sind für die Düngervarietäten verwendet worden. Mit WT wurde die unbehandelte Probe gekennzeichnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung für drei Replikate jeder Probe.

### 3.3.8 DHAR-Aktivität der Tabakklone

Dehydroascorbatreduktase (DHAR) ist das Enzym, das für die Bildung von Ascorbat aus Dehydroascorbat und oxidiertem Glutathion aus reduziertem Glutathion zuständig ist. Wie in der Abbildung (77) zu sehen ist, hat die DHAR bis zu 25mal höhere Enzymaktivität als die MDHAR. Hier hat der Tabakklon NBCu 10-4 F1 WT die niedrigste Enzymaktivität von allen Tabakklonen (4  $\mu$ kat/mg Protein). Es soll darauf hingewiesen werden, dass der Tabakklon NBCu 10-4 F1 WT auch über das zweitniedrigste TG (217 g) und geringe Cd-Extraktionskapazität (0,23 mg/Pflanze) verfügt. Die höchsten Enzymaktivitäten wurden mit 24  $\mu$ kat/mg Protein in den *in vitro* Tabakklonen: NBCu 10-8 F1 1AN+1AS (TG: 809 g, Cd-Extraktionskapazität: 1,29 mg/Pflanze) und NFCu 7-19 F1 2AN (TG: 216 g, Cd-Extraktionskapazität: 0,26 mg/Pflanze) bestimmt.

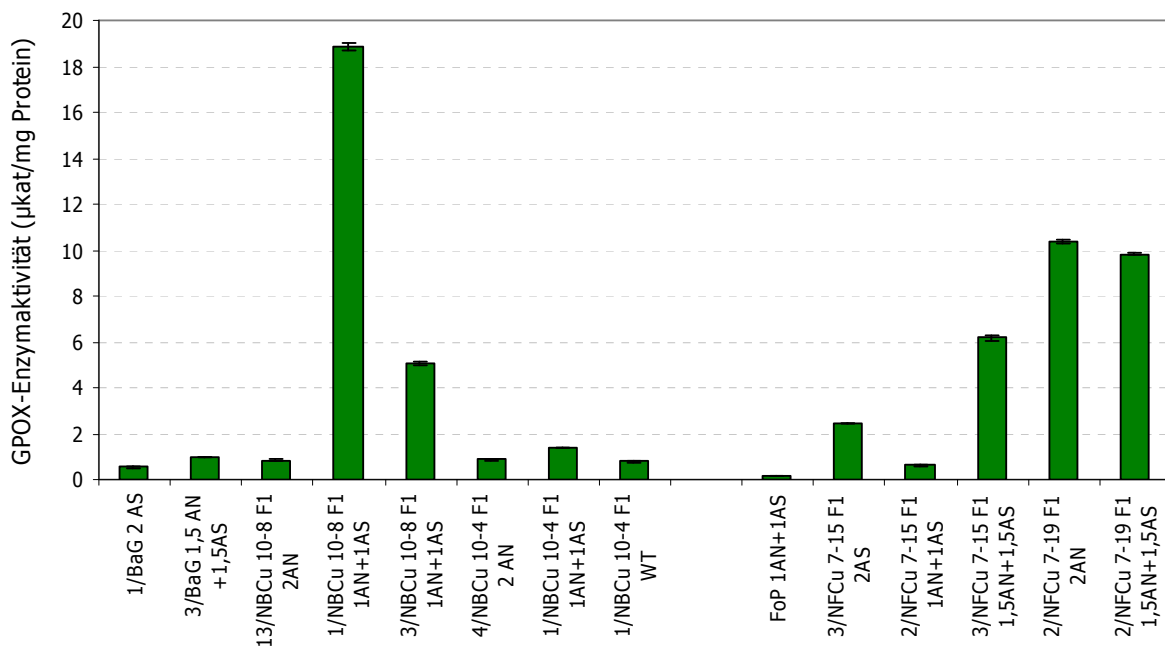
Bei den von BAG stammenden Tabakmutanten ist deutlich zu erkennen, dass die doppelte Düngermenge die Enzymaktivität auf die Hälfte reduziert. Die Tabakvariante mit Mutterpflanze FoP ist mit der gemischten Düngung gedüngt worden, aber ihre DHAR-Aktivität ist auch wesentlich niedriger als die der Tabakklone von NFCu F1.



**Abbildung 77** Spezifische DHAR-Aktivität in Blättern der Tabakklone, die mit unterschiedlichen Düngungen behandelt wurden. Die Abkürzungen AS (Ammoniumsulfat) und AN (Ammoniumnitrat) sind für die Düngervarietäten verwendet worden. Mit WT wurde die unbehandelte Probe gekennzeichnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung für drei Replikate jeder Probe.

### 3.3.9 GPOX-Aktivität der Tabakkclone

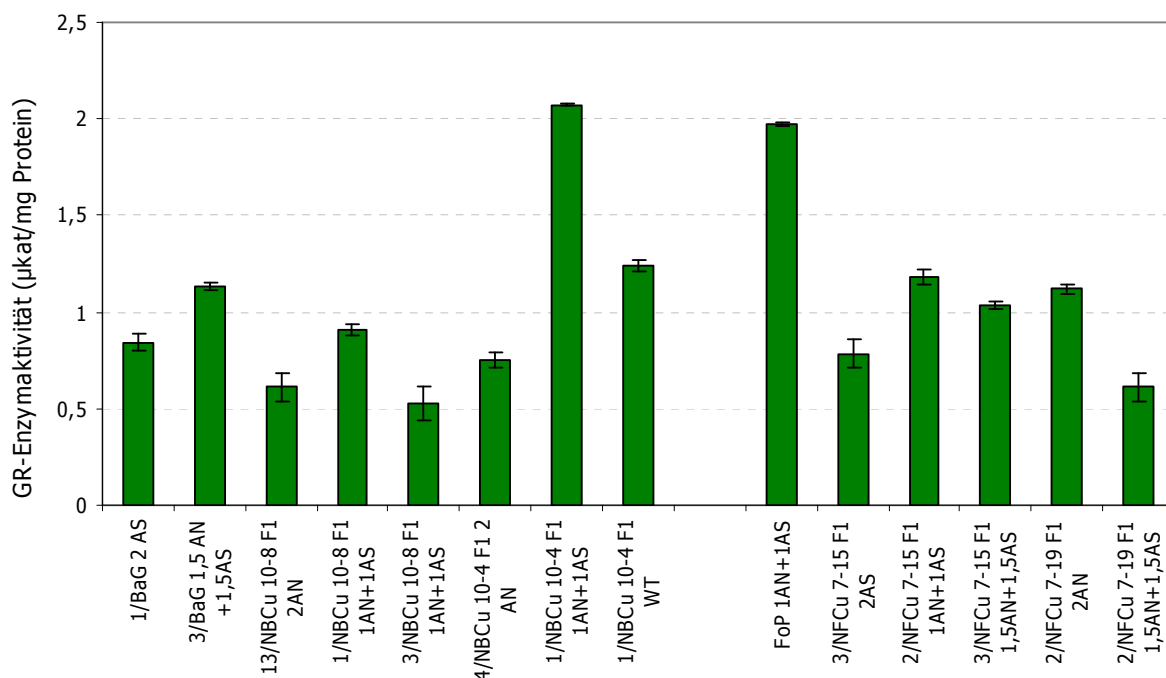
Die Glutathionperoxidase (GPOX) ist die Alternative zur DHAR bei der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies. Die GPOX ist Teil des Glutathionperoxidase-Zyklus und verwendet als Substrat das Wasserstoffperoxid. Dabei benötigt sie GSH als Elektronenakzeptor. Wie in der Abbildung 78 gesehen werden kann, haben die Tabakmutterpflanzen BAG und FoP sowie der *in vitro* Tabakklon 1/NBCu 10-4 F1 WT die geringsten GPOX-Enzymaktivitäten. Bei den *in vitro* Tabakklonen von NFCu 7-19 F1 spielt es kaum eine Rolle, ob es eine gemischte Düngung war oder die doppelte Menge an AN appliziert wurde, weil in beiden Fällen die GPOX-Aktivität gleich hoch ist: 10  $\mu$ kat/mg Protein. Dies gilt aber nicht für die *in vitro* Tabakkclone von NFCu 7-15 F1, bei denen die doppelte AS-Düngermenge und die gemischte Düngung 1,5AN+1,5AS (1  $\mu$ kat/mg Protein) eine Hemmung der GPOX-Aktivität zur Folge haben, wobei die Trockenmasse fast gleich ist, aber eine gemischte Düngung zur doppelten Cd-Extraktionskapazität geführt hat (0,65 zu 1,08 mg/Pflanze). Die Kombination von 1AN+1AS führt dagegen zur Steigerung der Aktivität auf 6  $\mu$ kat/mg Protein. Die höchste GPOX-Enzymaktivität wurde im *in vitro* Klon NBCu 10-8 F1 1AN+1AS (18,9  $\mu$ kat/mg Protein), gemessen, der über die zweithöchste TG und Cd-Extraktionskapazität verfügt.



**Abbildung 78** Spezifische GPOX-Aktivität in Blättern der Tabakkclone, die mit unterschiedlichen Düngungen behandelt wurden. Die Abkürzungen AS (Ammoniumsulfat) und AN (Ammoniumnitrat) sind für die Düngervarietäten verwendet worden. Mit WT wurde die unbehandelte Probe gekennzeichnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung für drei Replikate jeder Probe.

### 3.3.10 GR-Aktivität der Tabakkclone

Die Aktivität der GR im Tabak ist in der Abbildung 79 dargestellt. Die niedrigste GR-Aktivität liegt bei 0,5  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (NBCu 10-8 F1 1AN+1AS) und die beiden höchsten bei 2  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (in dem *in vitro* Klon NBCu 10-4 F1 1AN+1AS und der Klonmutterpflanze FoP 1AN+1AS). Die GR-Enzymaktivitäten der *in vitro* Klone von NFCu F1 scheinen nicht sehr durch die Düngung beeinflusst zu sein, weil die unterschiedlichen Düngungskombinationen zu keinerlei Unterschied in der GR-Aktivität geführt haben. Der unbehandelte *in vitro* Klon von 1/NBCu 10-4 F1 WT weist Enzymaktivitäten in der gleichen Höhe wie die behandelten Pflanzen auf.



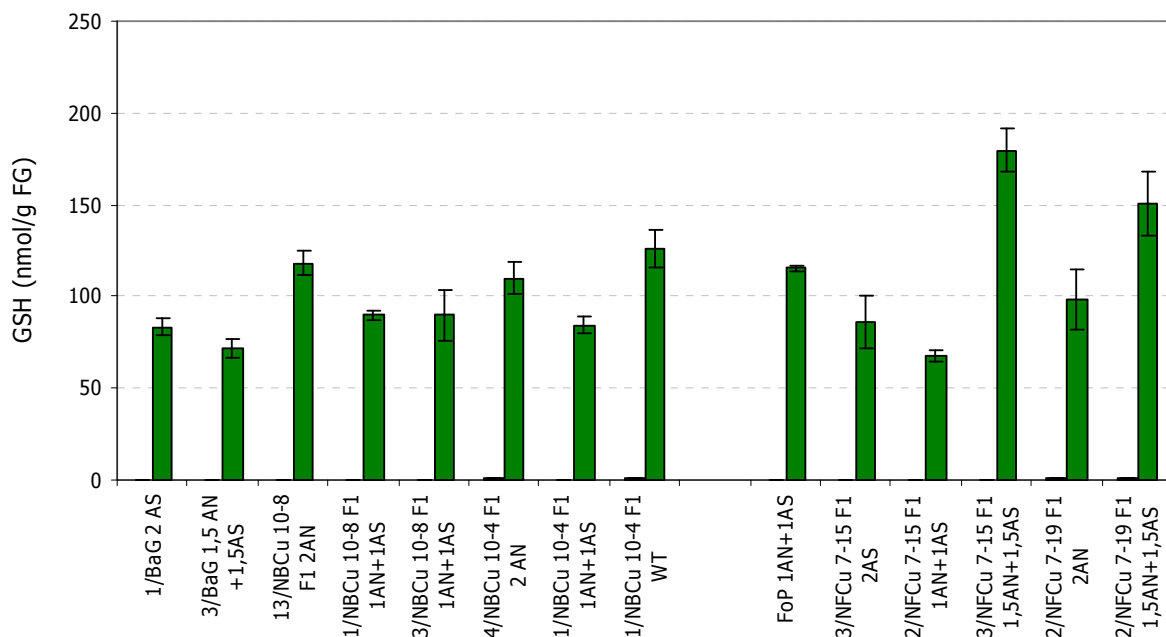
**Abbildung 79** Spezifische GR-Aktivität in Blättern der Tabakkclone, die mit unterschiedlichen Düngungen behandelt wurden. Die Abkürzungen AS (Ammoniumsulfat) und AN (Ammoniumnitrat) sind für die Düngervarietäten verwendet worden. Mit WT wurde die unbehandelte Probe gekennzeichnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung für drei Replikate jeder Probe.

### 3.3.11 Glutathiongehalte der Tabakkclone

Die behandelten Tabakkclone zeigen GSH-Gehalte zwischen 70 und 180 nmol/g FG (Abbildung 80). Je nach Ammoniumdüngung können kleinere Unterschiede in der GSH-Konzentration festgestellt werden. Die höchste GSH-Konzentration ist bei einem FoP-Tabakklon gemessen worden (3/NFCu 7-15 F1), der mit 1,5facher Menge an gemischtem Dünger behandelt wurde und über die höchste Trockenmasse von 716 g und einer Cd-

Extraktionskapazität von 1,08 mg/ Pflanze verfügt. Der Tabakklon mit der zweithöchsten GSH-Konzentration wurde auch mit Mischdünger von 1,5fachem Ammoniumsulfat und 1,5fachem Ammoniumnitrat behandelt. Es ist schwer, einen Zusammenhang zwischen der Düngung und der GSH-Konzentration zu finden, weil der unbehandelte Tabakklon NBCu 10-4 F1 von BAG auch über eine GSH-Konzentration von 125 nmol/g FG verfügt, obwohl er über dreimal niedrigeres TG (217 g) und eine Cd-Extraktionskapazität von nur 0,26 mg/Pflanze verfügt.

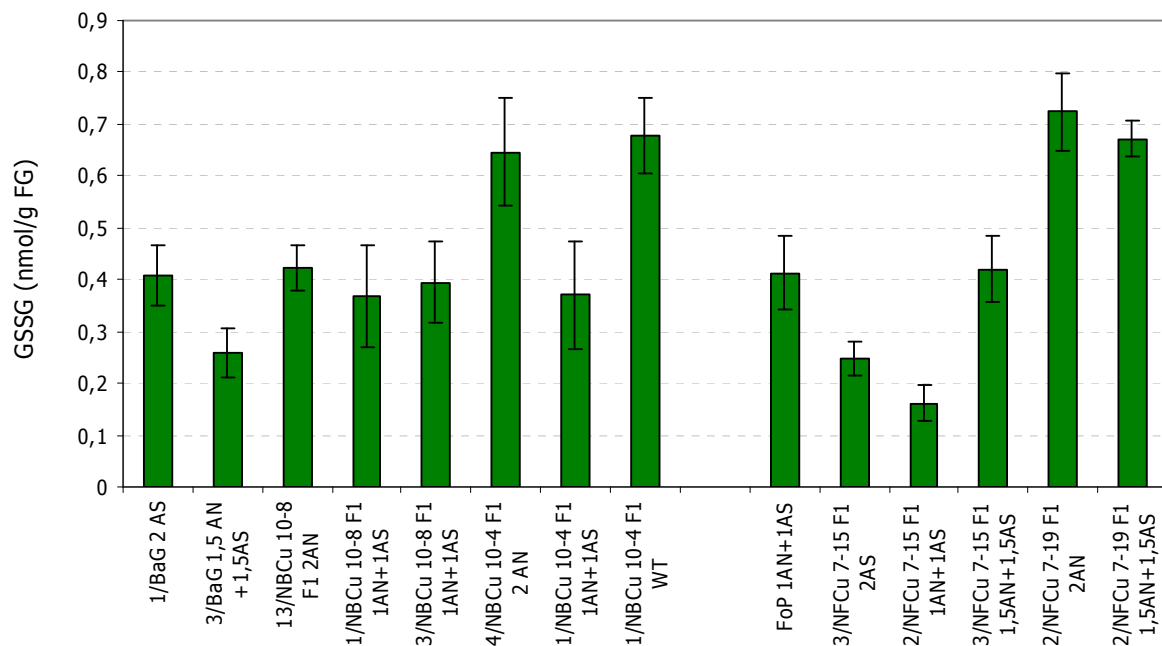
Es wurde kein Trend festgestellt, dass eine höhere Düngung zu höheren GSH-Gehalten geführt hätte und umgekehrt. Jeder Tabakklon reagiert individuell unterschiedlich auf die Untersuchungsbedingungen.



**Abbildung 80** GSH-Konzentration in Blättern der Tabakkclone, die mit unterschiedlichen Düngungen behandelt wurden. Die Abkürzungen AS (Ammoniumsulfat) und AN (Ammoniumnitrat) sind für die Düngervarietäten verwendet worden. Mit WT wurde die unbehandelte Probe gekennzeichnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung für drei Replikate jeder Probe.

Bei der Untersuchung der GSSG-Gehalte der Tabakkclone (Abbildung 81) konnten interessante Effekte festgestellt werden. Der unbehandelte Tabakklon NBCu 10-4 F1 hat die gleiche GSSG-Konzentration wie der NBCu 10-4 F1 Tabakklon, der mit der doppelten Menge an Ammoniumnitrat behandelt wurde und über das dreifache an TG und Cd-Extraktionskapazität aufweist. Die beiden Tabakkclone von FoP NFCu 7-15 F1 1,5 AN + 1,5 AS und NFCu 7-19 F1 2 AN verhalten sich reziprok. Während der Tabakklon, der mit der doppelten Menge an Ammoniumnitrat behandelt wurde, eine niedrige GSH-Konzentration (98 nmol/g FG zu 180 nmol/g FG) in den Blättern hatte, verfügte er über die höhere GSSG-Konzentration

(0,72 nmol/g FG zu 0,42 nmol/g FG) und umgekehrt (Abbildung 80 und Abbildung 81) bei niedrigstem TG (216 g) und geringerer Cd-Extraktionskapazität (0,26 mg/Pflanze).



**Abbildung 81** GSSG-Konzentration in Blättern der Tabakklone, die mit unterschiedlichen Düngungen behandelt wurden. Die Abkürzungen AS (Ammoniumsulfat) und AN (Ammoniumnitrat) sind für die Düngervarietäten verwendet worden. Mit WT wurde die unbehandelte Probe gekennzeichnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung für drei Replikate jeder Probe.

### 3.3.12 Bestimmung der Enzymaktivitäten der GSTs

#### 3.3.12.1 CDNB-GST-Aktivität der Tabakklone

In der Tabelle 51 sind alle spezifischen Aktivitäten der GSTs für die üblichen Modelsubstrate, die in den Tabakklonen gemessen wurden, beschrieben.

Für die Konjugation des Substrats CDNB liegen die Enzymaktivitäten in den Extrakten nahe beieinander. Die höchste GST-Aktivität konnte mit 2,606  $\mu$ kat/mg Protein in Tabakklon 3/NFCu 7-15 F1 1,5AN+1,5AS (mit sehr hohe TG und Cd-Extraktionskapazität) bestimmt werden und die niedrigste Enzymaktivität liegt mit 0,927  $\mu$ kat/mg Protein beim Tabakklon NBCu 10-8 F1 2AN (mit sehr niedrigem TG und Cd-Extraktionskapazität). Die Mutterpflanzen, die der Ausgangspunkt dieser Tabakklone waren, aber selbst erhöhte Düngungsraten bekommen haben, verfügen über die nächst höheren Enzymaktivitäten: 2,658  $\mu$ kat/mg Protein (FoP1AN+1AS) und 2,655  $\mu$ kat/mg Protein (1/BAG 2AS) sowie TG und Cd-Extraktionskapazität.

Bei den Tabakklonen „Badischer Geudertheimer“ (BAG) nahm die Enzymaktivität für das Substrat CDNB mit den niedrigeren Konzentrationen an Dünger leicht ab. Bei den Tabakklonen der NBCu 10-8 F1-Reihe konnte das nicht beobachtet werden, denn der Klon mit der höchsten Konzentration an Ammoniumnitrat (2AN) zeigte die niedrigste Enzymaktivität für CDNB und die Varianten des gleichen Tabakklons mit der gemischten Düngung wiesen höhere CDNB-GST-Aktivität auf. Bei dem Tabakklon NBCu 10-4 F1 stieg die CDNB-GST-Aktivität mit der Düngermenge sehr deutlich. Die doppelte Menge an Ammoniumnitrat verursachte die höchsten Effekte, während die Probe, die nicht behandelt wurde, die niedrigste CDNB-GST-Enzymaktivität für diese Tabakvariante zeigte.

Bei den Tabakklonen der Forchheim Pereg (FoP) ist als klare Tendenz zu erkennen, dass die CDNB-GST-Enzymaktivität bei den beiden Varianten dieses Tabakklons von der höheren Düngerbehandlung zur niedrigeren abnimmt. Die Konjugation von CDNB scheint also eher ernährungsbedingt als schadstoffinduziert zu variieren.

### **3.3.12.2 NBoC-GST-Aktivität der Tabakkclone**

Wie bei den Sonnenblumenmutanten (Kapitel 3.2.12.2) erweist sich NBoC auch bei den Tabakklonen als das beste Modells substrat für die glutathionabhängige Konjugation (Tabelle 51). Die niedrigste NBoC-GST-Aktivität wurde in dem Tabakklon FoP1AN+1AS gemessen: 1,678  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Die höchste Enzymaktivität konnte mit 45,547  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein in dem Tabakklon: 2/NFCu 7-19 F1 2AN bestimmt werden.

In der Reihe der Tabakkclone mit der Mutterpflanze Bergisch Geudertheimer Klonen (BAG) konnte festgestellt werden, dass die Verdoppelung der Menge an Ammoniumsulfat die NBoC-GST-Enzymaktivität stark reduziert. Gemischte Düngung stimuliert dagegen die Aktivität der NBoC-GST bei den Tabakklonen 3/BAG 1,5AN+1,5AS und 1/NBCu 10-4 F1 1AN+1AS, wobei der erste Tabakklon über die doppelte TG und Cd-Extraktionskapazität (861 g und 1,37 mg/Pflanze) verfügt. Es muss hierbei auch erwähnt werden, dass der Tabakklon 1/NBCu 10-4 F1 WT auch ohne Düngung sehr hohe Enzymaktivität zeigt, aber über die niedrigste TG und Cd-Extraktionskapazität verfügt.

Bei den Tabakklonen von NFCu 7-19 F1 verursacht die doppelte Düngung die stärksten Effekte auf die Aktivität der NBoC-GSTs, wobei diese Pflanze über sehr niedrige TG und Cd-Extraktionskapazität verfügt, während und bei den NFCu 7-19 F1-Tabakklonen die gemischte Düngung mit 1,5AN + 1,5AS für die gleichen Effekte sorgt (Tabelle 51). Der Abstand zwischen der höchsten und der niedrigsten NBoC-Enzymaktivität in den Tabakklonen mit der Mutterpflanze FoP liegt bei 44  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein.



### 3.3.12.3 NBC-GST-Aktivitäten der Tabakklone

Der größte Teil der Tabakklone mit BAG-Ursprung zeigt stabile NBC-GST-Enzymaktivität um 6  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein (Tabelle 51). Die niedrigste GST-Aktivität für dieses Substrat konnte im Tabakklon NBCu 10-8 F1 2AN bestimmt werden; nur 0,784  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Noch eine deutliche Ausnahme in dieser Reihe ist der Tabakklon 3/NBCu 10-8 F1 1AN+1AS, bei dem 1,877  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein gemessen wurde. Interessant ist, dass die beiden hier erwähnten Tabakklone mit den niedrigsten NBC-Enzymaktivitäten auch für das Substrat CDNB die niedrigsten GST-Aktivitäten zeigten. In den Messungen für NBoC sind sie hingegen durchschnittlich gut vertreten. Die beiden Tabakklone unterscheiden sich auch stark in Bezug auf ihre TG und Cd-Extraktionskapazität. Während der Tabakklon NBCu 10-8 F1 2AN über niedrigere TG und Cd-Extraktionskapazität verfügt, konnten in dem Tabakklon 3/NBCu 10-8 F1 1AN+1AS die doppelten Einheiten an TG und Cd-Extraktionskapazität (TG: 798 g und Cd-Extraktionskapazität 1,15 mg/Pflanze) bestimmt werden.

Was die Tabakklone mit der Mutterpflanze FoP für die Konjugation des Modells substrats NBC betrifft (Tabelle 51), ist erneut, wie bei CDNB und NBoC schon gezeigt, die höchste Enzymaktivität von 7,811  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein gemessen worden (2/NFCu 7-15 F1 1AN+1AS). Das ist auch die Pflanze mit der höchsten Trockenmasse und dem höchsten Cd-Extraktionsvermögen unter den FoP Tabakklonen. Die niedrigste NBC-GST-Enzymaktivität der FoP Tabakklone liegt mit 2,306  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein im Tabakklon 2/NFCu 7-19 F1 1,5AN+1,5AS. Diese Tabakvariante hat auch für das Substrat CDNB deutlich niedrigere GST-Enzymaktivitäten.

### 3.3.12.4 DCNB-GST-Aktivität der Tabakklone

Für das Substrat DCNB wurde, ähnlich wie bei den Sonnenblumenmutanten (Kapitel 3.2.12.4), die niedrigsten GST-Enzymaktivitäten in den Tabakklonen gemessen (Tabelle 51). Die niedrigste DCNB-GST-Enzymaktivität wurde von einem BAG-stammenden Tabakklon gemessen: 0,054  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein beim NBCu 10-8 F1 2AN, der über niedrigere TG und Cd-Extraktionskapazität verfügt. Das ist der Tabakklon, der mit der doppelten Ammoniumnitratdüngung die höchste Enzymaktivität für das Herbizid Fluorodifen zeigte. Offenbar wird die Fluorodifen-GST-Aktivität auf Kosten der DCNB-Konjugation erhöht. Die höchste DCNB-GST-Enzymaktivität für alle Tabakklone wurde im FoP1AN+1AS gemessen: 0,460  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Der unbehandelte Tabakklon 1/NBCu 10-4 F1 WT zeigte eine Enzymaktivität von 0,065  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Vergleich zu den anderen Modells substraten DCNB die niedrigsten GST-Effekte verursacht. Das

ist auch das Substrat, bei dem die niedrigsten Abweichungen innerhalb der Aktivitäten der verschiedenen Düngungsreihen gemessen werden konnten.

### 3.3.12.5 Fluorodifen-GST-Aktivität der Tabakklone

Im Vergleich zu den Modelsubstraten wird das Herbizid Fluorodifen mit geringeren GST-Enzymaktivitäten umgesetzt, wie aus Tabelle 51 zu entnehmen ist. Die spezifischen Enzymaktivitäten sind im Durchschnitt zehn Prozent niedriger als die GST-Aktivitäten der Modelsubstrate. Von allen Tabakklonen der Mutterpflanzen BAG und FoP, deren Fluorodifen-GST-Enzymaktivität gemessen wurde, ist 0,163  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein das absolute Minimum der GST-Aktivität. Dieser Wert wurde im Tabakklon 1/NBCu 10-4 F1 WT bestimmt, der nicht gedüngt worden war und über geringeres TG und wenig Cd-Extraktionskapazität verfügt. Das Maximum der Enzymaktivität konnte mit 1,998  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein bei dem Tabakklon NBCu 10-8 F1 2AN bestimmt werden, der mit der doppelten Menge Dünger behandelt worden war, aber über ähnliche TG (333 g) und Cd-Extraktionskapazität (0,58 mg/Pflanze) wie der unbehandelte BAG-Tabakklon verfügt. Damit wurden die niedrigste und die höchste Enzymaktivität in der Gruppe der BAG-Tabakklone bestimmt. Es scheint, dass die Düngung mit Ammoniumnitrat die Aktivität der Fluorodifen-GST erhöht.

Bei den von FoP-stammenden-Tabakklonen konnten für Fluorodifen (Tabelle 51) auch ähnlich hohe GST-Aktivitäten bestimmt werden. In diesem Fall führt aber die doppelte Behandlung mit Ammoniumnitrat zu der niedrigsten Fluorodifen-Enzymaktivität (0,124  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein in dem Tabakklon 2/NFCu 7-19 F1 2AN), bei niedrigster TG und Cd-Extraktionskapazität. Die höchste GST-Enzymaktivität im FoP Tabakklon konnte mit der gemischten Düngung erzielt werden (2/NFCu 7-19 F1 1,5AN+1,5AS). Sie ist mit 1,505  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein 12mal höher als bei der 2AN-Düngung. Offenbar hängt die Konjugation des Herbizids zwar vom Düngerstatus der Pflanze ab, wird aber durch weitere Faktoren beeinflusst, die herkunftsbedingt sind oder durch Stress hervorgerufen werden. Dies ist also anders als beim gängigen Standardsubstrat CDNB.

**Tabelle 51** Spezifische Enzymaktivität der Tabakkclone, die auf dem Versuchsfeld in der Ostschweiz gewachsen waren für die Modelsubstrate CDNB, NBoC, NBC, DCNB und das Herbizid Fluorodifen. Die Tabakkclone wurden auf dem Feld mit vier verschiedenen Düngungen gedüngt: doppelte Menge an Ammoniumnitrat (2AN), doppelte Menge an Ammoniumsulfat (2AS), zwei verschiedene gemischte Düngungen: 1AN+1AS und 1,5AN+1,5AS. Es gibt auch einen Klon, der nicht gedüngt wurde und mit WT (whitout treatment) bezeichnet ist. Die Enzymaktivitäten stellen drei photometrische Bestimmungen jeder Probe dar. Jede Bestimmung hat drei Replikate. Daraus wurden die Mittelwerte  $\pm$  die Standardabweichungen bestimmt.

Tabakkclone	Spezifische Enzymaktivität den GSTs für fünf verschiedene Substrate					
	Cd (mg/Kg TG)	CDNB	NBoC	NBC	DCNB	Fluorodifen
BAG Tabakkclone						
1/BAG 2AS	1,44	2,655 $\pm$ 0,04	2,006 $\pm$ 0,04	5,466 $\pm$ 0,05	0,118 $\pm$ 0,04	0,714 $\pm$ 0,04
3/BAG 1,5AN+1,5AS	1,6	2,099 $\pm$ 0,03	24,395 $\pm$ 0,08	3,230 $\pm$ 0,02	0,354 $\pm$ 0,02	0,239 $\pm$ 0,02
NBCu 10-8 F1 2AN	1,76	0,927 $\pm$ 0,07	12,304 $\pm$ 0,08	0,784 $\pm$ 0,07	0,054 $\pm$ 0,01	1,998 $\pm$ 0,07
1/NBCu 10-8 F1 1AN+1AS	1,6	2,709 $\pm$ 0,03	23,837 $\pm$ 0,09	6,574 $\pm$ 0,03	0,061 $\pm$ 0,02	0,465 $\pm$ 0,03
3/NBCu 10-8 F1 1AN+1AS	1,44	1,457 $\pm$ 0,11	4,071 $\pm$ 0,09	1,877 $\pm$ 0,09	0,113 $\pm$ 0,02	0,454 $\pm$ 0,09
4/NBCu 10-4 F1 2AN	1,36	2,293 $\pm$ 0,04	2,828 $\pm$ 0,04	6,346 $\pm$ 0,04	0,134 $\pm$ 0,03	0,462 $\pm$ 0,04
1/NBCu 10-4 F1 1AN+1AS	1,28	2,157 $\pm$ 0,01	37,904 $\pm$ 0,10	6,525 $\pm$ 0,04	0,083 $\pm$ 0,01	0,392 $\pm$ 0,01
1/NBCu 10-4 F1 WT	1,04	1,416 $\pm$ 0,03	35,543 $\pm$ 0,24	6,753 $\pm$ 0,04	0,065 $\pm$ 0,02	0,110 $\pm$ 0,02
FoP Tabakkclone						
FoP1AN+1AS	1,6	2,658 $\pm$ 0,02	1,678 $\pm$ 0,01	4,816 $\pm$ 0,01	0,460 $\pm$ 0,01	0,163 $\pm$ 0,01
3/NFCu 7-15 F1 2AS	1,04	2,430 $\pm$ 0,02	6,574 $\pm$ 0,02	5,194 $\pm$ 0,02	0,132 $\pm$ 0,02	0,448 $\pm$ 0,02
3/NFCu 7-15 F1 1,5AN+1,5AS	1,52	2,606 $\pm$ 0,03	4,700 $\pm$ 0,03	3,417 $\pm$ 0,03	0,152 $\pm$ 0,02	0,149 $\pm$ 0,03
2/NFCu 7-15 F1 1AN+1AS	1,04	1,156 $\pm$ 0,09	28,223 $\pm$ 0,09	7,811 $\pm$ 0,07	0,132 $\pm$ 0,06	0,715 $\pm$ 0,07
2/NFCu 7-19 F1 2AN	1,2	2,340 $\pm$ 0,07	45,547 $\pm$ 0,4	7,019 $\pm$ 0,08	0,149 $\pm$ 0,07	0,124 $\pm$ 0,07
2/NFCu 7-19 F1 1,5AN+1,5AS	1,04	1,396 $\pm$ 0,06	7,538 $\pm$ 0,06	2,306 $\pm$ 0,04	0,114 $\pm$ 0,04	1,505 $\pm$ 0,04

## 4. Diskussion

### 4.1 *Typha latifolia* Versuche

*Typha latifolia* und *Typha angustifolia* sind weit verbreitete Wasserpflanzen aus der Gattung der Rohrkolbengewächse in Europa (Gawronski, 2007). Die große geographische Verteilung, ihre hohe Biomasseproduktivität und das kooperative Wachstum mit anderen Pflanzenarten, wie zum Beispiel *Phragmites australis*, macht *Typha* interessant für die Phytoremediation. Sie wird auf Böden eingesetzt, die mit Schwermetallen und Agrarchemikalien, wie Stickstoff oder Pestiziden, belastet sind (Gawronski, 2007).

Das Wachstum von *Typha latifolia* ist auf metallkontaminierten Klärschlämmen und mit Rohöl verseuchten Böden und Gewässern untersucht worden (Manios et al., 2003; Groudeva et al., 2001). Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Bestimmung der Metallaufnahme von *Typha latifolia* in Feuchtgebieten oder Bergbauabwasser (Taylor et al., 1983; Shutes et al., 1993; Lan et al., 1992), insbesondere im Hinblick auf die Gewässerqualitätsverbesserung.

Andere Autoren haben mehr die Physiologie von *T. latifolia* und das Antioxidantiensystem (Tang et al., 2005; Sharma et al., 2005; Ye et al., 1997) oder Effekte von Schwermetallstress auf den Gesamtprotein-Pool (Manios et al., 2003) untersucht.

In dem breiten Feld der bisherigen Experimente fehlen allerdings Untersuchungen, die die Physiologie der Pflanze bei gemischter Kontamination mit organischen Schadstoffen und Schwermetallen erforschen. Die vorliegende Arbeit setzt sich mit dem Thema der physiologischen und biochemischen Vorgänge in *T. latifolia* nach kurzzeitiger und langzeitiger Behandlung mit Schwermetallen auseinander. Es wurden die Antioxidantienzyklen, also der Wasser-Wasser Zyklus, der Ascorbat-Glutathion Zyklus, der Glutathionperoxidase-Zyklus sowie die Photosynthese, die Frisch- und die Trockengewichte untersucht. Wesentlicher Punkt der Arbeit ist die Untersuchung der Glutathion S-Transferasen, die eine essentielle Rolle bei der Entgiftung organischer Schadstoffe spielen.

Der Fakt, dass *Typha latifolia* sehr oft auf Böden in der Nähe von Industriegebieten verbreitet ist, die mit Schwermetallen kontaminiert sind, wie zum Beispiel Cadmium, Blei, Zink, Kupfer und Nickel, spricht für die hohe Resistenz dieser Pflanze gegenüber Schwermetallen (Taylor & Crowder, 1984; Ye et al., 1997). Weitere Bestätigungen dieser Beobachtungen kommen von Lan et al. (1992), die Rohrkolben-Pflanzen untersucht haben, die im Klärwasser eines Pb/Zn-Bergbaus gewachsen sind. Es wurde gezeigt, dass Rohrkolben die Pb- und die Zn-Konzentrationen dieses Klärwassers zu über 80% reduzieren konnten

(Lan et al., 1992). Die Untersuchungen der *Typha latifolia*-Rhizome zeigten dabei eine signifikante Pb- und Zn-Aufnahme.

Die Expositionsdauer, die Konzentration und der pH-Wert der Lösung und die physikochemischen Aspekte des Kationentransportes beeinflussen die Metallaufnahme der Pflanze (Chawla et al., 1991). Es wird berichtet, dass die Aufnahme der Metalle innerhalb der ersten 48 Stunden die höchste ist (Chawla et al., 1991). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass die Cd-Aufnahme bereits nach 72 Stunden 21% der im Langzeitexperiment nach 72 Tagen erreicht hat. Nach Chawla et al. (1991) ist der Grund für die reduzierte Metallaufnahme bei langfristiger Exposition in der Schwächung der Pflanze zu suchen.

Die freien Carboxylgruppen der Pektine in der Mittellamelle und der primären Zellwand verfügen über eine negative Ladung; daher ist die Bewegung der Ionen in den Zellwänden durch elektrostatische Interaktionen charakterisiert (Marschner, 1995). Dies kann zu einer Akkumulation der Kationen im apparent free space (AFS) führen. Im AFS ist die Vorwärtsbewegung der Ionen nicht frei, sondern hängt von den Interaktionen mit den nicht diffundierenden Anionen der Zellwand ab. Die Menge der nicht diffundierenden Anionen wird normalerweise durch die Kationenaustauschkapazität (CEC) quantifiziert, die prinzipiell in den dikotylen niedriger und bei den monokotylen Pflanzen sehr hoch ist. Der CEC kann durch einen hohen Salzanteil oder abnehmenden apoplastischen Druck reduziert werden (Marschner, 1995). Wie viel Cd die Pflanzen aufnehmen können, hängt davon ab, wie hoch seine Konzentration und Bioverfügbarkeit im Substrat ist und ob Organika und andere Elemente vorhanden sind. Weiteren Einfluss haben die Temperatur, der pH-Wert und das Redoxpotential (Rivetta et al., 1997). Die Cd-Aufnahme scheint im Wettbewerb mit den Elementen K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu und Zn um die gleiche Transmembran-Carrier zu stehen (Rivetta et al., 1997). Die Zellmembran kann die Metallaufnahme in der Zelle reduzieren oder ganz verhindern. Die Apoplasten der Rhizomepidermis und der Kortex sind zwar durchlässig für Flüssigkeiten, die Zellwände der endodermalen Zellschicht agieren aber als Barriere für die apoplastische Diffusion von Ionen und gelösten Stoffen in dem vaskulären System (Rivetta et al., 1997). Ionen müssen also in den Rhizomsymplasten aufgenommen werden, bevor sie in das Xylem eindringen können (Tester & Leigh, 2001). Außer der Metallaufnahme in dem Rhizomsymplasten gibt es zwei weitere geschwindigkeitsbestimmende Prozesse, die für die Vorwärtsbewegung der Metalle aus den Rhizomen in dem Spross verantwortlich sind: die Bindung der Metalle in den Rhizomzellen und der symplastische Transport in die Stängel (Clemens et al., 2002).

Die unterschiedliche Mobilität der Metallionen in der Pflanze führt dazu, dass die Metallkonzentration in den Rhizomen generell höher als im Spross ist (Ramos et al., 2002). Daher werden die Rhizome auch zuerst an Cd-Stress leiden (Sanita di Toppi & Gabrielli, 1999).

Diese Effekte konnten ausgelöst werden, weil die Schwermetalle auf unterschiedlichen Niveaus die Architektur und die Organisation der Blätter angreifen (Mysliwa-Kurziel et al., 1999):

- Metallakkumulation in den Blättern (Hauptorgan der Photosynthese)
- Einfluss auf die Funktion der Chloroplastenmembran, teilweise auf die PS II und PS I
- Interaktionen auf molekularem Niveau mit Enzymen des Kohlenstoff-Reduktionszyklus der Photosynthese und dem Xanthophyllzyklus.

Es ist gezeigt worden, dass Cadmium der effektivste Inhibitor der Photosynthese ist. Cadmium beeinflusst die Nettphotosynthese bei Tomaten, Reis und Mais (Baszynski et al., 1980; Misra et al., 1989; Prasad, 1995b). Sogar in sehr kleinen Mengen, wenn das Cadmium die Chloroplasten erreicht, werden mehrere direkte und indirekte Effekte ausgelöst, die die Photosynthese beeinflussen (Mysliwa-Kurziel et al., 1999). Das wurde als „Multiplikationseffekt“ von Krupa & Baszynski (1995), Krupa (1999) beschrieben. Die Toxizität des Cadmiums wird auch mit dem Cadmium-induzierten Fe-Defizit in Verbindung gesetzt (Krupa & Siedlecka, 1995; Siedlecka & Krupa, 1999).

#### **4.1.1 Das Kurzzeit-Experiment mit Cd, As und Pb**

Nach der Behandlung mit drei Metallen (Cd, As und Pb) in vier unterschiedlichen Konzentrationen (10, 50, 100 und 250  $\mu\text{M}$ ) wurden höhere Metallkonzentrationen in den Rhizomen von *Typha latifolia* als in den Blättern nachgewiesen. Vassilev et al. (2004), Wu et al. (2002) und Hegedüs et al. (2001) berichteten ebenfalls über solche Effekte in Cd behandelte Gerste. Benavides et al. (2005) und Dixit et al. (2001) fanden entsprechende Effekte in Erbsen, Gallego et al. (1996) in Sonnenblumen, Mishra et al. (2006) in *Bacopa monnieri*.

In den Rohrkolben-Pflanzen stieg die Metallaufnahme fast linear mit der ansteigenden Schwermetallkonzentration im Medium. Die Cd-Akkumulation in den Blättern ist wesentlich niedriger im Vergleich zu *Brassica* sp., die auch in der Cd-Phytoextraktion verwendet worden ist (Vassilev et al., 2004). *Brassica juncea* kann bis zum 400 mg/Kg TG Cd in der Blattmasse akkumulieren (Haag-Kerwer et al., 1999).

Hegedüs et al. (2001) wiesen bei Gerste nach viertägiger Behandlung mit 0,3 bis 1 mM Cd äußerlich sichtbare Symptome der Reduktion des Chlorophylls bis zu 60% nach. Über kürzere Zeiträume von 4, 7 und 9 Stunden wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Nach 72 Stunden waren aber bereits Unterschiede zwischen den Konzentrationen zu vermerken, bei denen der höchste Chlorophyllgehalt gemessen werden konnte. Tatsächlich fand der

stärkste Pigmentabbau nicht bei der höchsten Cd- und As-Konzentration von 250  $\mu\text{M}$ , sondern bei 100  $\mu\text{M}$  statt. Das kann auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Wu et al. (2003) untersuchten Gerste, die 10 bis 100 Tage unter Cd-Einfluss von 0,1 bis 5  $\mu\text{M}$  Cd gestanden hatte. Dabei variierte die Chlorophyllkonzentration über die Zeit in Abhängigkeit von der Cd-Konzentration. Die reduzierte Chlorophyllmenge wurde durch die Inhibition der Chlorophyllbiosynthese auf Transkriptionsniveau zu verschiedenen Zeitpunkten erklärt (Parekh et al., 1990; Horvath et al., 1996; Tziveleka et al., 1999). Neu gebildetes Chlorophyll wird rasch photooxidativ abgebaut, wie in mit Cu behandelten Gerstenblättern gezeigt worden ist (Caspi et al., 1999). Die Reduktion des Chlorophylls ist auch ein Zeichen für oxidativen Stress (Clijsters et al., 1999; Sanita di Toppi et al., 1998), der durch nicht-redoxierende Schwermetalle induziert werden kann (Hegedüs et al., 2001).

Cadmium verursacht die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den Chloroplasten und den Peroxisomen (Romero-Puertas et al., 2002). Diese ROS induzieren Lipidperoxidation und führen zur Bildung von Lipidradikalen und reaktiven Aldehyden (Mishra et al., 2006). Daraufhin werden die Lipiddoppelschichten und Membranproteine zerstört (Logani et al., 1980; Reinheckel et al., 1998). Als Stressmarker gilt die Malondialdehydkonzentration.

In der vorliegenden Studie konnten bedeutende Anstiege der Malondialdehydkonzentration in den Rhizomen bereits bei niedrigen Cd-Konzentrationen festgestellt werden. Die Blätter von *T. latifolia* zeigten dagegen in keiner der Behandlungen wesentliche Änderungen der Malondialdehydkonzentration. Die Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  Cd führte zu 200% Steigerung der Malondialdehydkonzentration in den Blättern und bis zu 600% in den Rhizomen. Eine solche Steigerung der Lipidperoxidation konnte auch nach der As-Behandlung mit 50 und 100  $\mu\text{M}$  As gemessen werden. Dass mit der steigenden Metallkonzentration die Konzentration an Malondialdehyd zunimmt, kann mit Ergebnissen von Dixit et al. (2001) in Gerste, Mishra et al. (2006) in *Bacopa monnieri*, Hegedüs et al. (2001) in Gerste korreliert werden. Laut Wu et al. (2003) korrelieren die erhöhten Konzentrationen an Malondialdehyd auch mit der Abnahme des Chlorophylls. Das erhöhte Niveau von endogenem Cd führt indirekt zur Produktion von Superoxidradikalen, die erhöhte Lipidperoxidation und oxidativen Stress in Gerste hervorrufen (Wu et al., 2003). Dies scheint auch in der vorliegenden Studie zuzutreffen.

Das Enzym Superoxiddismutase, das in den Chloroplasten lokalisiert ist, dismutiert  $\text{O}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Sauerstoff (Mittler, 2002). Nach der Cd-, As- und Pb-Behandlung von *T. latifolia* wurde weder in den Blättern noch in den Rhizomen erhöhte Superoxiddismutase-Aktivität gemessen. Bei allen Behandlungen lag die Aktivität der Superoxiddismutase unter 75% der Kontrolle. Eine Abnahme der SOD-Aktivität nach der Cd-Behandlung wurde auch in *Phaseolus vulgaris* (Somashekaraiah et al., 1992), *Helianthus annuus* (Gallego et al., 1996)

und Erbsen (Sandalio et al., 2001) nachgewiesen. Dixit et al. (2001) belegten dagegen eine Steigerung der SOD-Aktivität in Erbsenblättern nach der Behandlung mit Cd, jedoch waren die SOD-Aktivitäten der Wurzeln wesentlich niedriger als die der Kontrollpflanzen. Eine Reduktion der Superoxiddismutase bei hohen Cd-Konzentrationen könnte mit einer Inhibition des Enzyms durch endogene Peroxide verursacht werden, die in verschiedenen Zellkompartimenten und von zahlreichen enzymatischen und nichtenzymatischen Prozessen in der Zelle produziert werden (Dixit et al., 2001; Sandalio et al., 2001; Schützendübel et al., 2002). Tatsächlich bildet die Superoxiddismutase Wasserstoffperoxid auch selbst, das zwar nicht so reaktiv wie Singulett-Sauerstoff ist, aber auch aus dem Stoffwechsel entfernt werden muss. Die Katalase ist eines der Enzyme, das für den Abbau von Wasserstoffperoxid verantwortlich ist. Unkontrollierter Export des gefährlichen Stoffes von den Organellen zum Cytosol kann zur Bildung von Hydroxylradikalen bei der metallkatalysierten Haber-Weiss Reaktion führen (Dixit et al., 2001). Die Steigerung der Katalase-Aktivität nach der Schwermetallbehandlung zeigte, dass die *T. latifolia*-Pflanzen erhöhte Mengen an  $H_2O_2$  abbauen können. Bei Cd, As und Pb war diese Steigerung der Katalase-Aktivität mit der Schwermetallkonzentration in den Blättern korrelierbar. Die Rhizome der behandelten Pflanzen zeigten keine wesentlich erhöhte Katalase-Aktivität. Hegedüs et al. (2001) konnten in Gerste keine Cd-induzierte Katalase-Aktivität nachweisen und vermuten deswegen, dass das Cadmium zumindest die peroxisomale Katalase nicht beeinflusst. Mishra et al. (2006) konnten dagegen eine Abnahme der Katalase in den Blättern und in den Rhizomen nachweisen. Laut Cakmak (2000) ist die Katalase sehr sensitiv gegenüber  $O_2^-$ -Radikalen. Deshalb kann ihre erhöhte Aktivität unter Cd-Stress zur Deaktivierung des Enzyms führen. Im Unterschied zu Mishra et al. (2006) konnte kein Ausgleich der geringeren Katalase-Aktivität der Rhizome von *T. latifolia* durch die Aktivitäten der anderen beiden Enzyme, die für die  $H_2O_2$ -Abbau verantwortlich sind, APOX und GPOX, erreicht werden.

Das erhöhte Niveau der Katalase in den Rohrkolbenblättern kann auch in Verbindung mit der Photorespiration gesetzt werden (Nultsch, 2001). Nachdem Ribulosebisphosphat oxidativ in 3-Phosphoglycerat und Phosphoglycolat gespalten wurde, bleibt das 3-Phosphoglycerat im Calvin-Zyklus und die Phosphoglycolsäure wird zu Glycolsäure dephosphoryliert, die in die Peroxisomen transportiert wird. Die bei der Oxidation der Glykolsäure abgespaltenen Elektronen werden auf elementaren Sauerstoff übertragen. Das entstehende Wasserstoffperoxid wird durch Katalase gespalten (Nultsch, 2001).

Während nach der Cd-Behandlung von *T. latifolia* die Katalase-Aktivität der Rhizome gehemmt war, trat der umgekehrte Effekt bei der Peroxidase-Aktivität ein. In den Rhizomen war die Peroxidase-Aktivität 6mal höher als in den Blättern (ähnlich wie bei Hegedüs et al., 2001). In den As behandelten *Typha*-Pflanzen sind wesentlich höhere Peroxidase-Aktivitäten



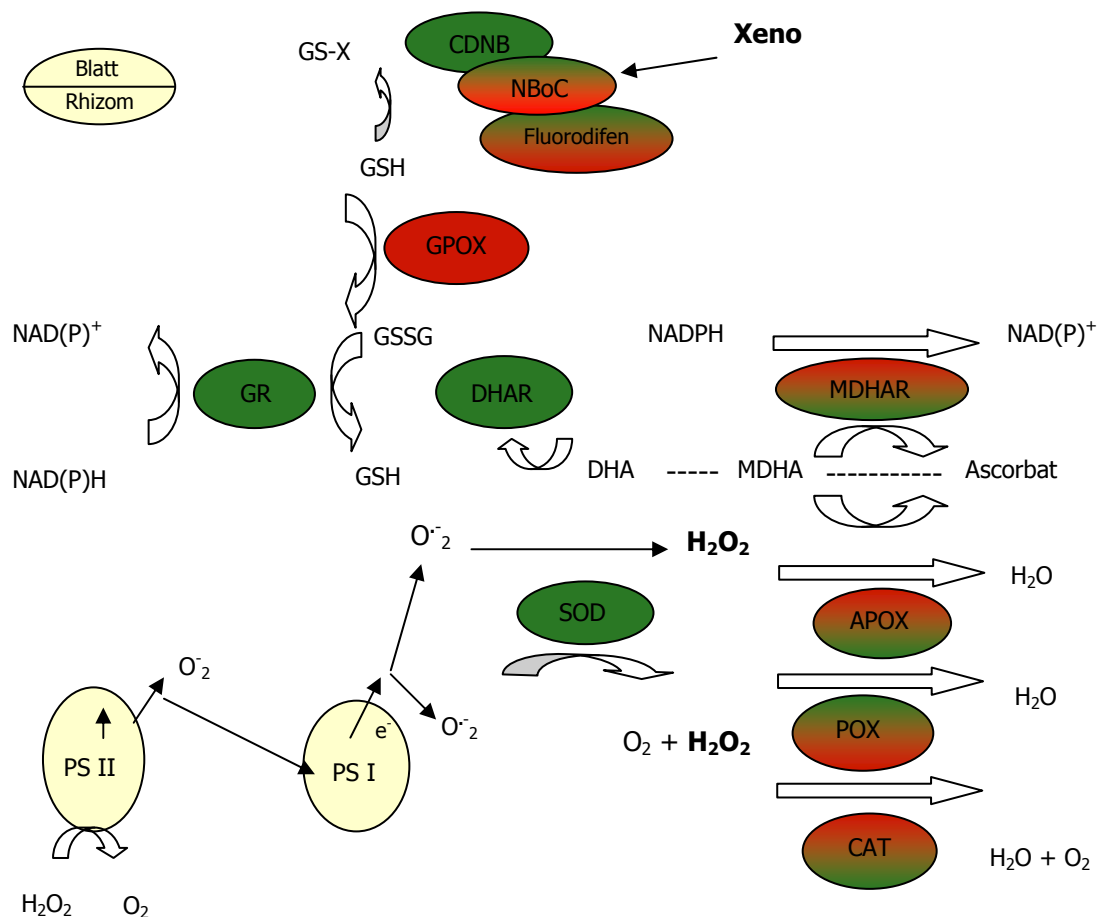
(bis zu 400%) in den Blättern, die mit 10  $\mu\text{M}$  As und den Blättern, die mit 250  $\mu\text{M}$  As behandelt wurden, nachgewiesen worden. In den Rhizomen wurde die höchste POX-Aktivität nach der Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  As nachgewiesen. Nach der Pb-Behandlung zeigten nur die Blätter, die mit 250  $\mu\text{M}$  Pb behandelt wurden eine 200% erhöhte Peroxidase-Aktivität. Vangronsveld et al. (1994) und Mocquot et al. (1996) vermuten, dass Peroxidase in bestimmten Spezies als potentieller Biomarker für sublethale Metalltoxizität verwendet werden kann.

Die hohen Peroxidase-Aktivitäten sind mit den Messungen von Blinda et al. (1996) in Gerstenwurzeln vergleichbar. Dort wird vermutet, dass die erhöhte Aktivität der Peroxidase mit der spezifischen Genexpression der Wurzeln zu tun hat (Blinda et al., 1996). Hegedüs et al. (2001) vermuten, dass Wurzeln und Blätter über unterschiedliche Mechanismen verfügen, um die reaktiven Sauerstoffspezies eliminieren zu können. Hegedüs et al. (2001) äußern die Meinung, dass die cytosolische Peroxidase unterschiedlich in den Blättern und in den Wurzeln verfügbar ist, was eine Bestätigung in den hier dargestellten Ergebnissen findet.

Eine Peroxidase-Reaktion wird auch von APOX katalysiert, allerdings nicht mit einem organischen Substrat, sondern mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , das unter Verbrauch von Ascorbat dissoziiert wird. Stets konnten in den behandelten *T. latifolia*-Pflanzen höhere APOX-Aktivitäten in den Blättern als in den Rhizomen nachgewiesen werden. Nach der Cd-Behandlung hatten nur die mit 100  $\mu\text{M}$  behandelten Pflanzen eine wesentlich höhere APOX-Aktivität als die Kontrolle (400%). In den Blättern der *Typha*-Pflanzen, die mit As behandelt wurden, konnten überzeugend höhere APOX-Aktivitäten (bis zu 1000% zur Kontrolle) gemessen werden. Die Effekte nach der Pb-Behandlung sind denen des Cadmiums ähnlich. Diese Ergebnisse kollidieren aber mit den Messungen von Hegedüs und Mitarbeiter (2001), die eine erhöhte APOX-Aktivität nach der Behandlung mit Cd nachgewiesen hatten. Die Hypothese der erwähnten Autoren ist, dass die Wurzeln der Gerste reaktive Sauerstoffspezies eher mit der cytosolischen APOX als mit der Peroxidase deaktivieren. Das kann auch für die *T. latifolia*-Pflanzen belegt werden. Deren APOX-Aktivität war durch die Cd-Behandlungen erhöht, aber die hohen Cd-Konzentrationen inhibierten andererseits die APOX-Aktivität. Das könnte eventuell durch erhöhte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion oder giftige aktive Sauerstoffderivate verursacht worden sein (Hegedüs et al., 2001; Aravind et al., 2005).

Signifikante MDHAR- und der DHAR-Aktivität konnte nach der Cd-Behandlung nur in einer Blattprobe, nämlich nach 100  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung, gemessen werden. Dort ist die DHAR-Aktivität fast 1000% höher als in der Kontrolle und die DHAR-Aktivität ist um 400% erhöht. Auch nach der As-Behandlung konnten keine MDHAR- und DHAR-Aktivitäten in den Rhizomen nachgewiesen werden. Dafür verfügten die Blattproben von *T. latifolia*, die mit 250  $\mu\text{M}$  As behandelt wurden, über eine 600% höhere Aktivität als die Kontrolle. Die Aktivität

der gleichen Proben bezüglich DHAR liegt nur bei 150% der Kontrolle. Um eine 200 % erhöhte DHAR-Aktivität konnte auch in den Blättern von *T. latifolia*, die mit 10  $\mu\text{M}$  As behandelt wurden, festgestellt werden. Mit Pb behandelte *T. latifolia*-Pflanzen hatten aber keine Aktivität im Rhizom. Überraschend konnte in diesen Proben auch keine DHAR-Aktivität nachgewiesen werden. Dafür verfügen alle Blattproben über eine bedeutend höhere MDHAR-Aktivität, die nach der 10 und 250  $\mu\text{M}$  Pb Behandlung bis 400% über der Kontrolle liegt und bei der Behandlung von 50  $\mu\text{M}$  Pb sogar 600% erreicht. Bei der gleichen Pb-Konzentration konnte auch eine 400% erhöhte Aktivität in den Rhizomen von *T. latifolia* nachgewiesen werden. Alle anderen DHAR-Aktivitäten werden unter dem Einfluss von Pb gehemmt. Aravind et al. (2005) zeigten, dass 10  $\mu\text{M}$  Cd eine drastische Reduktion in den MDHAR- und DHAR-Aktivitäten verursachen können. Sie vermuten, dass die Toxizität, die durch Cd ausgelöst wird, die MDHAR-Aktivität inhibiert.



**Abbildung 82** Schematische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit gemessenen antioxidativen Enzyme in *Typha latifolia* nach 72stündiger Cd-Behandlung. In Rot ist eine Steigerung und in Grün eine Abnahme der entsprechenden Enzymaktivitäten zur Kontrolle dargestellt.

Das bestätigt eine ungekoppelte DHAR-Aktivität und ermöglicht eine monovalente Oxidation (Cuyper et al., 2000), die zu einer nichtenzymatischen Disproportionierung von MDHA und

demzufolge zur Aktivierung von DHA führen kann. Die extrem hohe DHA-Akkumulation ist ein Zeichen für einen negativen Prozess des Zellmetabolismus (De Gara et al., 2000). Infolgedessen könnten hohe MDHAR- und gehemmte DHAR-Aktivität die Strategie für die Inhibition der MDHAR-Disproportionierung, aber auch für die effektive Umwandlung von DHA in reduziertes Ascorbat sein (Drazkiewicz et al., 2003). Dieser Mechanismus ist auch bei *Ceratophyllum demersum* beschrieben (Aravind et al., 2005).

In der Abbildung 82 sind die Aktivitäten der gemessenen Enzyme aus dem Antioxidationszyklus schematisch dargestellt und es wird versucht, die durch Cd-Wirkung hervorgerufenen Effekte auf die antioxidativen Enzyme zusammenzufassen. Dabei gibt es Veränderungen, die zum Teil durch die aktuelle Literatur abgedeckt werden.

Die Cd-Behandlung von *Typha latifolia* hat schon bei 10 µM eine Erhöhung der GPOX-Aktivität in den Blättern auf 600% über der Kontrolle ausgelöst. Die übrigen Cd-Konzentrationen von 50, 100 und 250 µM führten auch zu einer wesentlichen Steigerung der GPOX-Aktivität von 400%. In den mit Cd behandelten Rohrkolben-Rhizomen wurde aber nur bei der 50 µM-Konzentration eine 150% Steigerung gemessen. Die restlichen Behandlungen veränderten die GPOX-Aktivität nicht. Die gleiche Tendenz für das Vorhandensein einer sehr geringen Aktivität der GPOX in den Rhizomen konnte auch nach der As-Behandlung festgestellt werden. In den Blattproben derselben Pflanzen dagegen konnte eine Steigerung der GPOX-Aktivität mit der Zunahme der As-Konzentration gemessen werden. Nach der Pb-Behandlung konnte nur in der Blattprobe, die mit der höchsten Konzentration behandelt worden war, eine Erhöhung der GPOX gemessen werden. Die Aktivitäten der restlichen Proben waren sehr gering. Während die GPOX-Aktivität in den Rhizomen abnahm, stieg sie andererseits in den Blättern von *T. latifolia* nach 72 stündiger Behandlung, ähnlich wie bei Erbsen, die mit Cu behandelt wurden (Dixit et al., 2001).

Das Enzym GPOX katalysiert die Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, organische Hydroperoxide und Lipidhydroperoxide mittels GSH. Wie bei Mishra et al. (2006) wurde sowohl eine höhere GPOX- als auch APOX-Aktivität in den Blättern und in den Rhizomen nachgewiesen. Castillo (1986) vermutet, dass das Enzym als Stressmarker dienen kann; denn seine Induktion ist durch Schwermetallstress ausgelöst, der mit der aufgenommenen Metallmenge korrelieren kann.

Die einzigen erwähnenswert höheren Aktivitäten der Glutathionreduktase um 200% konnten in den Rhizomen von *Typha latifolia*, die mit 100 und 250 µM Cd behandelt worden waren, festgestellt werden. Alle anderen Rhizome und Blätter zeigten nach allen Behandlungen sehr geringe Aktivität für die Glutathionreduktase. Eine ähnliche Abnahme der Glutathionreduktase-Aktivität wurde auch in *Helianthus annuus* und *Cuscuta reflexa* nachgewiesen (Gallego et al., 1996; Srivastava et al., 2004). Eine Zunahme der Glutathionreduk-

tase-Aktivität wurde dagegen in *Phaseolus vulgaris* und *Alyssum* festgestellt (Chaoui et al., 1997; Schickler et al., 1999). Die Glutathionreduktase wandelt GSSG in GSH um, was essenziell für das gute Funktionieren des Ascorbat-Glutathion Zyklus sowie für die Phytochelatin-synthese ist (Cobbett, 2000). Erhöhte Glutathionreduktase-Aktivität kann durch die Translokationsmodifikation erklärt werden, die das adäquate Glutathionreduktase-Niveau erhält, um als Schutz gegen der Cd-Stress zu wirken (Romero-Puertas et al., 2002). Die höhere GR-Aktivität in den Blättern könnte auf ein höheres GSH/GSSG-Verhältnis hinweisen, das zu höherem oxidativen Schaden bei den Rhizomen in den hohen Konzentrationen führen kann (Mishra et al., 2006). Dies steht im Gegensatz zur langläufigen Meinung, dass das erhöhte GSH/GSSG-Verhältnis zu besseren Abwehr der Pflanze führt.

Als Bestandteil der Aminosäuren Cystein und Methionin und schwefelenthaltender Coenzyme und sekundärer Pflanzenprodukte (Marschner, 1995) liegen ungefähr 2% des organisch-reduzierten Schwefels in der wasserlöslichen Thiofraktion (-SH) vor. Unter normalen Bedingungen macht das Tripeptid Glutathion mehr als 90% dieser Fraktion aus (De Kok & Stulen, 1993). In den Blättern ist die Glutathion-Konzentration normalerweise höher als in den Rhizomen. Mehr als 50% davon ist in den Chloroplasten lokalisiert, wo sie millimolarer Konzentration erreichen kann (Rennenberg & Lamourex, 1990).

In den mit Cd über 72 Stunden behandelten *Typha latifolia*-Pflanzen wurden starke Effekte auf die GSH-Konzentration festgestellt. Besonders in den Blättern wurden Erhöhungen von 350% gemessen. In den Rhizomen verändert sich die GSH-Konzentration kaum. Bei den mit As behandelten *T. latifolia*-Proben traten ganz andere Effekte auf. Mit zunehmender As-Konzentration kam es in den Blättern zu einer sehr schnellen und drastischen Reduktion des GSH-Gehaltes. Die Rhizome zeigten diesen Verlust nicht, außer bei der 10  $\mu\text{M}$  As-Behandlung. In Bezug auf die GSSG-Konzentrationen muss erwähnt werden, dass bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Cd eine starke Zunahme der GSSG-Konzentration zu beobachten ist, die bei den höheren Cd-Konzentrationen schnell abgebaut wird. Nach der As-Behandlung sinkt der GSSG-Gehalt in den Blättern stark ab; in den Rhizomen jedoch nach der Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  As 3267% der Kontrolle gemessen. Diese Ergebnisse sind denen von Feducic & Erdei (2002) in *Typha latifolia* und *Phragmites australis* sehr ähnlich.

Cao et al. (2004) berichten, dass die GSH-Konzentrationen in den Blättern von *Pteris vittata* mit zunehmender As-Konzentration höher werden. Die Autoren vermuten hier eine Beteiligung von GSH an der As-Detoxifizierung. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen in *Zea mays* (Galli et al., 1996), wo erhöhte GSH-Konzentrationen die Cd- und Cu-Aufnahme beeinflussen. Hartley-Whitaker et al. (2001b) referierten, dass das GSH-Niveau signifikant mit der As-Konzentration in *Holcus lanatus* steigt. Cao et al. (2004) meinen, die verbesserte GSH-Produktion könne in *Pteris vittata* zu einer höheren Aufnahme von Phosphor führen, weil die

As-Aufnahme die Phosphoraufnahme der Pflanze stimuliert. Diese As induzierte Phosphor-Aufnahme könnte ihrerseits wiederum die Induktion der GSH-Synthese steigern. Kong et al. (1999) zeigten, dass der oxidative Pentose-Phosphat Zyklus mit dem GSH-Metabolismus verbunden ist. Die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase ist ein wichtiges Enzym im oxidativen Pentosephosphat-Zyklus, der das NADPH für die GSH-Produktion liefert (Kong et al., 1999). Der Zusammenhang zwischen GSH und der Sequestrierung von Phytochelatinen durch Schwermetalle ist gut bekannt (Zenk, 1996; Grill, 1985). Nach Sharma et al. (2004) kann die Konzentrationsabnahme von GSH bei stimulierter Phytochelatinsynthese durch Schwefelaufnahme, die die GSH-Biosynthese unterstützt, kompensiert werden. Es gibt auch weitere Studien, die über unterschiedliche Effekte auf die GSH-Konzentrationen berichten (Gupta et al. (1995) in *Hydrilla verticillata*, Gupta et al. (1998) in *Vallisneria spiralis*). Mishra et al. (2006) berichten über eine signifikante Zunahme der GSH-Konzentration in Rhizomen und Blättern von *Bacopa monnieri*, die von einer Depletion bei hohen Konzentrationen gefolgt werden. Bei den niedrigeren Metallkonzentrationen blieb die GSH-Konzentration aber signifikant hoch, sogar wenn die Phytochelatin-Synthese exprimiert war.

Unter Freilandbedingungen findet sich eine hohe Schwermetallbelastung häufig zusammen mit einer organischen Kontamination. Glutathion S-Transferasen sind Enzyme, die glutathionabhängig solche organischen Kontaminanten entgiften können. Es ist mehrfach berichtet worden, dass ihre Aktivität durch Schwermetalle induziert werden kann. Die Konjugation des Substrats CDNB, das normalerweise als gutes Beispiel für die Indizierbarkeit von GSTs zitiert wird (Schröder et al., 2002), war aber weder in den Blättern noch in den Rhizomen von *Typha latifolia*, die mit Cd, As und Pb behandelt worden waren, erhöht. Alle mit Cd und Pb behandelten Proben zeigten sogar eine geringere GST-Aktivität. Nur nach der As-Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  ist eine signifikante GST-Induktion in den behandelten Rhizomen festgestellt worden. Die Konjugation des Modells substrats NBC war ebenfalls nicht bedeutend induziert. Nach der Cd-Behandlung konnte weder in den Blättern noch in den Rhizomen eine Induktion der GSTs für das Modells substrat DCNB gemessen werden. Nur in mit As und Pb über 72 Stunden behandelten Pflanzen war die GST-Aktivität für DCNB erhöht. Alle Proben, außer die mit 100  $\mu\text{M}$  As behandelten Blätter und mit 10  $\mu\text{M}$  Pb behandelten Rhizome, zeigten einen signifikanten Anstieg der GSTs bezüglich DCNB. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen führten die As- und die Pb-Behandlungen bei den NBoC-Messungen nur zu einer geringeren und nicht signifikanten GST-Induktion. Dasselbe kann auch über die mit Cd behandelten Blätter von *Typha latifolia* gesagt werden. In den mit 50  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  behandelten Rhizomen kam es zu einer signifikanten Induktion der NBoC-GSTs. Die Konjugation des Herbizids Fluorodifen war auf die Rhizome begrenzt. Dabei ist eine signifikante Induktion nur bei den mit 250  $\mu\text{M}$  As behandelten Rhizomen gefunden worden.

Schröder et al. (2002) berichten, dass keine signifikante GST-Induktion messbar war, wenn *Picea abies* Cd- und Pb-Stress ausgesetzt war. Isoformen einzelner Pflanzen-GSTs wurden zwar von Cd und As induziert, aber der Signalweg wurde nicht erläutert (Schröder et al., 2002). Die Induktion der GSTs nach Cd-Behandlung wurde auch in Erbsen (Dixit et al., 2001) und im Weizen (Mauch et al., 1993) erwähnt. Marrs (1996) vermutet, dass die GST-Aktivität nicht als zusätzliche Antwort der Zelle auf oxidativen Stress ausgeschlossen werden kann. Aravind et al. (2005) berichteten auch über Steigerungen der GST-Aktivität in *Ceratophyllum demersum*-Pflanzen bei niedrigeren Cd-Konzentrationen. Diese limitierte Rolle der GSTs in den Cd behandelten Pflanzen könnte durch die Peroxidation von GST-Proteinen oder die Deaktivierung von GST-Genen zustande gekommen sein (Aravind et al., 2005). Natürlich hat dieses Fehlen einer Induktion beziehungsweise die konkrete Hemmung von Isoenzymen Folgen für das Überleben der Pflanze unter realen Schadstoffbedingungen.

#### **4.1.2 Das Langzeitexperiment mit 72tägiger Cd-Behandlung**

Die Cd-Behandlung für 72 Tage hatte in den *Typha latifolia*-Proben zu erheblich höheren Gewebe-Konzentrationen in den Rhizomen und Blättern geführt als im Kurzzeitexperiment. Das stimmt mit den Angaben in der Literatur überein (Metwally et al., 2005; Salt et al., 1995; Feduic & Erdei, 2002) allerdings hat keine der zitierten Gruppen Experimente von dieser Dauer geführt. Die Cd-Akkumulation in den Rhizomen und in den Blättern hängt von der Bindung an der extrazellulären Matrix (Horst, 1995), Komplexierung in der Zelle (Cobbett et al., 1998) und von der Transporteffizienz (Marchiol et al., 1996) ab. Letztere wird durch die Transpirationsrate und die stomatäre Leitfähigkeit beeinflusst (Mobin & Khan, 2007). Entsprechend wird auch von einem Einfluss der Cd-Behandlung auf die stomatäre Leitfähigkeit und die Transpiration in *Brassica juncea* berichtet (Mobin & Khan, 2007). In den hier untersuchten *T. latifolia*-Pflanzen konnten nach 72tägiger Cd-Behandlung auch Effekte auf die stomatäre Leitfähigkeit, die Transpiration und die Photosynthese beobachtet werden. Interessant ist, dass die Cd-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einer stärkeren Hemmung der drei Atmungsparameter als die restlichen drei Konzentrationen von 50, 100 und 250  $\mu\text{M}$  führte. Mobin & Khan (2007) konnten ebenfalls Nachwirkungen auf die Nettophotosynthese unter Cd-Stress nachweisen. Krupa & Baszynski (1995) zeigten, dass die Licht- und die Dunkelreaktion der Photosynthese durch die Schwermetalle an unterschiedlichen Angriffsstellen unterdrückt werden können. Die Abnahme der Photosynthese unter Cd-Stress führt zu einer Steigerung der stomatären Leitfähigkeit in nur einer *Brassica juncea* Sorte (Mobin & Khan, 2007). Siedlecka et al. (1997) berichten, dass Cd Effekte auf die Photosynthese durch Inhibition unterschiedlicher Reaktionsstufen des Calvin-Zyklus auslösen können.

Die Konzentrationen des Chlorophyll a, Chlorophyll b und der Carotinoide von *T. latifolia* nahmen mit zunehmender Cd-Konzentration nach 72tägiger Cd-Behandlung ab. Die Abnahme der Verhältnisse von Chlorophyll a und b blieben über die Behandlung gleich. Es muss aber erwähnt werden, dass die Pigmentkonzentrationen insgesamt bei der Cd-Konzentration von 10 µM niedriger sind als bei 50 µM Cd. Die nachfolgende Abnahme der Pigmente blieb aber linear. Die Ergebnisse sind mit denen von Mobin & Khan (2007) vergleichbar. Das Verhältnis von Gesamtchlorophyll zu Carotinoiden erhöht sich mit der zunehmenden Cd-Konzentration, was mit der steilen Abnahme der Carotinoide bei 250 µM Cd zu erklären ist. Küpper et al. (1996) führten Experimente mit Unterwasserpflanzen durch und berichteten, dass das Ersetzen von Mg<sup>2+</sup> von toxischen Metallen wie Cu, Zn oder Cd zum plötzlichen Einbruch der Photosyntheseleistung führen kann. Laut Gadallah (1994), Drazkiewicz (1994) und Ewais (1997) sind die Änderungen in den Konzentrationen von Chlorophyll a und b und die Änderungen in ihrem Verhältnis gleichwertig wichtige Parameter, die immer berücksichtigt werden müssen, wenn eine Bewertung der Effekte von Umweltparametern auf Pflanzen durchgeführt wird. Die Akkumulation der Schwermetalle, die für die Reduktion der Gesamtchlorophyllkonzentration verantwortlich ist, hat einen ähnlich negativen Effekt auf das Chlorophyll a zu Chlorophyll b Verhältnis (Manios et al., 2003).

Es kann zusammengefasst werden, dass die Änderungen im Chlorophyllhaushalt nach der Cd-Behandlung streng abhängig von der Wachstumsphase der Pflanze sind, das mit Schwermetallen behandelt ist (Mysliwa-Kurdziel et al., 1999). Cadmium löst Effekte auf die Chlorophyllbiosynthese eher in voll entwickelten Blättern, die vollständigere Innenmembranen haben als in jungen Blättern, aus (Skorzynska-Polit & Baszynski, 1995).

Das Ersetzen des Zentral-Mg-Moleküls im Chlorophyll-Molekül durch Cadmium *in vivo* ist ein wichtiger Schaden in Unterwasserpflanzen, die auf metallkontaminierten Sedimenten wachsen (Mysliwa-Kurdziel et al., 1999). Das Ausmaß der Schäden variiert mit der Lichtintensität. Bei niedrigerer Lichtstrahlintensität sind alle Zentrallatome des Chlorophylls für Schwermetalle empfänglich. Mit der Bildung von Schwermetall-Chlorophyll-Komplexen sind infolgedessen einige von ihnen stabiler gegen die Lichtstrahlung als die Mg-Chlorophyll-Komplexe geworden und die Pflanzen bleiben sogar grün, wenn sie abgestorben sind. Bei hoher Intensität der Lichtstrahlung hingegen zeigen fast alle Chlorophyllzerfälle, dass unter diese Bedingungen die meisten Chlorophyllmoleküle unempfindlich für Schwermetallionen sind (Küpper et al., 1996).

Es ist bekannt, dass Cadmium zur Inhibition des Pflanzenwachstums führen kann (Zhang et al., 2005). Bei den Untersuchungen der Blattzahl von *Typha latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung konnte diese Hypothese bestätigt werden. Mit zunehmender Cd-Konzentration bildeten die Rohrkolbenpflanzen im Verlauf des Experiments weniger Blätter. Dasselbe kann

aber nicht in Bezug auf die Blattfläche der behandelten Pflanzen gesagt werden. Das Frischgewicht und das Trockengewicht der untersuchten *Typha latifolia*-Pflanzen sind bei der höchsten Cd-Konzentration nicht niedriger als in der Kontrolle. Der bemerkenswerte Unterschied ist nur, dass mit zunehmender Cd-Konzentration das Trockengewicht der Rhizome auf Kosten des Trockengewichts der Blätter zunimmt. Diese Ergebnisse kollidieren mit den Erkenntnissen von Schützendübel et al. (2002), die bewiesen hatten, dass eine Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Cd zu 50% Inhibition des Sprosswachstums von Pappeln führen kann. Ähnliche Wachstumshemmungen des Sprosses von *Allium sativum* wurden auch von Zhang et al. (2005) bei höheren  $\text{CdCl}_2$  Konzentrationen von 2 bis 10 mM berichtet. Insgesamt kann man also feststellen, dass *Typha latifolia* über eine gewisse Resistenz gegenüber den untersuchten Cd-Konzentrationen verfügt, die es der Pflanze erlauben, weiterzuwachsen.

Abiotische Stressvielfalt, die Schwermetalle inklusive, können den molekularen Abbau der pflanzlichen Zelle, direkt oder indirekt durch den oxidativen Burst von AOS auslösen (Lin & Kao, 2000; Cuypers et al., 2002). Durch Protonierung von  $\text{O}_2$  kann Wasserstoffperoxid produziert werden, das durch den Abbau von biologischen Membranen die Fettsäuren in toxische Lipidhydroperoxide umwandeln kann. Die Bildung von Malondialdehyd ist der Hauptindikator für die Existenz von Lipidperoxidation als Folge von oxidativem Stress (Zhang et al., 2005).

In die vorliegende Arbeit konnte keinerlei Erhöhung der MDA-Konzentration in den *Typha latifolia*-Pflanzen nach 72tägiger Cd-Behandlung nachgewiesen werden. In allen untersuchten Proben liegt die MDA-Konzentration im Bereich der Kontrolle. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu einer in *Allium sativum* bewiesenen 3fachen Steigerung der MDA-Konzentration nach 8tägiger Cd-Behandlung (Zhang et al., 2005). Das gute Wachstum von *Typha latifolia* unter Cd-Stress könnte jetzt vielleicht durch die niedrige MDA-Konzentration erklärt werden. Nach Zhang et al. (2005) tritt die erhöhte MDA-Konzentrationen in den Blättern früher als in den Rhizomen auf. Es ist möglich, dass die Cd-Akkumulation in den Blättern die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auslöst, das in den Blättern transportiert wird und dann physiologische Reaktionen in den Blättern bewirkt (Zhang et al., 2005).

Mit der Erhöhung der Cd-Konzentration in den Blättern von *Typha latifolia* konnte allerdings eine konstant signifikante Zunahme der SOD-Aktivität nachgewiesen werden. Dies gilt aber nicht für die Rhizome der Pflanzen, deren SOD-Aktivität im Bereich der Aktivität der Kontrolle liegt. Das wäre ein Beweis, dass tatsächlich eine Dismutation von  $\text{O}_2^-$  zu Wasserstoffperoxid stattgefunden hat. Die Ergebnisse sind denen von Schickler & Caspi (1999) und Zhang et al. (2005) ähnlich; die zeigen, dass die SOD-Aktivität in der Reaktion auf erhöhte Cadmium-Konzentrationen zunimmt. Mobin & Khan (2007) berichteten über die gleichen Effekte in



*Brassica juncea*. Eine Steigerung der SOD-Aktivitäten in den Blättern und in den Rhizomen konnte auch von Iannelli et al. (2002) in *Phragmites australis* nachgewiesen werden.

Die Katalase, die das Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff abbaut, war nur in den *Typha latifolia*-Blättern, die mit 100 und 250  $\mu\text{M}$  Cd behandelt wurden, signifikant erhöht. Die Rhizome haben dagegen ab der Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Cd eine geringere Katalase-Aktivität. In der Studie, die Zhang et al. (2005) mit *Allium sativum* durchgeführt haben, wurde die Aktivität der Katalase auch bei den niedrigeren Cd-Konzentrationen unterdrückt und nahm danach mit zunehmender Cd-Konzentration zu. Laut der gleichen Studie ist die Katalase wegen ihrer geringen Substrat-Affinität weniger effektiv beim  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Abbau als die Peroxidase. Solange der Stress nicht zu gefährlich für die Abwehrkapazität der Pflanze ist, wird also die Antwort auf den Schwermetallstress in einer Zunahme der SOD- und POX- und einer Abnahme der Katalase-Aktivität bestehen (Siedlecka & Krupa, 2002).

Diese Beobachtung konnte aber nicht bei der Untersuchung der POX-Aktivität in *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung bestätigt werden. Bei Konzentrationen von 10 und 50  $\mu\text{M}$  Cd hatten die Blätter und die Rhizome eine gehemmte POX-Aktivität. Bei den höchsten Cd-Konzentrationen von 100 und 250  $\mu\text{M}$  Cd konnte eine POX-Aktivität im Bereich der Kontrolle gemessen werden. Im Langzeitexperiment kann Cd also teilweise bei hohem Niveau die POX in den Blättern deaktivieren. Dann wird offenbar Katalase aktiviert, um die fehlende POX zu kompensieren (Zhang et al., 2005). Das könnte auch in den Blättern von *T. latifolia* nach 72tägiger Behandlung bei hohen Cd-Konzentrationen der Fall sein, in denen die POX gehemmt, aber die Katalase signifikant induziert ist. Dies stimmt mit Resultaten von Zhang et al. (2005) und Lidon & Teixeira (2000) überein, die beweisen, dass Katalase über die Oxidation der Radikale Abwehr leistet und dass die Katalase-Aktivität wesentlich höher als die POX-Aktivität ist.

Feduic & Erdei (2002), die auch die Katalase-Aktivität in *Typha latifolia* nach 28tägiger Cd-Behandlung untersucht haben, konnten zeigen, dass mit der zunehmenden Cd-Konzentration die Katalase-Aktivität der Rhizome steil abnimmt. Bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  Cd steigt die Katalase-Aktivität in den Blättern und nimmt bei den nachfolgenden Cd-Konzentrationen leicht ab, aber sie liegt immer noch über der Kontrolle.

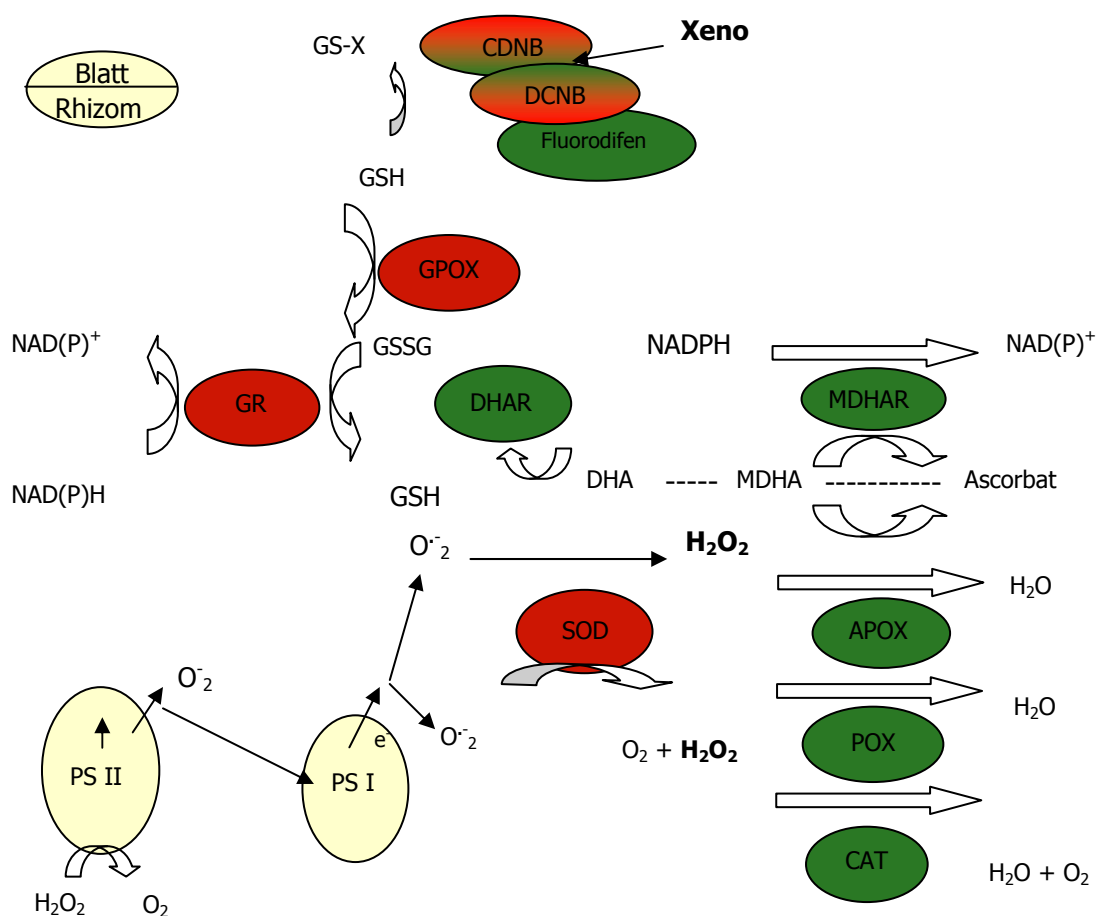
Die Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid kann weiter durch die Teilnahme des Ascorbat-Glutathion Zyklus unterstützt werden, wenn  $\text{H}_2\text{O}_2$  systemisch ein Signal für die Induktion der APOX sendet (Karpinski et al., 1999). Dieses Signal konnte aber keine durchgehend signifikante APOX-Aktivität in *T. latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung verursachen. Die einzige Behandlung, bei der in den Blättern eine signifikant hohe APOX-Aktivität gemessen werden konnte, ist die mit 100  $\mu\text{M}$  Cd. Alle restlichen Proben hatten gehemmte Aktivitäten der APOX. Mobin & Khan (2007) zeigten eine zunehmende APOX-Aktivität bei der Steigerung der Cd-

Konzentration in *Brassica juncea* und Singh et al. (2006) in *Bacopa monnieri*. Die Steigerung der APOX-Aktivität führt vermutlich zur Entgiftung von  $H_2O_2$  in *Acer saccharium* (Pukacka & Ratajczak, 2006). Das Enzym nutzt das reduzierte Ascorbat als Reduktor und ist hier der wirksamste Wasserstoffperoxid-Abbaumechanismus in den Pflanzenzellen (Shigeoka et al., 2002).

Im Unterschied zu den restlichen zwei Umwandlern des Wasserstoffperoxids, der Katalase und der Ascorbat-Peroxidase, deren Aktivitäten vorwiegend gering sind, konnte bei der Glutathionperoxidase ab der Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  Cd eine signifikante Steigerung der Aktivität in Blättern und Rhizomen nachgewiesen werden. Bei Inkubation mit  $10 \mu\text{M}$  Cd blieb die GPOX-Aktivität im Bereich der Kontrolle. Solche Ergebnisse wurden auch von Singh et al. (2006) für die Pflanze *Bacopa monnieri* und von Milone et al. (2003) für Weizen publiziert. Die Untersuchungen an GPOX wurden mit den gleichen Konzentrationen, aber für kürzere Zeiträume durchgeführt. Auf diese Weise könnten durch die hochregulierte GPOX-Aktivität weitere Konzentrationen an  $H_2O_2$  abgebaut werden, die bei einem unkontrollierten Transport von den Organellen ins Cytosol zu einer Bildung von Hydroxylradikalen durch die metallkatalysierte Haber-Weiss Reaktion führen könnten (Singh et al., 2006). Die erhöhten GPOX-Aktivitäten zeigen, dass die Glutathionperoxidase mit der APOX um den Abbau von Wasserstoffperoxid konkurriert (Singh et al., 2006). Feducic & Erdei (2002) konnten dagegen ganz andere Effekte für die GPOX-Aktivität von *Typha latifolia* nachweisen. Sie zeigten, dass mit einer Zunahme der Cd-Konzentration von  $0,1$  bis auf  $100 \mu\text{M}$  Cd die Aktivität der GPOX in den Blättern und in den Rhizomen kontinuierlich abnimmt. In den *Phragmites australis*-Pflanzen hingegen, die dem gleichen Schwermetallstress ausgesetzt waren, konnte eine steile Zunahme der GPOX-Aktivität in den Rhizomen nachgewiesen werden, wie auch eine leicht zunehmende Aktivität in den Blättern nach 100tägiger Behandlung. Hohe GPOX-Aktivitäten wurden noch bei den Rhizomen und den Blättern von Cd behandelten *Phaseolus vulgaris* (Chaoui et al., 1997), *Zea mays* (Lagriffoul et al., 1998) und in Fichtennadeln gezeigt (Radotic et al., 2000). Über eine mit der As-Konzentration steigende GPOX-Aktivität in *Pteris vitatta* berichten auch Cao et al. (2004).

Die Blätter von *T. latifolia* zeigten nach 72tägiger Cd-Behandlung ähnlich wie bei der GPOX-Aktivität eine signifikante GR-Aktivität in Abhängigkeit zur Cd-Konzentration. Dies gilt aber nicht für die GR-Aktivität der gleichbehandelten Rhizome, deren Aktivität stets im Bereich der Kontrolle liegt. Bei der höchsten Cd-Konzentration von  $250 \mu\text{M}$  wurde eine Hemmung der GR-Aktivität gemessen. Feducic & Erdei (2002) berichten über einer Steigerung der Glutathionreduktase-Aktivität in *T. latifolia* mit der Erhöhung der Cd-Konzentration in den Blättern und eine geringere Steigerung der GR-Aktivität in den Rhizomen. Diese Messungen von Feducic & Erdei (2002) wurden weiter von den gleichbehandelten *Phragmites australis*

Pflanzen unterstützt. Es muss dabei erwähnt werden, dass oberhalb der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Cd die GR-Aktivität in *P. australis* leicht abnimmt, was mit den Erkenntnissen über die GR-Aktivität der *T. latifolia* in der vorliegenden Arbeit korreliert. Iannelli et al. (2002) berichteten ebenfalls über eine Zunahme der GR-Aktivität in den Rhizomen von *P. australis*. Die Aktivität der Glutathionreduktase, die sich als limitierendes Enzym im Ascorbat-Glutathion Zyklus erweist, führt zu einem hohen GSH/GSSG-Verhältnis, das für die Regeneration des Ascorbats und für die Aktivierung verschiedener  $\text{CO}_2$ -fixierender Enzyme notwendig ist (Noctor & Foyer, 1998). Die GR wird aber anders reguliert als die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  aktivierte APOX (Schützendübel et al., 2001). Das korreliert sehr gut mit den hier präsentierten Ergebnissen, wo die Cd beeinflusste Erhöhung der GR-Aktivität nur in den Blättern und nicht in den Rhizomen nachzuweisen ist. Die gehemmten APOX- und GR-Aktivitäten der Rhizome und die signifikant hohe GPOX-Aktivität der Rhizome zeigen, dass das Wasserstoffperoxid mehr durch den Glutathionperoxidase-Zyklus und weniger durch den Ascorbat-Glutathion Zyklus abgebaut wird (siehe Abbildung 83).



**Abbildung 83** Schematische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit gemessenen antioxidativen Enzyme in *Typha latifolia* nach 72tägiger Cd-Behandlung. In Rot ist eine Steigerung und in Grün eine Abnahme den entsprechenden Enzymaktivitäten zur Kontrolle dargestellt.

Die *T. latifolia*-Pflanzen hatten nach 72tägiger Cd-Behandlung bei der Mehrheit der Behandlungen eine gehemmte MDHAR- und DHAR-Aktivität. Alle mit Cd behandelten Blätter zeigten MDHAR-Aktivität um die der Kontrolle und in den Rhizomen eine Hemmung. Es konnte das Entgegengesetzte in Bezug auf die DHAR-Aktivität nachgewiesen werden. Die Rhizome hatten erhöhte DHAR-Aktivität und bei der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Cd konnte sogar eine signifikante Steigerung der Aktivität der DHAR belegt werden. Mit der steigenden Cd-Konzentration nahm die Aktivität der DHAR in den Rohrkolben kontinuierlich ab. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Aravind et al. (2005) in *Ceratophyllum demersum* überein, wo gezeigt wurde, dass nach einer Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Cd die Aktivitäten von MDHAR und DHAR stark abgenommen hatten. Aravind et al. (2005) vermuten, dass die Toxizität des Cadmiums die Aktivität der MDHAR hemmt. Hohe MDHAR-Aktivität und gehemmte DHAR-Aktivität könnten eine Strategie sein, um die Disproportionierung von MDHAR zu hemmen und um effektiver Dehydroascorbat zu Ascorbat umzuwandeln (Drazkiewicz et al., 2003).

Glutathion in seiner reduzierten und oxidierten Form ist bereits mehrfach erwähnt worden. Seine Rolle beim Schutz der Zellen vor den toxischen Effekten der freien Radikale ist offenbar, das Ascorbat reduziert zu halten (Zhang et al., 1996). Mit der Zunahme der Cd-Konzentration konnte in den *T. latifolia*-Rhizomen, die mit Cd über 72 Tage behandelt wurden, eine kontinuierliche Abnahme der GSH-Konzentration beobachtet werden. Bei der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Cd wurde hingegen eine steile Zunahme des GSH gemessen. Die Blattproben derselben Pflanzen hingegen hatten nur sehr geringe GSH-Konzentrationen nach allen vier Behandlungen. In Bezug auf die GSSG-Konzentrationen sind interessante Effekte bezüglich der Cd-Konzentrationen in den Blättern zu erwähnen. Die GSSG-Konzentration in den Rhizomen nimmt von der 10  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung zu der 100  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung kontinuierlich ab. Dabei ist auch eine Abnahme der GSSG-Konzentration in den Blättern bis zu der Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Cd festzustellen. Ab 100  $\mu\text{M}$  Cd nimmt die Konzentration des GSSG wieder zu, um bei der Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  Cd ein zweites Maximum zu erreichen. Laut Foyer & Noctor (2003) führt die Abnahme im Reduktionsstatus von GSH zum Verlust der Zell-Reduktionshomeostase. Das erhöhte GSH-Niveau während des Cd-Stresses kann offenbar zu induzierter Transkription von Genen führen, die für die GSH-Biosynthese, wie zum Beispiel  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthase, Glutathion-Synthase und Glutathionreduktase (Xiang et al., 1998) und die Enzyme der Phytochelatinsynthese (Inouhe, 2005) verantwortlich sind. Feduic & Erdei (2002) berichten über die Zunahme der GSH-Konzentrationen in *Typha* nach 14tägiger Cd-Behandlung und einem GSH-Gleichstand wie bei der Kontrolle. Cao et al. (2004) hingegen berichten über eine Abnahme der GSH-Konzentration in den Rhizomen von *Pteris vittata* mit der zunehmenden As-Konzentration. Aravind et al.

(2005) publizierten Ergebnisse, die über eine drastische Reduktion von GSH- und parallel steigenden GSSG-Konzentrationen beschließen ließen, die eine echte Indikation von oxidativem Stress sind.

Wie bereits gezeigt, können auch die Glutathion S-Transferasen ein Indikator für Cd-Stress sein. Die Steigerung des GSH-Niveaus führt auch zu ihrer Transkription (Marrs, 1996). Im Langzeitexperiment war die CDNB-Konjugation nur in den Blättern bei der Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  Cd induziert. Bei den restlichen Behandlungen und Cd-Konzentrationen konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf CDNB festgestellt werden. Sehr interessant war die signifikant hohe Induktion der DCNB-Konjugation in den Rhizomen bei allen Konzentrationen, weil das ein sehr spezifisches Substrat für wenige GST-Isoformen ist. Bei dem Modells substrat NBC konnte nach der Cd-Behandlung in den Blättern und in den Rhizomen bei den höchsten Cd-Konzentrationen eine GST-Konjugation nachgewiesen werden. Die DCNB- und die NBC-Ergebnisse korrelieren mit den von Schröder et al. (2002) publizierten Daten. Iannelli et al. (2002) berichteten auch über die steigende Aktivität von GST nach der Cd-Behandlung von *P. australis*. Über eine Stimulation von GST nach der Cd-Behandlung berichten auch Dixit et al. (2001) in Erbsen und Mauch et al. (1993) im Weizen. Marrs (1996) schließt die Möglichkeit nicht aus, die GST-Aktivität sei mit anderen antioxidativen Reaktionen verbunden.

Nach der Ammoniumsulfatfällung wird oft als nächster Schritt der GST-Isoenzyme-Reinigung, eine Affinitätschromatographie, durchgeführt, die eine Trennung der GST von den restlichen Proteinen bewirkt. Nicht alle GST-Isoenzyme binden an das jeweilige Affinitätschromatographiematerial (Götzberger, 1994). Das war der Grund, die Enzymextrakte mittels einer Mono Q-Säule weiter zu reinigen. Auf diesem Wege konnte die gezielte Steigerung der spezifischen Aktivität erreicht und die GSTs in Fraktionen mit ähnlicher Aktivität getrennt werden.

Schröder (1996) zeigte, dass die GST nach HPLC-Trennung besser aufgelöst und klarer dargestellt werden als auf SDS-Gelen. In *Arabidopsis thaliana* wurden bisher 52 Pflanzen-GSTs bestimmt (Edwards & Dixon, 2005). Bis jetzt waren circa 20 unterschiedliche GST-Proteine in *Phragmites* getrennt worden (Nuber & Schröder, persönliche Mitteilung). Mit der hier verwendeten etablierten Methode wurden über 30 HPLC-Peaks als putative GST-Isoformen in den Kontrollpflanzen isoliert. Als Grundlage dieser Trennung ist neben dem Molekulargewicht auch die unterschiedliche Lipophilie der Proteine verwendet worden. Die Verwendung dieser HPLC Methode zur GST-Charakterisierung belegte auch, dass in Blättern und Rhizomen von *Typha* unterschiedliche GSTs exprimiert werden. Aus den Retentionszeiten folgt, dass es sich zum Teil um Untereinheiten handelt, die einander sehr unähnlich sind. Zahlreiche Untereinheiten gehen aufgrund der Behandlung verloren. Dafür konnten in

behandelten Pflanzen etwa 10 neue Untereinheiten der GST in den Rhizomen und 6 neue Untereinheiten-Peaks in den Blättern identifiziert werden. Während in den *Typha latifolia*-Rhizomen nach 72tägiger Cd-Behandlung Isoenzyme nach der Behandlungen mit allen 4 Cd-Konzentrationen (10, 50, 100 und 250  $\mu\text{M}$ ) nachgewiesen werden konnten, sind diese neuen Isoformen in den Blättern auf die Konzentrationen von 10 bis 100  $\mu\text{M}$  Cd begrenzt. Hier sind molekularbiologische Studien erforderlich, um die Identität zur Gruppenzugehörigkeit der GST zu klären.

Untersuchungen von Daubner (2001) zeigten, dass die Schwermetalle unspezifische Reaktionen auslösen, die auch während die Zelle mit anderen Stressfaktoren, wie Licht und UV-Strahlung zum Beispiel, konfrontiert wird, ablaufen, was zur Induktion von GST-Aktivität führt. Laut Fischer (1997) könnte das bedeuten, dass die Zellkultur von *Picea abies* auf Schwermetallinduktion nicht mit Synthese von neuen Isoenzymen reagiert hat.

Für weitere Arbeiten wird es unumgänglich sein, die GST Isoformen zu identifizieren und klar herauszustellen, welche von ihnen für die Schadstofftoleranz unter Schwermetalleinfluss essentiell sind. Auf diese Art wird es möglich sein, die Entgiftungskapazität in *Typha latifolia*-Pflanzen spezifisch für den Einsatz in der Phytoremediation in unterschiedlich belastete Abwässer hochzuregulieren, so dass möglichst optimaler Schadstoffabbau gewährleistet wird.

#### **4.2 *Helianthus annuus***

Um bereits vorher im Labor untersuchte Metallaufnahme mit der Entgiftungskapazität im praktischen Hinblick korrelieren zu können, wurden Pflanzenproben in der Schweiz geerntet, die auf schwermetallkontaminierten Böden gewachsen waren. Auf diese Weise wurde nach eine Bestätigung gesucht, dass die Phytoremediation von Schwermetallen bei einer organischen Kontamination nicht beeinträchtigt wird.

Mutanten der Sonnenblumensorten IBL 04 und Salut wurden auf dem Versuchsfeld Rafz (Schweiz) auf ihre Schwermetallaufnahme-Kapazität und Extraktionsvermögen in Bezug auf die Verwendung für die Phytoremediation angepflanzt. Ausgewählte Mutanten durften für die vorliegende Arbeit beprobt und auf ihre antioxidativen Enzyme untersucht werden.

Die dem Metallstress ausgesetzten Sonnenblumenmutanten zeigten eine sehr gute Aufnahme an Cd, Zn und Pb (siehe Tabelle 27). Wie von früheren Studien bekannt ist, sind die Zellmembranen die ersten, die von den Metallen betroffen werden (Singh et al., 2006). Die Destabilisierung der Membranen ist mit der Lipidperoxidation verbunden, die durch aktivierte Sauerstoffspezies wie  $\text{O}_2^-$ , OH oder die Lipooxygenase angeregt werden kann (Halliwell & Gutteridge, 1989). Die Metallionen blockieren den Elektronenfluss im Photo-

system II, was zur Bildung von angeregtem Chlorophyll führt, das auch die Produktion von freien Radikalen auslösen kann (Kato & Simizi, 1985).

Es war also zu erwarten, dass die Pflanzen im Feld beobachtbare Schäden aufweisen würden. Dabei war in Versuchen auch die Vergilbung den Blättern beobachtet worden.

Der vorwiegende Teil der IBL 04-Mutanten zeigt eine Pigment-Konzentration im Bereich der Kontrolle. Es konnten keine großen Unterschiede unter den einzelnen Sonnenblumenmutanten bezüglich des Chlorophyll b und der Carotinoide nachgewiesen werden. Das Chlorophyll a zu Chlorophyll b-Verhältnis der IBL 04-Mutanten liegt zwischen 2,5 und 3,5. Bei den Hybride-Salut-Mutanten konnte nur in einem Fall (9/64-19-S) eine höhere Pigment-Konzentration als in der Kontrolle festgestellt werden. Die restlichen Mutanten zeigten eine Pigment-Konzentration im Bereich der Kontrolle. Die Konzentration der Carotinoide ist vergleichbar unter allen Mutanten der Hybride Salut. Sanita di Toppi et al. (1998), Horvath et al. (1996) und Caspi et al. (1999) äußerten die Meinung, die Chlorophyllabnahme könne als Hinweis für schwermetallinduzierte Schäden benutzt werden. Bei den Untersuchungen von Horvath et al. (1996) und Caspi et al. (1999) an Gerste wurde mit zunehmender Cd-Konzentration eine Inhibition von Chlorophyll nachgewiesen. Ähnliche Effekte wurden auch von Mishra et al. (2006) in *Bacopa monnieri* festgestellt. Bei *H. annuus* war also eine solche Abnahme nicht signifikant und eindeutig.

In den Sonnenblumenmutanten von IBL 04 und Salut, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, konnte keinerlei signifikante Veränderung der Malondialdehyd-Konzentration festgestellt werden. Sechs der IBL 04-Mutanten, die eine sehr gute Aufnahme der drei Metalle gezeigt haben, wiesen sogar eine geringere Malondialdehyd-Konzentration auf. Die übrigen Mutanten hatten Malondialdehyd-Konzentrationen im Bereich der Kontrolle. Die gleiche Beobachtung konnte auch in Bezug auf die 9/64-19-S Salut-Mutante gemacht werden, die trotz ihrer sehr hohen Metallaufnahme eine niedrigere Malondialdehyd-Konzentration als die Kontrolle zeigte. Die Konzentration des Malondialdehyds blieb auch in mit niedrigen Cd-Konzentrationen behandelten *Allium sativum* gering (Zhang et al., 2005).

Diese Erkenntnisse kollidieren mit den Untersuchungen an anderen Pflanzenarten. Es ist bewiesen, dass die hohe Cd-Konzentrationen zur Steigerung der Lipidperoxidation in *Pisum sativum* (Chaoui et al., 1997; Metwally et al., 2005), Reis (Chien et al., 2001), Sonnenblumenkeimlingen (Gallego et al., 1996), *Bacopa monnieri* (Mishra et al., 2006; Singh et al., 2006) und Gerste (Wu et al., 2003) führen. Bestätigung für die erwähnten Thesen wurde auch nach der 72stündigen Cd- und As-Behandlung in den Rhizomen von *Typha latifolia* entdeckt (siehe Tabelle 34), aber nicht bei der 72tägigen Behandlung (siehe Tabelle 45).

Nach Schwermetallstress ist aber die SOD in der Pflanze erhöht (Mishra et al., 2006). In den untersuchten IBL 04 und Salut Sonnenblumenmutanten konnte die Schwermetallkonzentration

tration der Pflanze nicht mit der jeweiligen SOD-Aktivität in Verbindung gesetzt werden. Einige der Pflanzen, die weniger Schwermetalle aufgenommen hatten, zeigten höhere SOD-Aktivität und umgekehrt. Dafür hatten alle Mutanten, deren MDA-Konzentration gering war, SOD-Aktivitäten im Bereich der Kontrolle. Anscheinend sind in den Mutanten der beiden Sonnenblumensorten gewisse Mengen an pflanzengiftigem Wasserstoffperoxid vorhanden, die durch die SOD abgebaut werden. Über eine geringere SOD-Aktivität nach der Schwermetallbehandlung berichten auch Mishra et al. (2006) in *Bacopa monnieri*, Gallego et al. (1996) in *Helianthus annuus* und Sandalio et al. (2001) in Erbsen. Schickler et al. (1999) hingegen zeigten, dass das Cd zur Steigerung der SOD-Aktivität in *Alyssum* führt. Eine erhöhte SOD-Aktivität kann zur erhöhten Produktion von aktiven Sauerstoffspezies führen (Somashekaraiah et al., 1992). Eine Abnahme von SOD bei der Schwermetallanwesenheit könnte zu einer Deaktivierung vom Enzym durch  $H_2O_2$  führen, das in unterschiedlichen Zellkompartimenten und enzymatischen und nichtenzymatischen Prozessen in der Zelle gebildet wird (Sandalio et al., 2001; Schützendübel et al., 2002; Dixit et al., 2001). Diese Erkenntnis konnte mit den *T. latifolia*-Ergebnissen in Verbindung gesetzt werden. Bei der Cd-Behandlung von Rohrkolben über 72 Stunden konnte nur eine starke Abnahme der SOD-Aktivität festgestellt werden (siehe Tabelle 34). Da ist anscheinend, wie bereits zitiert, das Enzym abgeschaltet worden. In der nächsten *Typha latifolia*-Behandlung, die über 72 Tage durchgeführt wurde, konnte eine Steigerung der SOD-Aktivität beobachtet werden (siehe Tabelle 45), die als weiterer Effekt auch bei der Katalase und die APOX wieder zu finden war. Nach der Entgiftung der gefährlichen Sauerstoffspezies durch das Enzym SOD werden gewisse Mengen an Wasserstoffperoxid in verschiedenen Pflanzenkompartimenten vorhanden sein. Die Enzyme Katalase, Ascorbatperoxidase und Glutathionperoxidase verwenden das  $H_2O_2$  und bauen es zu Wasser und molekularem Sauerstoff ab (Mishra et al., 2006). Die Katalase, die in den Peroxisomen und den Mitochondrien vorhanden ist, konnte in bedeutenden Konzentrationen (bis zu 1500% Steigerung zur Kontrolle) bei den IBL 04 Mutanten festgestellt werden. Es sind aber 7 IBL 04-Mutanten vorhanden, bei denen die Aktivität der Katalase gegenüber der Kontrolle gehemmt ist. Das gleiche gilt auch für die Katalase-Aktivität der Salut-Mutanten und korreliert mit den Daten von Mishra et al. (2006), die eine Abnahme der Katalase nach der Schwermetallbehandlung festgestellt haben. Cakmak (2000) vermutet, dass die Aktivität der  $O_2^-$ -empfindlichen Katalase nach der Vermehrung von giftigem aktiven Sauerstoff als Folge der Schwermetallbehandlung gehemmt war. Eine Abnahme der Katalase-Aktivität stellten auch Somashekaraiah et al. (1992), Chaoui et al. (1997) in *Phaseolus vulgaris*, Cao et al. (2004) in *Pteris vittata*, Hegedüs et al. (2001) in Gerste, Verma et al. (2003) in Reis und Zhang et al. (2005) in *Allium sativum*, fest.



Peroxidase ist ein zellwandgebundenes Enzym, aber es ist auch im Cytoplasma nachgewiesen (Mishra et al., 2006). Die Peroxidase, die  $H_2O_2$  bei der Oxidation verschiedener anorganischer und organischer Substrate nutzt (Asada, 1994), zeigt sehr unterschiedliche Effekte bei den Sonnenblumenmutanten von IBL 04. Während einige der IBL 04-Mutanten über geringe POX-Aktivität verfügen, gibt es andere, deren POX-Aktivität bis zu 400% höher als die der Kontrolle ist. Es ist aber keine schwermetallbezogene Korrelation festzustellen. Die Salut-Mutanten zeigten eine geringe oder so hohe POX-Aktivität wie die Kontrolle. In den IBL 04-Mutanten sind sehr hohe und sehr geringe POX-Aktivitäten festgestellt worden. Hegedüs et al. (2001) und Wu et al. (2003) äußerten die Meinung, dass die POX-Zunahme in Gerste betont metallabhängig ist. Je höher die Schwermetallkonzentration und je länger die Behandlung, desto höher ist die Aktivität von POX. Das kann aber im Fall von *H. annuus* nicht eindeutig gesagt werden. Weitere Studien berichten auch über eine Steigerung, eine Abnahme oder keine Veränderung der POX-Aktivität unter Cadmiumstress (Shaw, 1995 in *Phaseolus aureus*; Schützendübel et al., 2001, 2002 in *Pinus silvestris* und *Populus canescens*). Bezüglich der steigenden POX-Aktivität mit steigender Metallkonzentration konnte eine Bestätigung bei der 72stündigen Cd- und As-Behandlung gefunden werden (siehe Tabelle 34). Die POX-Aktivität nach 72 Tagen hingegen ist kaum mehr von den Cd-Konzentrationen beeinflusst und nicht signifikant verändert (siehe Tabelle 45).

Die Ascorbatperoxidase, die in den Chloroplasten und im Ascorbat-Glutathion Zyklus zu finden ist, hat die gleiche Rolle  $H_2O_2$  abzubauen, wie die Katalase in den Mitochondrien und den Peroxisomen. Ein erhöhtes Niveau von APOX konnte nur in zwei IBL 04-Mutanten und in keinen Salut-Mutanten festgestellt werden. Die beiden IBL 04-Mutanten gehören zur Gruppe der -185-04-Sonnenblumenmutanten und zeigten eine bessere Schwermetallaufnahme. Der Rest der IBL 04-Mutanten hat eine sehr geringe APOX-Aktivität. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Verma et al. (2003) im Reis nach einer Pb-Behandlung und nach einer Cu-Toxizität in *Phaseolus vulgaris* (Weckx et al., 1996) berichtet. Laut Asada (1992) sind APOX zusammen mit der Katalase und der Superoxiddismutase Schlüsselenzyme für die antioxidative Abwehr, die die zelluläre Konzentration von  $O_2^-$  und  $H_2O_2$  bestimmt. Weil die SOD- und die Katalase-Aktivitäten der einzelnen IBL 04-Mutanten besser war als die APOX-Aktivität, könnte vermutet werden, dass die Wasserstoffentgiftung effektiver durch Katalase und nicht durch Ascorbatperoxidase stattfindet.

Um ständig Ascorbat zur Verfügung zu haben, wird Ascorbatperoxid auf zwei Wegen rezykliert. Die eine Möglichkeit ist, dass vom Ascorbatperoxid und Wasserstoffperoxid Monodehydroascorbat (MDHA) gebildet wird, das durch die Monodehydroascorbatreduktase zu Ascorbat reduziert wird. Die andere Möglichkeit wäre, die MDHA zu Dehydroascorbat zu disproportionieren und dabei mittels GSH und Dehydroascorbatreduktase Ascorbat zu bilden.

Auf diese Weise wird auch der Reduktionsstatus der Zelle kontrolliert (Potters et al., 2002). Die IBL 04-Mutanten verfügen durchschnittlich über eine 300 bis 600% höhere MDHAR-Aktivität als die Kontrolle. Bei den Salut-Sonnenblumenmutanten konnte eine Erhöhung bis zu 200% festgestellt werden. In den IBL 04- und Salut-Mutanten, bei denen die MDHAR-Aktivität gleich hoch wie die der Kontrollen war, konnte eine geringere DHAR-Aktivität gemessen werden. Aravind et al. (2005) berichten über eine Abnahme der MDHAR- und DHAR-Aktivität als Folge der Cd-Exposition. Sie äußern die Meinung, dass der Schwermetallstress zur Inhibition von MDHAR führt. Danach wird die nicht enzymatische Disproportionierung von MDHA gestartet und es entsteht DHA. Eine sehr hohe DHA-Akkumulation wird als negativer Effekt für den Zellmetabolismus betrachtet (De Gara et al., 2000). Eine hohe MDHAR-Aktivität und demzufolge DHAR-Aktivität könnte eine Strategie für die Inhibition der MDHA-Disproportionierung oder effektive Umwandlung von DHA zu reduziertem Ascorbat sein (Drazkiewicz et al., 2003). Weil die MDHAR-Aktivität, wie in den IBL 04-, so auch in den Salut-Mutanten höher ist als die DHAR-Aktivität, könnte man vermuten, dass das nötige reduzierte Ascorbat auf Kosten von NADPH und nicht auf GSH gebildet wird.

Die GPOX ist eine Alternative zur Ascorbatperoxidase und zur Katalase. Tatsächlich haben die Mutanten, bei denen die GPOX-Aktivität 200% über der Kontrolle liegt, keine APOX- oder teilweise GPOX-Aktivität. Im Fall der Salut-Mutanten ist schwer nachweisbar, welches Enzym genau das Wasserstoffperoxid abbaut, weil keines der erwähnten Enzyme hochreguliert ist. Mishra et al. (2006) berichten über eine gemeinsame Regulation von SOD, APOX und die GPOX. Eine hohe GPOX-Aktivität ist noch nachgewiesen von Chaoui et al. (1997) in *Phaseolus vulgaris*, Lagriffoul et al. (1998) in *Zea mays*, Iannelli et al. (2002) in *Phragmites australis* und Milone et al. (2003) im Weizen. Die als Ersatz auftretende GPOX-Aktivität bei den Mutanten, bei denen eine geringere APOX- oder Katalase-Aktivität gemessen wurde, spricht dafür, dass das Enzym Glutathionperoxidase ein konkurrentes Enzym zur Ascorbatperoxidase beim Abbau von Wasserstoffperoxid ist (Singh et al., 2006). GPOX und APOX könnten als Konkurrenten beim  $H_2O_2$ -Abbau auch in *Typha latifolia* bezeichnet werden (siehe Tabelle 34). Das ist aber bei dem Langzeitexperiment von Rohrkolben mit Cd nicht der Fall, weil die GPOX alleine die Rolle vom  $H_2O_2$ -Abbau übernimmt (siehe Tabelle 45).

Die Glutathionreduktase katalysiert die letzten Reaktionen im Ascorbat-Glutathion Zyklus und im Glutathionperoxidase-Zyklus und ist für das positive Verhältnis von GSH/GSSG verantwortlich (Mobin & Khan, 2007). In den meisten untersuchten IBL 04- und Salut-Mutanten ist die Glutathionperoxidase auf dem Niveau der Kontrolle und bei sieben Proben sogar gehemmt. In Bezug auf die IBL 04-Mutanten ist zu erwähnen, dass die Enzymaktivitäten einen Ausgleich erreicht haben, bei dem immer ein Enzym hochreguliert wird, wenn die restlichen Enzyme des APOX-GSH Zyklus oder des GPOX-Zyklus nicht

überexprimiert wurden. Auf diese Weise kann offenbar eine maximale Entgiftung erzielt werden. Gallego et al. (1996) berichteten auch über eine Abnahme der Glutathionperoxidase in *Helianthus annuus*. Dixit et al. (2001), Verma et al. (2003) haben eine Zunahme von GR in Erbsen und im Reis gemessen.

Das Glutathion in seiner reduzierten und oxidierten Form kann als Signal, das das antioxidative Abwehrsystem unterstützt, funktionieren (May et al., 1998). Glutathion, zusammen mit Ascorbat, sind die Hauptreduktionspuffer in der Zelle. Die Abnahme in ihrem Reduktionstatus kann zum Verlust der Homeostase der Zelle führen (Foyer & Noctor, 2003). Die IBL 04-Mutanten zeigten eine GSH-Konzentration im Bereich der Kontrolle. Einzelne IBL 04-Mutanten der -190-04-Gruppe zeigten sogar GSH-Konzentrationen von 400 bis 1000% höher als die der Kontrolle. Man muss hier die Feldsituation berücksichtigen, in der Bodeneffekte nicht standardisiert sind und der Ernährungszustand der Pflanzen unbekannt ist.

Alle -190-04-Sonnenblumenmutanten, die über bedeutend hohe GSH-Konzentrationen verfügen, zeigten auch höhere GSSG-Konzentrationen. In Bezug auf die Salut-Mutanten ist es erwähnenswert, dass zwei Pflanzen, deren GSH-Konzentrationen sehr gering sind (9/64-19-S und 2/81-19-S) GSSG-Konzentration im Bereich der Kontrolle zeigen. Die restlichen Sonnenblumenmutanten weisen geringere GSH- und GSSG-Konzentrationen auf. Aravind et al. (2005) berichten über eine Abnahme der GSH- und eine Steigerung der GSSG-Konzentration mit zunehmender Cadmiumkonzentration. Die Autoren vermuten, dass das ein Zeichen für oxidativen Stress ist. Nach einer Zinkbehandlung wurde keine Veränderung in der GSH-Konzentration, aber eine Abnahme von GSSG nachgewiesen (Aravind et al., 2005). Die IBL 04- und Salut-Mutanten wurden auch einer kombinierten Schwermetallbehandlung ausgesetzt. Das macht die vorliegenden Ergebnisse mit den von Aravind et al. (2005) vergleichbar. Es könnte vermutet werden, dass Zink die höhere GSH-Konzentration durch die Regulation der Biosynthese von GSH reguliert (Cakmak, 2000; Mishra et al., 2006). Über ein unterschiedliches Niveau der GSH-Erschöpfung berichten weiter Rauser et al. (1991) im Mais, De Vos et al. (1992) im *Silene cucubalus* und Gallego et al. (1996) in Sonnenblumen. Laut Rügsegger et al. (1990) muss Glutathion weiter für die Phytochelatinsynthese gespeichert werden. Das kann sein hohes Niveau nach der Cadmiumbehandlung erklären. Es gibt auch andere Studien, die eine Steigerung oder keine Veränderung in dem Niveau von GSH festgestellt haben (Gupta et al., 1995; Gupta et al., 1998; Schat et al., 2002). Das frei verfügbare GSH könnte zu wenig sein um eine Abwehr gegen den oxidativen Stress bei hohen Schwermetallkonzentrationen leisten zu können, was zu oxidativem Stress führen kann (Mishra et al., 2006). Chen et al. (1994) vermuten, dass eine hohe GSH-Konzentration ein Ausdruck für die Schwermetalltoleranz der Pflanze sein könnte.

Die erhöhten GSH-Konzentrationen können auch zur Transkription anderer Abwehrgene, wie zum Beispiel die Glutathion S-Transferasen, führen (Schröder et al., 2002). Um die Hochregulation von GSTs nachweisen zu können, werden unterschiedliche Modellsubstrate verwendet. Die Modellsubstrate führten bei den IBL 04-Mutanten zu einer Abnahme der GST-Induktion in folgender Reihenfolge: Fluorodifen, CDNB, NBoC, NBC, DCNB. Vierzehn von 22 untersuchten IBL 04-Mutanten zeigten eine GST-Induktion für das Substrat Fluorodifen und nur eine Mutante bei dem Substrat DCNB. Die IBL 04-Mutanten, die eine GST-Aktivität für die Substrate CDNB und NBC zeigten, haben auch eine Induktion für das Herbizid Fluorodifen bewiesen. Die GST-Aktivitäten der Salut-Mutanten sind nicht oder nur teilweise mit denen der IBL 04-Mutanten zu vergleichen. In den Salut-Mutanten nimmt die GST-Aktivität in folgender Reihenfolge ab: DCNB, CDNB, NBC, NBoC und Fluorodifen. Beim letzten zeigte keine der Mutanten eine Induktion der GSTs. Hier ist die GST-Aktivität in Bezug auf DCNB und Fluorodifen beim Vergleich von den IBL 04- und die Salut-Mutanten verdreht. Es gibt aber eine Salut-Mutante mit sehr hoher GST-Aktivität für alle Modellsubstrate, außer Fluorodifen: 2/81-19-S. Die Mutante 10/55-19-S hingegen zeigte minimale GST-Aktivität für das Substrat DCNB. Alle diese unterschiedlichen Effekte, bezüglich der GST-Aktivität, weisen darauf hin, dass es in den Sonnenblumen unterschiedliche GST-Isoformen gibt, die unterschiedlich unter Metallstress und eingesetztem Modellsubstrat aktiviert werden können (Schröder et al., 2002). Mars (1996) vermutet, dass eine Verbindung zwischen dem oxidativen Stress und der GST-Induktion durch die reaktiven Sauerstoffspezies vorhanden sei. Die GST könnte an der Detoxifizierung der Produkte, die nach der Schwermetallattacke entstanden sind, beteiligt sein (Schröder et al., 2002). Laut Aravind et al. (2005) spielt die GST eine aktive Rolle bei der Detoxifizierung und ist als GST-mRNA sehr schnell bei oxidativem Stress verfügbar. In der gleichen Studie wird erwähnt, dass die GST-Induktion nach der Cadmiumbehandlung sehr gering ist. Das limitiert die Rolle der GST in Cd behandelten Pflanzen. Andererseits nehmen GSTs aktiv an der Detoxifizierung endogen entstandener elektrophiler Substanzen durch Lipidperoxidation und oxidative Degradation von Nukleinsäuren teil, besonders durch ihre Konjugation mit diesen Substanzen, um sie als weitere Schadensverursacher zu eliminieren (Foyer et al., 2001; Nagalakshmi et al., 2001).

### **4.3 *Nicotiana tabacum***

In den Feldversuchen der Firma PHYTOTECH (Schweiz) waren außer den Sonnenblumenmutanten unterschiedliche Tabakklone untersucht worden, die nicht nur dem Schwermetallstress ausgesetzt waren, sondern auch unterschiedlich gedüngt wurden. Für die Düngungsreihen wurden Ammoniumsulfat und Ammoniumnitrat in Konzentrationen von 1, 1,5 und 2mal, die höher als in der landwirtschaftlichen Praxis verwendeten Düngerkonzentra-

tionen waren, eingesetzt, um zu testen, ob die Pflanzen dann besser wachsen und Schwermetalle akkumulieren würden. Wieder wurde in der vorliegenden Arbeit nach auffälligen Veränderungen der Pflanzen unter Stress gesucht.

In Abhängigkeit von den Pflanzenspezies, der Entwicklungsphase und dem Pflanzenorgan kann die Nitratkonzentration Auswirkungen auf das optimale Wachstum der Pflanze haben. Wenn die Nitratzugabe suboptimal ist, verzögert sich das Wachstum, mobilisiert sich das Nitrat in den vollentwickelten Blättern und wird an die Orte des neuen Wachstums verlegt. In solchen Fällen wird auch ein erhöhtes Blatt/Wurzeln-Verhältnis beobachtet. Es könnten auch Veränderungen in der Blattmorphologie, wie z.B. in der erhöhten Länge und Breite aber auch eine Abnahme der Blattdicke festgestellt werden. Die ausgezählten morphologischen Veränderungen bewirken auch die Photosynthese (Marschner, 1995).

Horvath et al. (1996) und Caspi et al. (1999) äußerten die Meinung, dass die Chlorophyllabnahme als Hinweis für schwermetallinduzierte Schäden benutzt werden kann. Bei ihren Untersuchungen in der Gerste wurde festgestellt, dass mit zunehmender Cd-Konzentration eine Inhibition von Chlorophyll nachzuweisen war. Ähnliche Effekte wurden auch von Mishra et al. (2006) in *Bacopa monnieri* festgestellt. In den untersuchten Tabakklonen, die mit 1AN + 1AS; 1,5AN + 1,5AS; 2AS oder 2AN gedüngt wurden, konnten ziemlich genau die gleichen Pigmentkonzentrationen festgestellt werden. Es kann aber nicht eindeutig behauptet werden, welche der Düngungsvariationen zur besten Erhaltung der Pigmente geführt hatten, weil andere Tabakkclone, bei denen der gleiche Dünger ausgebracht wurde, sich niedrigere Chlorophyll- und Carotinoidkonzentrationen gezeigt haben. Das a/b-Verhältnis liegt bei allen Klonen zwischen 2,5 und 3. Beim Chlorophyll/Carotinoid-Verhältnis sind größere Schwankungen festgestellt worden. Es gibt aber keinen bestimmten Tabakklon und keine bestimmte Düngerkonzentration, die ein ausgeprägt höheres oder niedrigeres Verhältnis zur Folge hatte.

Bei den Untersuchungen konnte keine direkte Verbindung zwischen den erforschten Tabakklonen und den auf dem Feld aufgebrauchten Düngern gefunden werden. Keines der Enzyme hatten seine Funktionen durch die Düngerausbringung verbessert. Es konnte ebenfalls keine negative Korrelation zwischen Ammoniumsulfat und Ammoniumnitrat einerseits und der Metallaufnahme und den Enzymaktivitäten andererseits festgestellt werden.

Im Gegensatz zu den Speicherlipiden und Ölen ist die Lipidkonzentration in den grünen Blättern eng mit der Stickstoffzugabe verbunden (Beringer, 1966). In den Blättern sind die meisten Lipide Galactolipide, die als strukturelle Komponente der Chloroplasten funktionieren. Deswegen führt eine Erhöhung der Proteinsynthese und Chloroplastenbildung zu einer Zunahme der Lipidkonzentration in den Blättern und weiter zur Zunahme der Chloroplastenbestandteile wie Chlorophyll und Carotinoide (Schulze, 1957).

Wenn die Pflanzen Stress, wie Luftverschmutzung, Dürre, Temperatur, Licht, Schwermetalle, Übersalzung oder Nährstofflimitierung ausgesetzt werden, wird oxidativer Stress ausgelöst (Benavides et al., 2005). Die aktiven Sauerstoffspezies wurden in den Chloroplasten und in den Peroxisomen freigesetzt, was letztlich zur Lipidperoxidation führt (Mishra et al., 2006). Dabei sind gerade die ungesättigten Fettsäuren zur Bildung von Lipid-Radikalen und reaktiven Aldehyden prädestiniert (Reinheckel et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit zeigten zwei der BAG-Tabakkclone eine wesentlich höhere Malondialdehyd-Konzentration als die Gesamtheit der restlichen Tabakkclone. Die allerhöchste Malondialdehyd-Konzentration konnte in einem ungedüngten Tabakklon gemessen werden (1/NBCu 10-4F1 WT). Der mit 2AN gedüngte FoP-Tabakklon zeigte die niedrigste Malondialdehyd-Konzentration. Insgesamt verfügen die FoP-Tabakkclone über eine höhere Malondialdehyd-Konzentration als die BAG-Tabakkclone. Das ist ein eindeutiger Hinweis auf Stressreaktion.

Die Messung der SOD-Enzymaktivität in den unterschiedlich behandelten Tabakklonen zeigte, dass die NBCu 10-8 F1-Tabakkclone von BAG die höchste SOD-Aktivität haben. Nach der Düngung von 2AN und 1AN + 1AS wiesen die erwähnten Tabakkclone eine zwischen 50% und 70% höhere SOD-Aktivität auf. Die unbehandelten Tabakkclone sowie die -10-4 F1-Tabakkclone der BAG zeigten eine SOD-Aktivität so hoch wie die Ausgangstabakkclone 1/BAG/2AS. Die Düngung mit verschiedenen Konzentrationen bei den Tabakklonen von FoP führte zu keiner wesentlichen Steigerung der SOD-Aktivität. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Pflanzen von BAG auf den erhöhten Stress reagieren.

Interessanterweise konnten in den oben erwähnten Tabakklonen, deren SOD-Aktivität gestiegen war, auch eine höhere Aktivität des Enzyms Katalase gemessen werden. Die NBCu 10-8 F1-Tabakkclone zeigten nach gemischter Düngung eine bis zur 12fachen Steigerung der Katalase-Aktivität. Der Mutterklon von FoP und die Tabakkclone 2/NFCu 7-19 F1 2AN und 1,5 AN + 1,5 AS hatten aber auch sehr hohe Aktivitäten für die Katalase.

Die Radikale des Superoxids, des Wasserstoffperoxids und die Hydroxylradikale sind, zusammen mit dem Singulett-Sauerstoff, die vier wichtigsten Sauerstoffspezies, die in der Pflanze produziert werden (Smirnoff, 1993). Um diese gefährlichen Stoffe zu deaktivieren, haben die Pflanzen das Antioxidantensystem entwickelt (Smirnoff, 1993; Zhang & Kirham, 1994). An diesem System sind außer den Carotinoiden und den Tocopherolen auch die Enzyme SOD, Katalase, APOX, DHAR und GR beteiligt (Gallego et al., 1996; Verma et al., 2003). Die SOD und die Katalase sind von Monk et al. (1989) als enzymatische Abwehrmechanismen gegen Reaktionen an der Peroxidation definiert. Die SOD, die in ihrem reaktiven Zustand  $H_2O_2$  bildet, zeigte bereits eine erhöhte Aktivität bei steigendem Salzgehalt in Soja, nach Wasserstress im Weizen, Cd- und Pb-Stress im Reis und in Erbsen (Comba et al., 1998; Baisak et al., 1994; Shah et al., 2001; Malecka et al., 2001). Die Katalase baut das

Wasserstoffperoxid zu Wasser und Molekularsauerstoff um (Verma et al., 2003). Die gestiegene SOD-Aktivität, die für die erhöhte Produktion von Wasserstoffperoxid verantwortlich ist, kann in Verbindung mit der höheren Katalase-Aktivität gesetzt werden, die dieses Wasserstoffperoxid abbauen muss. Das lässt auch die erhöhten SOD- und Katalase-Enzymaktivitäten in den gleichen Tabakklonen von BAG und FoP erklären. Anscheinend führten die höheren Sulfat- und Nitrat- Konzentrationen zu der Aufnahme von mehr Schwermetallen, die die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies verursacht haben. Es gibt zwei Tabakklone, bei denen die SOD und die Katalase höhere Enzymaktivitäten zeigten. Diese Tabakklone 1/NBCu 10-8 F1 und 3/NBCu 10-8 F1 wurden mit 1AN+1AS gedüngt und verfügten über die höchste Biomasse sowie über die höchste Metallaufnahme. Weil die höhere Biomasse die erhöhte Metallaufnahme bedingte, sollten diese Tabakklone nicht automatisch als Beispiele für bessere Entgiftung dienen.

Die Aktivität der Peroxidase ist in den Tabakklonen der BAG um das 0,5fache höher als bei den FoP-Tabakklonen. Die niedrigste POX-Aktivität zeigten die NBCu 10-8 F1 Tabakklone nach der Behandlung mit gemischter Düngung. Unter den BAG-Tabakklonen haben die -10-4 F1-Tabakklone stets höhere POX-Aktivität. Es gibt einen erwähnenswerten Unterschied zwischen den POX-Aktivitäten in mit Ammoniumsulfat und mit Ammoniumnitrat behandelten Tabakklonen. Der Tabakklon 1/BAG 2AS, der über die gleiche Biomasse und Metallkonzentration wie der Tabakklon 4/NBCu 10-4 F1 2AN verfügt, hat eine mit ungefähr 0,3  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein niedrigere POX-Aktivität. Die APOX-Enzymaktivität aller Proben ist wesentlich höher als die POX-Aktivität. Der Unterschied zwischen der höchsten POX-Aktivität und der höchsten APOX-Aktivität ist 5fach. Die APOX-Aktivität der FoP-Tabakklonen ist im Durchschnitt höher als die der BAG-Tabakklone. Der gleiche Unterschied, der schon bei der POX betont wurde, tritt bei der APOX-Aktivität noch mal auf. Der Tabakklon 1/BAG 2AS hat eine mit ungefähr 1,4  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein niedrigere APOX-Aktivität als der Tabakklon 4/NBCu 10-4 F1 2AN. Das spricht vielleicht im konkreten Fall dafür, dass die Art der Dünger eine Auswirkung auf die Peroxidasenaktivität im Tabak haben könnte.

Die Tabakklone, die auf dem Feld mit Ammoniumsulfat und Ammoniumnitrat behandelt wurden, zeigten ähnlich hohe Aktivitäten für das Enzym Monodehydroascorbatreduktase wie für die Peroxidase. Der unbehandelte NBCu-Tabakklon hatte dabei die höchste MDHAR-Enzymaktivität aller NBCu-Proben. In den NFCu 7-15 F1 FoP-Tabakklonen konnte die höchste MDHAR-Aktivität gemessen werden. Ähnlich wie bei den anderen Enzymen, die am antioxidativen Zyklus beteiligt sind, ist in Bezug auf die MDHAR-Aktivität kein wesentlicher Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungen festgestellt worden. Diese Ergebnisse sind mit den Messungen in *Typha latifolia* im Langzeitexperiment vergleichbar, wo auch keine ausgeprägte MDHAR-Aktivität gemessen werden konnte.

Die DHAR-Aktivität der untersuchten Tabakkclone ist zwischen 20 und 50mal höher als die MDHAR-Aktivität. Die höchste DHAR-Aktivität der BAG wurde bei dem Tabakklon NBCu 10-8 F1 1AN + 1AS gemessen, der über hohe Biomasse und Metallaufnahme verfügt. Die gleiche Größe hat auch die DHAR im FoP-Tabakklon NFCu 7-19 F1, der mit der doppelten Menge an Ammoniumnitrat behandelt wurde. Der unbehandelte BAG-Tabakklon zeigte die gleiche DHAR-Aktivität wie der mit 2AN behandelte NBCu 10-8 F1-Tabakklon. Die beiden Tabakkclone verfügen dabei über die gleiche Biomasse und Metallaufnahmekapazität. Bei den FoP-Tabakklonen könnte über eine Steigerung der DHAR-Aktivität mit der Erhöhung der Ammoniumnitrat-Düngerkonzentration gesprochen werden. Es ist aber anzumerken, dass dabei auch die Biomasse und die Metallaufnahme erhöht sind. Diese Ergebnisse können nicht mit denen von *Typha latifolia* verglichen werden, weil die DHAR-Aktivität bis zur höchsten Cd-Konzentration nicht aktiviert wurde. Andererseits haben reduzierte Biomasse und höhere Metallaufnahme nicht das Einschalten des Enzyms in den *Typha latifolia*-Blättern verhindert. Eine ausgeprägte GPOX-Aktivität konnte in den BAG- und FoP-Tabakklonen gemessen werden, die mit gemischter Düngung behandelt wurden und über hohe Biomasse und Metallaufnahmekapazität verfügen. In den erwähnten Tabakklonen wurden zwischen 5 und 17fache Steigerungen der GPOX-Aktivität gemessen. Der unbehandelte NBCu 10-4 F1-Tabakklon zeigte eine sehr niedrige GPOX-Aktivität bei niedriger Biomasse und Metallaufnahme. Nur in einem NFCu-Tabakklon konnte eine Steigerung der GPOX nach der doppelten Ausbringung von Ammoniumnitrat festgestellt werden. Dabei verfügt der erwähnte Tabakklon über die niedrigste Biomasse und verhältnismäßig niedrige Metallaufnahme, was dafür spricht, dass niedrigere Schwermetallkonzentrationen auch Reaktionen von GPOX auslösen können.

Die höchsten Glutathionreduktase-Aktivitäten sind um das 10fache niedriger als die Aktivität der GPOX. Ähnlich wie bei der Glutathionperoxidase konnte in den BAG- und FoP-Tabakklonen mit gemischtem Dünger die höchsten GR-Aktivitäten gemessen werden. Der unbehandelte BAG-Tabakklon zeigte eine wesentliche Steigerung seiner GR-Aktivität im Vergleich zu der GPOX-Aktivität. Insgesamt liegen die GR-Aktivitäten in allen Tabakklonen sehr nahe beieinander. Erwähnenswert ist aber, dass einige der Tabakkclone gleich hohe beziehungsweise gleich niedrige GR-Aktivität wie andere Tabakkclone haben, obwohl sie über unterschiedliche Biomasse und Metallaufnahme verfügen. Es ist dabei zu schlussfolgern, dass hier die Düngung eine wesentliche Rolle gespielt hat. Die AS-Düngung hat die GR-Aktivität bei höherer Metallaufnahme nach unten gedrückt und die AN-Düngung bei niedrigerer Metallaufnahme zum höheren Einsatz der GR geführt. Bei der gemischten Düngung stehen Metallaufnahme, Biomasse und GR-Aktivität nicht in direkter Verbindung miteinander.



Alle Klone, in denen die Düngerausbringungen zur Erhöhung oder Minderung der GSH-Konzentrationen geführt haben, widerspiegeln den gleichen Effekt wie auch bei ihrer GSSG-Konzentration. Die doppelte Menge an Ammoniumnitrat hat den gleichen Effekt in den BAG- und in den FoP-Tabakklonen ausgelöst. Die Klone, die diesen Behandlungen unterzogen wurden, zeigten die höchsten GSH- und GSSG-Konzentrationen. Interessant ist auch, dass der unbehandelte Klon von BAG so hohe GSH- und GSSG-Konzentrationen wie die oben erwähnten Proben hatte, nachdem er mit 2AN behandelt worden war.

Die GSH- und die GSSG-Gehalte schienen nur bei den FoP-Tabakklonen düngerabhängig zu sein. Die doppelte Ausbringung an AS und AN führte bei der gleichen Biomasse und Metallaufnahme zu den gleichen GSH- und GSSG-Konzentrationen. Das war bei den FoP-Tabakklonen nicht der Fall. Bei doppelter AS-Düngung hatten die GSH-GSSG-Konzentrationen bei höherer Metallaufnahme und Biomasseproduktion zu den gleichen Effekten geführt, wie die AN bei niedrigerer Biomasse und Metallaufnahme. Die Ergebnisse nach der AS-Düngung sind mit denen von *T. latifolia* im Kurzzeitexperiment vergleichbar, wo höhere Metallkonzentrationen auch zur Steigerung der GSH- und GSSG-Konzentration geführt haben.

Die Glutathion S-Transferasen aller Tabakklone zeigten Aktivität für alle untersuchten Modellsubstrate. Die höchste Induktion konnte in Bezug auf das Modellsupstrat NBoC gemessen werden. Die GST-Aktivität nimmt in folgender Reihenfolge ab: NBoC, NBC, CDNB, Fluorodifen, DCNB. Die gemischten Düngerausbringungen haben erneut zu einer wesentlichen Steigerung der Aktivität geführt. Die NBoC- und NBC-GST-Induktionen sind gerade bei den gemischten Düngungen am höchsten. Der unbehandelte BAG-Tabakklon hat für die Modellsubstrate NBoC und NBC eine erhöhte GST-Induktion. Die CDNB-GST-Aktivität aller Tabakklone liegt eng aneinander und es gibt keine auffallend höhere oder niedrigere GST-Aktivität in Bezug auf einzelne Tabakklone. Diese Ergebnisse sind nicht mit denen von *T. latifolia* zu vergleichen, weil DCNB und NBC dort die höchsten Enzymaktivitäten zeigten. Das ist eine Bestätigung, dass nach multipler Belastung unterschiedliche GST-Isoformen bei *Typha* und bei Tabak eingeschaltet werden, um die organischen Schadstoffe entgiften zu können.

#### 4.4 Fazit

Wenn die Superoxiddismutase und die Katalase als antioxidative Abwehrmechanismen eingeschaltet werden, hat auch der Abbau des Superoxidradikals und des Wasserstoffperoxids begonnen. Damit sind die ersten Schritte zur Einschaltung der Kaskade der Stressenzyme getan. Die Hemmung der Aktivität der Glutathionperoxidase könnte bedeuten, dass diese Enzyme als Auslöser der Kaskade zur Abwehr von oxidativem Stress nach Schwermetalleinfluss wirken (Verma et al., 2003). Die Peroxidase und die Ascorbatperoxidase sind zwei weitere Enzyme, die das Abwehrsystem der Pflanzen unterstützen und als Stressenzyme

bekannt sind (Gaspar et al., 1991). Über eine Induktion der POX-Aktivität nach unterschiedlichen Stressreaktionen in Pflanzen ist berichtet worden (Verma et al., 2003). Das erhöhte Niveau von GPOX und POX ist als potenzieller Biomarker von steigender Stressintensität referiert worden (Shah et al., 2001; Mittal et al., 1991). Die Ascorbatperoxidase und die Glutathionreduktase sind Teil des Ascorbat-Glutathion Zyklus, der die Zelle in reduziertem Zustand halten soll (Asada, 1992). Dabei sorgen sie auch dafür, dass das in den Chloroplasten und anderen Zellorganellen produzierte Wasserstoffperoxid neutralisiert wird. Es scheint, dass in den Tabakklonen, die auf schwermetallbelasteten Böden wuchsen und mit unterschiedlichen Düngungskombinationen behandelt wurden, der Abbau des Wasserstoffperoxids an zweiter Stelle nach der Katalase auch durch APOX und GR umgewandelt wird. Die Glutathionreduktase ist auch für die Reduktion des oxidierten Glutathion in seiner reduzierten Form verantwortlich. In seinem reduzierten Zustand ist Glutathion an der reduktionsregulierenden Reaktionen der Zelle beteiligt (Sanchez-Fernandez et al., 1997). Grant et al. (1996) überlassen dem Glutathion die wichtige Rolle in dem Anwehrmechanismus gegen oxidativen Stress der Pflanzen und anderen Organismen. Als wichtigste wasserlösliche Antioxidantien-Komponente der Pflanzenzellen bewirkt GSH die enzymatische Reduktion von noch mehr Radikalen und Oxidantien als die Glutathionreduktase, die die NADPH benutzt, um GSSG in GSH zu reduzieren (Noctor & Foyer, 1998). Die hohe Aktivität der GR kann als Ausdruck der erhöhten Teilnahme der GR an der GSSG- zur GSH-Umwandlung angenommen werden. Auf diese Weise werden die GSH/GSSG-Verhältnisse und die Gesamtkonzentration von GSH nach dem Schwermetallstress reguliert (Noctor & Foyer, 1998).

Ein anderes Enzym, das an der Regulation des GSH/GSSG-Verhältnisses beteiligt ist, ist die Dehydroascorbatreduktase, deren Aktivität auch enorm gestiegen war. Das kann zur Vermutung führen, dass DHAR direkt an dem Ausgleich der GSH-Konzentration beteiligt ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung lassen schlussfolgern, dass unter Schwermetallstress in vielen Pflanzen nach der Einschaltung der SOD die hauptsächlichsten Entgiftungsenzyme mit der Glutathion-Regulation verbunden sind. Damit kann es in den belasteten Geweben offenbar zu Konflikten bezüglich der Entgiftung von organischen Schadstoffen kommen. Eindeutig wird der Reparatur von Schwermetalleffekten und der Sequestrierung von Schwermetallen der Vorrang gegeben, während die normalerweise unter Einzelstoffeinwirkung beobachteten Induktionen der Glutathion S-Transferasen unter diesen Umständen ausbleiben. Die chemische Mutagenese, wie sie bei den Sonnenblumen und Tabakklonen durchgeführt worden war, kann hier zu neuen Expressionsmustern führen, die kurzzeitig die Entgiftung beider Substanzklassen erlaubt. Für eine Anwendung in der Phytoremediation haben diese Befunde die Konsequenz, dass nicht jede Pflanzenart gleich gut geeignet sein wird, Schwermetalle oder organische Belastungen zu remediieren und dass

bei komplexen Belastungssituationen auf gemischte Pflanzenbestände zurückgegriffen werden sollte, auch wenn dies praktisch schwieriger zu handhaben ist. Es bleibt aber die beachtenswerte Feststellung, dass die Phytoremediation eine ernstzunehmende grüne Technologie zur Verbesserung unserer Umwelt darstellt, deren Ergebnisse noch verbessert werden könnten, wenn weitere Forschungsergebnisse vorgelegt werden, die helfen, den komplexen Schadstoffmetabolismus und seine Regulation zu verstehen.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen von Schwermetallen auf *Typha latifolia* über kurze und lange Zeiträume mit unterschiedlichen Konzentrationen zu quantifizieren. Die erworbenen Ergebnisse sollten Hinweise für die Verwendung von *T. latifolia* in der Phytoremediation liefern und insbesondere die Situation der Pflanze unter multipler Belastung mit Schwermetallen und organischen Schadstoffen beleuchten.

Die Befunde sollten durch ergänzende Untersuchungen in Mutanten von *Helianthus annuus* und *Nicotiana tabacum*, die als Metallakkumulatoren bekannt sind, erhärtet werden. Wichtiger Schwerpunkt war dabei, die Aktivität der am Halliwell-Asada Zyklus beteiligten Enzyme zu untersuchen, die für das Überleben der Pflanzen unter Stress wichtig sind. Solche Experimente sind bislang für diese Pflanzenarten und unter diesen Bedingungen nicht beschrieben worden.

Die vorliegende Arbeit kommt zu folgenden Schlussfolgerungen:

- Nach kurzzeitiger Schwermetallbehandlung von *T. latifolia* sind die Enzyme Katalase, Peroxidase, Ascorbatperoxidase und Monodehydroascorbatreduktase in den Blättern und die Glutathionperoxidase in den Blättern und den Rhizomen hochreguliert worden.
- Die Morphologie der *T. latifolia*-Blätter und Rhizome blieb während dieses Zeitraums unverändert.
- Nach 72tägiger Behandlung mit Cd waren Glutathionreduktase, Glutathionperoxidase und der Superoxiddismutase in den Rhizomen und in den Blättern von *Typha latifolia* induziert. Katalase, Peroxidasen und Monodehydroascorbatreduktase, die im Kurzzeitexperiment eine wichtige Rolle gespielt hatten, wurden hingegen gehemmt.
- Durch verstärkte Glutathionbiosynthese können sich die Pflanzen vor den toxischen Wirkungen der reaktiven Sauerstoffspezies besser schützen. Die Charakterisierung des Cadmiumeinflusses auf die Phytochelatinbildung steht noch aus.
- Die äußerlichen Merkmale der *T. latifolia*-Pflanzen änderte sich erst nach ca. 40 Tagen wesentlich, wobei die Blattzahl weniger als vermutet reduziert wurde und die Blattfläche bei der höchsten Cd-Konzentration signifikant reduziert war.
- Nach der Langzeit-Behandlung konnte keine signifikante Abnahme der Nettphotosynthese, der Transpiration und der stomatären Leitfähigkeit festgestellt werden, was auf die gute Entgiftungsleistung von *T. latifolia* zurückzuführen ist.
- Cadmiumstress bewirkte eine Induktion der Glutathionkonjugation von DCNB und NBC, die bislang noch nicht in der Literatur beschrieben war. Eine genauere Charakterisierung einzelner GST-Untereinheiten wurde qualitativ mittels HPLC durchgeführt und resultierte in der Entdeckung mehrerer neuer GST-Untereinheiten.

- In Bezug auf *Helianthus annuus* und *Nicotiana tabacum* ist auch eine hohe Aktivität der Enzyme des Halliwell-Asada Zyklus sowie der Katalase nachgewiesen worden.
- In diesen Pflanzen ist die GST-Induktion vom Typ und der Menge an Dünger und weniger von der Metallaufnahme abhängig.
- Dabei ist in beiden Spezies unter dem Einfluss der vorhandenen Schwermetalle, insbesondere die Konjugation des Herbizids Fluorodifen, durch GST induziert worden.
- Die vorliegende Arbeit belegt, dass unterschiedliche Pflanzenarten moderate bis hohe Schwermetallbelastungen ertragen können und zur Entgiftung entstehender reaktiver Sauerstoffspezies vorrangig glutathionabhängige Stoffwechselwege nutzen. Die gleichzeitige Entgiftung organischer Kontaminanten ist dagegen inhibiert, bzw. nur auf wenige spezielle Substanzen begrenzt.
- Multiple Belastungsszenarien werden wohl nur von wenigen Arten ertragen. Hier kann die chemische Mutagenese und Selektion von Klonen für die Zukunft tolerante Mutanten erzeugen, die für den Einsatz in der Phytoremediation besser geeignet sind.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aichele D, Schwegler HW. 2004. Die Blütenpflanzen Mitteleuropas. Kosmos, Stuttgart, pp: 163-165
- Aoyama K, Matsubara K, Kobayashi S. 2006. Aging and oxidative stress in progressive supranuclear palsy. *Eur. J. Neurol.*, 1, 89-92
- Aravind P, Prasad MNV. 2005. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Phys. and Biochem.*, 43, 107-116
- Asada K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants. Foyer CH, Mullineaux PM (eds), CRC Press, Boca Raton, FL, pp: 77-104
- Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Plant Physiol.*, 85, 235-241
- Baisak R, Rana DA, Acharya PBB, Kar M. 1994. Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. *Plant Cell Physiol.*, 35, 489-495
- Baker AJM. 1981. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.*, 3, 643-654
- Baker AJM, Brooks RR. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1, 81-126
- Baker CJ, Orlandi EW. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 33, 299-231
- Bañuelos GS, Ajwa HA, Mackey B, Wu LL, Cook C, Akohoue S, Zambruski S. 1997. Evaluation of different plant species used for phytoremediation of high soil selenium. *J. Environ. Qual.*, 269, 639-646
- Bañuelos GS, Ajwa HA, Wu LL, Zambruski S. 1998. Selenium accumulation by *Brassica napus* grown in Se-laden soil from different depths of Kesterson reservoir. *J. Soil Contam.*, 7, 481-496

- Barceló J, Poschenrieder C. 2003. Phytoremediation: principles and perspectives. *Contributions to Science*, 2, 333-344
- Barceló J, Poschenrieder C. 1999. Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. In: *Heavy metal stress in plants. From molecules to ecosystems*. Prasad MNV, Hagemeyer J (eds), Springer Verlag, Berlin, pp: 132-134
- Baszynski T, Wajda L, Krol M, Wolinska D, Krupa Z, Tukendorf A. 1980. Photosynthetic activities of cadmium treated tomato plants. *Physiol. Plant.*, 48, 365-370
- Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17, 21-34
- Beringer H. 1966. Einfluss von Reifegrad und N-Düngung auf Fettbildung und Fettsäurezusammensetzung in Haferkörner. *Pflanzenernähr. Düngung. Bodenkun.*, 114, 17-127
- Berkau C. 1990. Untersuchungen zur Glutathion S-Transferase-Aktivität in Nadelblätter von *Picea abies*. Diplomarbeit, Uni Köln
- Beyer WF, Fridovich I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.*, 161, 559-566
- Beyer WF, Imlay J, Fridovich I. 1991. Superoxide dismutase. *Prog. Nucl. Acid. Res.*, 40, 221-253
- Blakemore LC, Searle PL, Daly BK. 1987. Methods of chemical analysis of soils. In: *New Zealand Soil Bureau Scientific Report 80*, pp: 71-76
- Blaylock MJ, Huang JW. 2002. Phytoextraction of metals. In: *Phytoremediation of toxic metals. Using plants to clean up the environment*. Raskin I, Ensley BD (eds), New York. Wiley, pp: 641-669
- Blinda A, Abou-Mandour A, Azarkovich M, Brune A, Dietz KJ. 1996. Heavy metal-induced changes in peroxidase activity in leaves, roots and cell suspension cultures of *Hordeum vulgare* L. In: *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Obinger C, Burner U, Ebermann R, Penel C, Greppin H (eds), University of Geneva, 1996, pp: 374-379
- Booth J, Boyland E, Sims P. 1961. An enzyme from rat liver catalyzing conjugations with glutathione. *Biochem. J.*, 79, 516-524

- Bowler C, Van Montague M, Inzé D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43, 83-116
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-255
- Brooks RR, Chambers MF, Nicks LJ. 1998. Phytomining. *Trends in Plant Science*, 3, 359-362
- Burton GW, Ingold KU. 1984.  $\beta$ -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224, 569-573
- Cakmak I. 2000. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol.*, 146, 185-205
- Cakmak I, Marschner H. 1988. Enhanced superoxide radical production in roots of zinc-deficient plants. *J. Expt. Bot.*, 39, 1449-1460
- Cao X, Ma LQ, Tu C. 2004. Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Environ. Pollut.*, 128, 317-325
- Caspi V, Droppa M, Horvath G, Malkin S, Marder JB, Raskin VI. 1999. The effect of copper on chlorophyll organization during greening of barley leaves. *Photosynth. Res.*, 62, 165-174
- Chaney RL, Li YM, Brown SL, Homer FA, Malik M. 2000. Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: approaches and progress. In: *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Terry N, Bañuelos G (eds), Boca Raton: Lewis, pp: 129-158
- Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal MH, El Ferjani E. 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*, 127, 139-147
- Chawla G, Singh J, Viswanathan PN. 1991. Effect of pH and temperature on the uptake of cadmium by *Lemna minor* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 84-90
- Chen J, Goldsbrough PB. 1994. Increased activity of  $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthase in tomato cells selected for cadmium tolerance. *Plant Physiol.*, 106, 233-239
- Chien HF, Wang JW, Lin CC, Kao CH. 2001. Cadmium toxicity of rice leaves is mediated through lipid peroxidation. *Plant Growth Regul.*, 33, 205-213



- Clemens S, Palmgreen MG, Kramer U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Science*, 7, 309-315
- Cobbett CS. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.*, 123, 825-832
- Cobbett CS, May MJ, Howden R, Rolls B. 1998. The glutathione-deficient cadmium-sensitive mutant, *cad 2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in gamma-glutamyl-cysteine synthase. *Plant J.*, 16, 73-80
- Comba ME, Benavides MP, Tomaro ML. 1998. Effect of salt stress on antioxidant defence system in soybean root nodules. *Aust. J. Plant Phys.*, 25, 665-671
- Costa G, Morel JL. 1994. Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. *Plant Physiol. Biochem.*, 32, 561-570
- Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H. 2002. Peroxidases in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*: copper and zinc phytotoxicity: a comparison. *J. Plant Phys.*, 159, 869-876
- Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H. 2000. Biphasic effect of copper on the ascorbate-glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedlings during the early stages of metal assimilation. *Physiol. Plant.*, 110, 512-517
- Daubner D. 2001. Evaluierung des Entgiftungspotentials für organische Schadstoffe von *Phragmites* sp. in Pflanzenkläranlagen Europas. Diplomarbeit, Fachhochschule Wiesbaden
- De Gara L, Paciolla C, De Tullio MC, Motto M, Arrigioni O. 2000. Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. *Physiol. Plant.*, 109, 7-13
- De Vos CHR, Vonk MJ, Vooijs R, Schat H. 1992. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol.*, 98, 853-858
- Dhankher OP, Li Y, Rosen B, Shi J, Salt D, Senecoff JF, Sashti NA, Meagher RB. 2002. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-glutamylcysteine synthase expression. *Nature*, 20, doi: 10.1038/nbt747

- Dixit V, Pandey R, Shyam R. 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J. Exp. Bot.*, 52, 1101-1109
- Dixon DP, Cole DJ, Edwards R. 1998. Purification, regulation and cloning of a glutathione transferase (GST) from maize resembling the auxin – inducible type – III GSTs. *Plant Molecular Biology*, 36, 75-87
- Doke N, Miura Y, Chai H-B, Kawakita K. 1991. Involvement of active oxygen in induction of plant defence response against infection and injury. In: *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*. American Soc. Plant Phys. Pell EJ, Steffen KL (eds), Rockville MD, pp: 84-96
- Drazkiewicz M. 1994. Chlorophyllase: occurrence, functions, mechanisms of action, effects of external and internal factors. *Photosynthetica*, 30, 321-331
- Drazkiewicz M, Skorzynska-Polit E, Krupa Z. 2003. Response of ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Science*, 164, 195-202
- Drotar A, Phelps P, Fall R. 1985. Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Science*, 42, 35-40
- Dushenkov V, Nada Kumar PBA, Motto H, Raskin I. 1995. Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environ. Sci. Technol.*, 29, 1239-1245
- Edwards R, Dixon DP. 2005. Plant glutathione transferases. *Methods in enzymology*, 401, pp: 169-186
- Ekvall L, Greger M. 2003. Effects of environmental biomass-producing factors on Cd uptake in two Swedish ecotypes of *Pinus sylvestris* (L.). *Environ Qual.*, 121, 401-411
- Elstner EF. 1991. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells In: *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*. American Soc. Plant Physiology. Pell EJ, Steffen KL (eds), Rockville M D, pp: 13-25
- Escarre J, Lefebvre C, Gruber W, LeBlanc M, Lepart J, Riviere Y, Delay B. 2000. Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in Mediterranean area: implications for phytoremediation. *New Phytol.*, 145, 429-437
- Ewais EA. 1997. Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds. *Biol. Plant.*, 39, 403-410

- Falbe J, Regitz M. 1996. Römpp Lexikon Chemie. 10. Auflage. Band 1: A-Cl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, pp: 260-261, 466-467, 563-566
- Feduic E, Erdei L. 2002. Physiological and biochemical aspects of cadmium toxicity and protective mechanisms induced in *Phragmites australis* and *Typha latifolia*. J. Plant Physiol., 159, 265-271
- Fischer C. 1997. Glutathion S-Transferasen und Glutathiongehalte in Zellsuspensionkulturen von *Picea abies* (L.) Karst.: Induktionsexperimente mit Schwermetallionen und Metaboliten von Trinitrotoluol (TNT). Diplomarbeit, Technische Universität München
- Förstner U. 1979. Metal transfer between solid and aqueous phases. In: Metall pollution in the aquatic environment. Förstner U, Wittmann GTW (eds), Springer, Berlin Heidelberg New York, pp: 197-270
- Foyer C. 1993. Ascorbic acid. In: Antioxidants in higher plants. Alscher RG and Hess JL. (eds), CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, pp: 31-58
- Foyer CH, Noctor G. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplast, peroxisomes and mitochondria. Physiol. Plant., 119, 355-364
- Foyer CH, Theodoulou F, Derlot S. 2001. The function of inter- and intracellular glutathione transport system in plants. Trends Plant Sci., 6, 486-492
- Frear DS, Swanson HR. 1970. The biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-s-5-triazino) glutathione: partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn. Phytochem., 9, 2123-2132
- Gadallah MAA. 1994. Interactive effect of heavy metals and temperature on the growth and chlorophyll, saccharides and soluble nitrogen contents in *Phaseolus vulgaris*. Biol. Plant., 36, 373-382
- Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. Plant Sci., 121, 151-159
- Galli U, Schuepp H, Brunold C. 1996. Thiols in cadmium and copper treated maize (*Zea mays* L.). Planta, 198, 139-143
- Gardner PR, Fridovich I. 1991. Superoxide sensitivity of *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. J. Biol. Chem., 266, 1478-1483

- Gaspar T, Penel C, Hagege D, Greppin H. 1991. Peroxidase in plant growth, differentiation and development process. In: Biochemical, molecular and physiological aspects of plant peroxidases, Laborzewsky J, Greppin H, Penel C, Gaspar T (eds), University M. Curie, Sklodowska, pp: 249-280
- Gawronski S, Gawronska H. 2007. Plant taxonomy for phytoremediation. In: Advanced Science and Technology for Biological Decontamination of Sites Affected by Chemical and Radiological Nuclear Agents. Marmioli N, Samotokin B, Marmioli M (eds), NATO Science Series, IV. Earth and Environmental Sciences, 75, pp:79-88
- Gekeler W, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH. 1989. Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatin. Z. Naturforsch., 44c, 361-369
- Glass DJ. 1999. US and international markets for phytoremediation. Needham, MA, D. Glass Assoc.
- Götzberger C. 1994. Vergleichende Untersuchungen zum Isoenzymmuster der Glutathion S-Transferase in verschiedenen Nadelbäumen. Diplomarbeit, Universität Ulm
- Gonelli C, Marsili-Libelli S, Baker AJM, Gabrielli R. 2000. Assessing plant phytoextraction potential through mathematical modelling. Int. J. Phytoremediation, 2, 343-351
- Grant CM, Maciver FH, Dawes IW. 1996. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Sacchromyces cerevisiae*. Curr. Gen., 29, 511-515
- Greger M. 2004. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. In: Heavy metal stress in plants. From biomolecules to ecosystems. Second edition. MNV Prasad (edt), Springer, pp: 1-27
- Greger M, Brammer E, Lindberg S, Larsson G, Idestam-Almquist J. 1991. Uptake and physiological effects of cadmium in sugar beet (*Beta vulgaris*) related to mineral provision. J. Exp. Bot., 42, 729-737
- Greger M, Johansson M, Stihl A, Hamza K. 1993. Foliar uptake of Cd by pea (*Pisum sativum*) and sugar beet (*Beta vulgaris*). Physiol. Plant., 88, 563-570
- Greger M, Kautsky L. 1993. Use of macrophytes for mapping bioavailable heavy metals in shallow coastal areas of Stockholm, Sweden. Appl. Geochem. Suppl., 2, 37-43

- Greger M, Kautsky L, Sandberg T. 1995. A tentative model of Cd uptake in *Potamogeton pectinatus* in relation to salinity. *Environ. Exp. Bot.*, 35, 215-225
- Grega M, Landberg T. 1999. Use of willow in phytoextraction. *Int. J. Phytorem.*, 1, 115-123
- Grill E, Winnaker EL, Zenk MH. 1985. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 230, 674-676
- Groudeva VI, Groudev SN, Doycheva AS. 2001. Bioremediation of waters contaminated with crude oil and toxic heavy metals. *Int. J. Miner. Proces.*, 62, 293-299
- Gupta M, Rai UN, Tripathi RD, Chandra P. 1995. Lead induced changes in glutathione and phytochelatin in *Hydrilla verticillata*. *Chemosphere*, 30, 2011-2020
- Gupta M, Tripathi RD, Rai UN, Chandra P. 1998. Role of glutathione and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (l.f.) Royle and *Vallisneria spiralis* L. under mercury stress. *Chemosphere*, 37, 785-800
- Haag-Kerwer A, Schäfer HJ, Heiss S, Walter C, Rausch T. 1999. Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *J. Exp. Bot.*, 50, 1827-1835
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249, 7130-7139
- Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.*, 53, 1-11
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1989. Free radicals in aging and disease. In: Free radicals in biology and medicine. Halliwell B, Gutteridge JMC (eds), Clarendon Press, Oxford, pp: 416-508
- Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Vooijs R, Bookum WMT, Schat H, Meharg AA. 2001b. Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Plant Physiol.*, 126, 299-306
- Hegedüs A, Erdei S, Horvath G. 2001. Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci.*, 160, 1085-1093
- Hertwig B, Steb P, Feierabend J. 1992. Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol.*, 100, 1547-1553

- Herzig R, Nehnevajova E. 2006. Development of systems to improve phytoremediation of metal contaminated soils through improved phytoaccumulation «PHYTAC». Wissenschaftlicher Schlussbericht zu Händen des Bundesamtes für Bildung und Wissenschaft BBW Bern, pp: 85
- Hess D. 1991. Pflanzenphysiologie. 9 Auflage, Ulmer Verlag, Stuttgart
- Hoffmann J, Viedt H. 1998. Biologische Bodenreinigung. Ein Leitfaden für die Praxis. Berlin. Springer, pp: 1- 313
- Hooda PS, Alloway BJ. 1993. Effects of time and temperature on the bioavailability of Cd and Pb from sludge-amended soils. J. Soil Sci., 44, 97-110
- Horst WJ. 1995. The role of apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants: a review. Z. Pflanzenernaehr. Bodenk., 158, 419-428
- Horvath G, Droppa M, Oravec A, Raskin VI, Marder JB. 1996. Formation of the photosynthetic apparatus during greening of cadmium-poisoned barley leaves. Planta, 199, 238-243
- Hu S, Tang CH, Wu M. 1996. Cadmium accumulation by several seaweeds. Sci. Total. Environ., 187, 65-71
- Iannelli MA, Pietrini F, Fiore L, Petrilli L, Massacci A. 2002. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. Plant Physiol. Biochem., 40, 977-982
- Inouhe M. 2005. Phytochelatins. Braz. J. Plant Physiol., 17, 65-78
- Jaenicke L. 1984. Einführung in die Praxis des Biochemikers. Institut für Biochemie Universität zu Köln, Photostelle der Universitäts- und Stadtbibliothek Köln, pp:1-310
- Kabata-Pendias A, Pendias H. 1989. The trace elements in the soils and plants (eds), Florida: CRC Press
- Kaiser WM. 1979. Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. Planta, 145, 377-382
- Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G, Mullineaux P. 1999. Systemic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. Science, 284, 654–657

- Kato M, Simizi AS. 1985. Chlorophyll metabolism in higher plants. VI. Involvement of peroxidase in chlorophyll degradation. *Plant Cell Physiol.*, 26, 1291-1301
- Kiefer M. 2002. Zum antioxidativen Verteidigungssystem bei *Mesembryanthemum crystallinum*. Inauguraldissertation der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
- Knauer K, Behra R, Sigg L. 1997. Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, 33, 596-601
- Kong FX, Hu W, Chao SY, Sang WL, Wang LS. 1999. Physiology responses of the lichen *Xanthoparmelia mexicana* to oxidative stress of SO<sub>2</sub>. *Environ. Exp. Bot.*, 42, 201-209
- Krebs-Hartmann R. 1996. In situ immobilization of heavy metals in polluted agricultural soil – an approach to gentle soil remediation. Diss. ETH N° 11838, Switzerland
- Kröniger W. 1994. Biochemische, entwicklungsphysiologische und ökophysiologische Untersuchungen der Superoxiddismutasen in Fichten (*Picea abies* L. Karst). Fraunhofer-Institut für Atmosphärische Umweltforschung. Frankfurt am Main: Wiss. - Verl. Marau, Band 27-94, pp: 21-23
- Krupa Z, Baszynski T. 1995. Some aspects of heavy metal toxicity towards photosynthetic apparatus – direct and indirect effects on light and dark reactions. *Acta Physiol. Plant.*, 17, 177-190
- Krupa Z, Siedlecka A. 1995. Cd/Fe interactions and its effects on photosynthetic capacity of primary bean leaves. In: *Photosynthesis: from light to biosphere*. Mathis P (eds), 4, Kluwer, Dordrecht, pp: 621-624
- Küpper H, Küpper F, Spiller M. 1996. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *J. Exp. Bot.*, 47, 256-266
- Lagriffoul A, Mocquot B, Mench M, Vangrosveld J. 1998. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). *Plant Soil*, 200, 241-250
- Lan C, Chen G, Li L, Wong MH. 1992. Use of cattails in treating wastewater from a Pb/Zn mine. *Envir. Manag.*, 16, 75-80
- Lasat MM, Pence NS, Garvin DF, Ebbs SD, Kochian LV. 2000. Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.*, 51, 71-79

- Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: Methods in enzymology, 148, Academic Press, Inc, pp: 350-382
- Lidon FC, Teixeira MG. 2000. Oxy radicals production and control in the chloroplast of Mn-treated rice. Plant Sci., 152, 7-15
- Lin CC, Kao CH. 2000. Effect of NaCl stress on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism in rice leaves. Plant Growth Regul., 30, 151–155
- Logani MK, Davies RE. 1980. Lipid oxidation: biologic effects and antioxidants – a review. Lipids 15, 485-495
- Loewus FA. 1988. Ascorbic acid and its metabolic products. In: The Biochemistry of Plants, 14. Preiss J. (eds), Academic Press, New York, pp: 85-107
- Loschen G, Azzi A, Flohé L. 1973. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation: relationship with energy conservation. FEBS Letters., 33, 84-88
- Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohé L. 1974. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. FEBS Letters., 42, 68-72
- Malecka A, Jarmuszkiewicz W, Tomaszewska B. 2001. Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. Acta Biochim. Polon., 48, 687-698
- Manios T, Stentiford EI, Millner PA. 2003. The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferous water. Ecolog. Engin., 20, 65-74
- Mann T, Keilin D. 1938. Haemocuprein and hepatocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. Proc. R. Soc. London., 126, 303-315
- Marchiol L, Leita L, Martin M, Peressotti A, Zerbi G. 1996. Physiological responses of two soybean cultivars to cadmium. J. Environ. Qual., 25, 562-566
- Markert B. 1994. Plants as biomonitors – potential advantages and problems. In: Adriano DC, Chen ZS, Yang SS. (eds), Biogeochemistry of trace elements. Science and technology Letters, Northwood, NY, pp: 601-613



- Marrs KA. 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 47, 127-158
- Marschner H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, San Diego, CA, USA
- Martin TJ, Juniper BE. 1970. *The cuticles of plants*. Edward Arnold, Edinburgh; pp: 193-253
- Marx JL. 1987. Oxygen free radicals linked to many diseases. *Science.*, 235, 529-531
- Mathis P, Kleo J. 1973. The triplet state of  $\beta$ -carotene and of analog polyenes of different length. *Photochem. Photobiol.*, 18, 343-346
- Mauch F, Dudler R. 1993. Differential induction of distinct glutathione S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.*, 102, 1193-1201
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, Montagu MV, Inze D. 1998. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J. Exp. Bot.*, 49, 649-667
- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055
- McCutcheon SC, Medina VF, Larson SL. 2003. Proof of phytoremediation for explosives in water and soil. *Phytoremediation: transformation and control of contaminants*. McCutcheon SC, Schnoor JL (eds), New York: Wiley, pp: 429-480
- McCutcheon SC, Schnoor JL. 2003. Overview of phytotransformation and control of wastes. *Phytoremediation: transformation and control of contaminants*. McCutcheon SC, Schnoor JL (eds), New York: Wiley, pp: 3-58
- McKersie BD. 1996. Oxidative stress. Dept of crop Science, University of Guelph, <http://www.agronomy.psu.edu/Courses/AGRO518/Oxygen.htm> (abgerufen am 09.01.2004)
- Memon A, Aktoprakligil D, Özdemir A, Vertii A. 2001. Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants. *Turk. J. Bot.*, 25, 111-121
- Messner B, Schröder P. 1999. Burst amplifying system in cell suspension cultures of spruce (*Picea abies* L. Karst): Modulation of elicitor induced release of hydrogen peroxide (oxidative burst) by ionophores and salicylic acid. *J. Appl. Bot.*, 73, 6-10

- Metwally A, Safronova VI, Belimov AA, Dietz KJ. 2005. Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. J. Exp. Bot., 409, 167–178
- Michalke B, Maier M, Tischer T, Anetzberger H, Gerdesmeyer I, Pellengahr C, Schulz CU, Schmitz C. 2002. Mineralogische Analyse röntgenologisch definierter Verkalkungen bei Patienten mit chronischer *Tendinosis calcarea* der Rotatorenmanschette, 140, 399-403
- Milone MT, Sgherri C, Clijsters H, Navari-Izzo F. 2003. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. Environ. Exp. Bot., 50, 265-276
- Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Govindarajan R, Kuriakose SV, Prasad MNV. 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monniere* L. Plant Physiology and Biochemistry. PLAPHY-2407, 44, 25-37
- Misra AK, Sarkunan V, Miradas SK, Nayak SK, Nayar PK. 1989. Influence of N, P on cadmium toxicity on photosynthesis in rice. Curr. Sci., 58, 1398-1400
- Mittal R, Dubey RS. 1991. Behaviour of peroxidases in rice: changes in enzyme activity and isoforms in relation to salt tolerance. Plant Physiol. Biochem., 29, 31-40
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, 7, 405-410
- Mobin M, Khan NA. 2007. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subject to cadmium stress. Plant Phys., 164, 601-610
- Mocquot B, Vangronsveld J, Clijsters H, Mench M. 1996. Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities. Plant Soil, 182, 287-300
- Momoshima N, Bondietti EA. 1990. Cation binding in wood: applications to understanding historical changes in divalent cation availability to red spruce. Can. J. For. Res., 20, 1840-1849
- Monk LS, Fagerstedt KV, Crawford RMM. 1989. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. Physiol. Plant., 76, 456-459
- Munk K. 2000. Proteine. In: Biochemie, Zellbiologie, Ökologie, Evolution. Spektrum. Akademischer Verlag, pp: 5-44

- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497
- Mysliwa-Kurdziel B, Prasad MNV, Strzalka K. 2004. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: Heavy metal stress in plants. Prasad MNV (eds), Springer, Berlin, Heidelberg, pp: 146-181
- Mysliwa-Kurdziel B, Prasad MNV, Strzalka K. 2002b. Consequences of heavy metal exposure to the processes related to the light phase of photosynthesis. In: Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Prasad MNV, Strzalka K (eds), Kluwer, Dordrecht, pp: 229-255
- Nagalakshmi N, Prasad MNV. 2001. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci.*, 160, 291-299
- Nehnevajova E. 2006. Non-GMO approach for the improvement of heavy metal accumulation and extraction of high yielding crop species for efficient phytoextraction of contaminated soil. These N° 3414. Lusanne, pp: 13-66
- Nieboer E, Richardson DHS. 1980. The replacement of the non-descriptive term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut. Ser.*, 1, 3-26
- Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49, 249-279
- Nriagu JO. 1979. Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. *Nature*, 279, 409-411
- Nultsch W. 2001. Allgemeine Botanik. 11 Neubearbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, pp: 259-322
- Parekh D, Puranik RM, Srivastava HS. 1990. Inhibition of chlorophyll biosynthesis by cadmium in greening maize leaf segments. *Biochem. Biophys. Pflanzen*, 186, 239-243
- Pascal S, Debrauwer L, Ferte MP, Anglade P, Rouimi P, Scalla R. 1998. Analysis and characterisation of glutathione S-transferase subunits from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science*, 134, 317-326
- Pilon-Smiths E. 2005. Phytoremediation, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, 15-39

- Polle A, Krings B, Rennenberg H. 1989. Superoxide dismutase activity in needles of Norwegian spruce trees (*Picea abies* L.). *Plant Physiol.*, 90, 1310-1315
- Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N. 2002. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 537-548
- Prasad MNV. 1995b. The inhibition of maize leaf chlorophylls, carotenoids and gas exchange functions by cadmium. *Photosynthetica*, 31, 635-640
- Pukacka S, Ratajczak E. 2006. Antioxidative response of ascorbate-glutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant *Acer saccharinum* seeds. *Plant Physiol.*, 163, 1259-1266
- Radotic K, Ducic T, Mutavdzic D. 2000. Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environ. Expt. Bot.*, 44, 105-113
- Ramos I, Esteban E, Lucena JJ, Garate A. 2002. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn interaction. *Plant Sci.*, 162, 761-767
- Raskin I, Kumar PBAN, Dushenkov S, Salt DE. 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5, 285-290
- Rauser WE, Schupp R, Rennenberg H. 1991. Cysteine,  $\gamma$ -glutamylcysteine and glutathione levels in maize seedlings: distribution and translocation in normal and cadmium-exposed plants. *Plant Physiol.*, 97, 128-138
- Reinheckel T, Noack H, Lorenz S, Wissedel I, Augustin W. 1998. Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. *Free Radic. Res.*, 29, 297-305
- Rennenberg H. 1982. Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochem.*, 21, 2771-2781
- Rennenberg H, Lamourex GL. 1990. Physiological processes that modulate the concentration of glutathione in plant cells. In: Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants. Rennenberg H (eds), XPB, Academic Publishers, Hague, Netherlands, pp: 53-65
- Rivetta A, Negrini N, Cocucci M. 1997. Involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  calmodulin in  $\text{Cd}^{2+}$  toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativum* L.) seed germination. *Plant Cell Environ.*, 20, 600-608

- Romero-Puertzas MC, Palma JM, Gomez M, del Rio A, Sandalio LM. 2002. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ.*, 25, 677-686
- Rüegsegger A, Brunold C. 1992. Effect of cadmium on  $\gamma$ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. *Plant Physiol.*, 99, 428-433
- Rüegsegger A, Schmutz D, Brunold C. 1990. Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol.*, 93, 1579-1584
- Salt DE, Blaylock M, Kumar NPBA, Dushenkov V, Ensley BD. 1995. Phytoremediation. A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, 13, 468-474
- Salt DE, Smith RD, Raskin I. 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49, 643-668
- Sanchez-Fernandez R, Fricker M, Corben LB, White NS, Sheard N, Leaver CJ, Van Montagu M, Inze D, May MJ. 1997. Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 2745-2750
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertzas MC, del Rio LA. 2001. Cadmium induces changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.*, 52, 2115-2126
- Sanita di Toppi L, Gabbriellini R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.*, 41, 105-130
- Sanita di Toppi L, Lambardi M, Pazzagli L, Cappugi G, Durante M, Gabbriellini R. 1998. Response to cadmium in carrot *in vitro* plants and cell suspension cultures. *Plant Sci.*, 137, 119-129
- Scandalias JG. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.*, 101, 7-12
- Schat H, Llugany M, Vooijs R, Hartley-Whitaker J, Bleeker PM. 2002. The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J. Exp. Bot.*, 53, 2381-2392
- Schickler H, Caspi H. 1999. Response of antioxidant enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. *Physiol. Plant*, 105, 39-44

- Schröder P. 2006. Enzymes transferring biomolecules to organic foreign compounds: a role for glucosyltransferase and glutathione S-transferase in phytoremediation. In: Phytoremediation, rhizoremediation. Mackova M (eds), Springer, Netherlands, pp: 133-142
- Schröder P. 2001. The role of glutathione and glutathione S-transferases in plant reaction and adaptation to xenobiotics. In: Significance of glutathione to plant adaptation to the environment. Grill D (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp: 155-183
- Schröder P, Fischer C, Debus R, Wenzel A. 2002. Reaction of detoxification mechanisms in suspension cultured spruce cells (*Picea abies* L. Karst.) to heavy metals in pure mixture and in soil eluates. Environ. Sci. Pollut. Res., 1-10
- Schröder P, Maier H, Debus R. 2005. Detoxification of herbicides in *Phragmites australis*. Naturforschung, 60, 317-324
- Schröder P, Wolf AE. 1996. Characterization of glutathione S-transferase isoenzymes in needles of Norway spruce from a forest decline stand. Tree Physiol., 16, 503-508
- Schütz B, De Kok LJ, Rennenberg H. 1991. Thiol accumulation and cysteine desulfurylase activity in H<sub>2</sub>S-fumigated leaves and leaf homogenates of cucurbit plants. Plant Cell Physiol., 32, 733-736
- Schützendübel A, Nikolova P, Rudolf C, Polle A. 2002. Cadmium and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - induced oxidative stress in *Populus canescens* roots. Plant Physiol. Biochem., 40, 577-584
- Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Groos K, Legenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A. 2001. Cadmium induced changes in antioxidant systems, hydrogen peroxide content and differentiation in scots pine (*Pinus sylvestris*) roots. Plant Physiol., 127, 887-898
- Schulze W. 1957. Über den Einfluss der Düngung auf die Bildung der Chloroplastenpigmente. Pflanzenernäh. Düngung. Bodenkun., 76, 1-19
- Schwitzguébel JP. 2001. Hype or hope: the potential of phytoremediation as an emerging green technology, Remed. J., 11, 63-78
- Shah K, Kumar RG, Verma S, Dubey RS. 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Sci., 161, 1135-1144
- Sharma P, Dubey RS. 2005. Lead toxicity in plants. Braz. J. Plant Physiol., 17, 1-25

- Sharma SS, Kaul S, Metwally A, Goyal KC, Finkemeier I, Dietz KJ. 2004. Cadmium toxicity to barley (*Hordeum vulgare*) as affected by varying Fe nutrition status. *Plant Sci.*, 166, 1287-1295
- Shaw BP. 1995. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. *Bio. Plant.*, 37, 587-596
- Shaw BP, Sahu SK, Mishra RK. 2004. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: Heavy metal stress in plants. Second edition. MNV Prasad (eds), Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp: 85-126
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.*, 53, 1305-1319
- Shutes B, Ellis B, Revitt M, Bascombe A. 1993. The use of fresh water invertebrates for the assessment of metal pollution in urban receiving waters. In: Ecotoxicology of metals in invertebrates. Dallinger R, Rainbow PS (eds), Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, FL, pp: 201-222
- Siedlecka A, Krupa Z. 2002. Functions of enzymes in heavy metal treated plants. In: Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Prasad MNV, Kazimierz S (eds), Netherlands: Kluwer, pp: 314-370
- Siedlecka A, Krupa Z. 1999. Cd/Fe interaction in higher plants – its consequences for the photosynthetic apparatus. *Photosynthetica*, 36, 321-331
- Siedlecka A, Krupa Z, Samuelsson G, Oquist G, Gardestrom P. 1997. Primary carbon metabolism in *Phaseolus vulgaris* plant under Cd (II)/Fe interaction. *Plant Physiol. Biochem.*, 35, 951-957
- Siller-Cepada JH, Chen THH, Fushigami LH. 1991. High performance liquid chromatography analysis of reduced and oxidized glutathione in woody plant tissues. *Plant Cell Physiol.*, 8, 1179-1185
- Singh S, Eapen S, D'Souza SF. 2006. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere*, 62, 233-246
- Skorzynska-Polit E, Baszynski T. 1995. Photochemical activity of primary leaves in cadmium stressed *Phaseolus coccineus* depends on their growth stage. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 64, 273-279
- Smirnoff N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.*, 125, 27-58

- Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad ARK. 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mungbean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol. Plant.*, 85, 85-89
- Srivastava S, Tripathi RD, Dwivedi UN. 2004. Synthesis of phytochelatins and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa* – an angiospermic parasite. *J. Plant Physiol.*, 161., 665-674
- Stadtman ER. 1986. Oxidations of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem. Sci.*, 11, 11-12
- Steffens JC. 1990. The heavy metal – binding peptides of plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41, 553-575
- Stephan UW, Scholz G. 1993. Nicotinamin: mediator of transport of iron and heavy metals in phloem? *Physiol. Plant.*, 88, 522-529
- Strasdeit H, Duhme AK, Kneer R, Zenk MH, Hermes C, Nolting HF. 1991. Evidence for discrete Cd(SCys)<sub>4</sub> units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1129-1130
- Tang CF, Lin YG, Zeng GM, Li X, Xu WH, Li CF, Yuan XZ. 2005. Effects of exogenous spermidine on antioxidant system responses of *Typha latifolia* L. under Cd<sup>2+</sup> stress. *J. Integrative Plant Biol.*, 47, 428-434
- Taylor GJ, Crowder AA. 1984. Copper and nickel tolerance in *Typha latifolia* clones from contaminated and uncontaminated environments. *Can. J. Bot.*, 62, 1304-1308
- Taylor GJ, Crowder AA. 1983a. Uptake and accumulation of heavy metals by *Typha latifolia* in wetlands of the Sudbury, Ontario region. *Can. J. Bot.*, 61, 63-73
- Tester M, Leigh RA. 2001. Partitioning of nutrient transport process in roots. *J. Exp. Bot.*, 52, 445-457
- Thumann J, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH. 1991. Reactivation of metal requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. *FEBS Lett.*, 284, 66-69
- Tsao DT. 2003. Overview of phytoremediation. *Adv. Biochem. ENG. Biotechnol.*, 78, 1-50



- Turrens JF, Freeman BA, Crapo JD. 1982. Hyperoxia increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by lung mitochondria and microsomes. Arch. Biochem. Biophys., 217, 411-421
- Tziveleka L, Kaldis A, Hegedüs A, Kissimon J, Prombona A, Horvath G, Argyroudi-Akoyounoglou J. 1999. The effect of Cd on chlorophyll and light-harvesting complex II biosynthesis in greening plants. Z. Naturforsch. 54c, 740-745
- Vanacker H, Carver TLW, Foyer CH. 1998. Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. Plant Phys., 117, 1103-1114
- Vangrosveld J, Clijsters H. 1994. Toxic effects of metals. In: Plants and chemical elements – biochemistry, uptake, tolerance and toxicity. Farrago ME (eds), VCH, Weinheim, pp: 149-177
- Vangronsveld J, Mench M, Lepp NW, Boisson J, Ruttens A, Edwards R, Penny C, Van der Lelie D. 2000. In situ inactivation and metalloid contaminated soils: field experiments. In: Bioremediation of contaminated soils. Wise D, Toronto E, Cichon H, Inyang H, Stottmeister U (eds), Marcel Dekker Inc., New York, pp: 859-884
- Vassilev A, Lidon FC, Ramalho JC, do Ceu Matos M, da Graca M. 2004. Shoot cadmium accumulation and photosynthetic performance of barley plants exposed to high cadmium treatments. J. Plant Nutr., 27, 773-793
- Verma S, Dubey RS. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Science, 164, 645-655
- Vianello A, Macri F. 1991. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide at surface of plant cells. J. Bioenerg. Biomemb., 23, 409-423
- Wagner. 2006. <http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/bio2/wagner/wagfor4.html> (abgerufen am 03.05.06)
- Walz H. 1996. Tragbares Photosynthese System HCM – 1000. <http://www.walz.com>
- Weckx JEJ, Clijsters H. 1996. Oxidative damage and defence mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. Physiol. Plant., 96, 506-512
- Wenger K. 2000. Ligand – assisted phytoextraction of heavy metals from contaminated soil using common crop plants. Thesis ETH N° 13900, Switzerland

- Wierzbicka M. 1998. Lead in the apoplast of *Allium cepa* L. root tips – ultrastructural studies. *Plant Science*, 133, 105-119
- Winston GW, Cederbaum AI. 1983a. NADPH-dependent production of oxy radicals by purified components of the rat liver mixed function oxidase system. *J. Biol. Chem.*, 258, 1508-1513
- Wu F, Zhang G. 2002. Genotypic differences in effect of Cd on growth and mineral concentrations in barley seedling. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 69, 219-227
- Wu F, Zhang G, Dominy P. 2003. Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environ. Exp. Bot.*, 50, 67-78
- Xiang C, Oliver DJ. 1998. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10, 1539-1550
- Ye ZH, Baker AJM, Wong MH, Willis AJ. 1997. Zinc, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by *Typha latifolia*. *New Phytol.*, 136, 469-480
- Zhang H, Jiang Y, He Z, Ma M. 2005. Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*). *J. Plantphysiol.*, 162, 977- 984
- Zhang J, Kirkham MB. 1996. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytol.*, 132, 361-373
- Zhang J, Kirkham MB. 1994. Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol.*, 35, 785-791
- Zenk MH. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene*, 179, 21-30
- [http://www.mikrojeziro.met.pl/atlas\\_ros/plytja/palki.html](http://www.mikrojeziro.met.pl/atlas_ros/plytja/palki.html) (abgerufen am 30.06.2006)
- [http://de.wikipedia.org/wiki/Breitbl%C3%A4ttriger\\_Rohrkolben](http://de.wikipedia.org/wiki/Breitbl%C3%A4ttriger_Rohrkolben) (abgerufen am 14.02.2006)
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Sonnenblume> ( abgerufen am 13.10.06)
- [http://www.vetpharm.unizh.ch/giftdb/pflanzen/0067\\_bot.htm](http://www.vetpharm.unizh.ch/giftdb/pflanzen/0067_bot.htm) (abgerufen am 16.10.06)
- <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/99/99H322/t6.pdf> (abgerufen am 10.02.07)

<http://www.genome.ad.jp/Fig/reaction/R00095.gif> (abgerufen am 17.10 2006)

<http://fichas.infojardin.com/foto-acuaticas/typha-latifolia.jpg> (abgerufen am 12.04.2007)

(<http://de.wikipedia.org/wiki/Peroxidase>) (abgerufen am 07.08.07)

(<http://www.orthomedis.ch/mda.htm>) (abgerufen am 02.03.07)

## **Danksagung**

Besonders bedanken möchte ich mich bei...

meinem Doktorvater, Prof. Dr. Dr. Peter Schröder, für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie auch für die fachliche Unterstützung während meiner Doktorandenzeit am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit.

dem Bayerischen Hochschulzentrum für Mittel-, Ost- und Südosteuropa (BAYHOST) für die Überlassung des Stipendiums, das meine Promotion ermöglicht hat. Dem BAYHOST-Team danke ich für die fachliche und freundliche Betreuung.

Prof. Jean Charles Munch vom Institut für Bodenökologie und Prof. Anton Hartman aus der Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktionen für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Dr. Rolf Herzig (PHYTOTECH, Schweiz) und Dr. Erika Nehnevajova für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials und die Überlassung von Daten im Rahmen unserer Kooperation, wie auch für die fachlichen Ratschläge und Diskussionen.

der Arbeitsgruppe Schröder, die mich so herzlich aufgenommen hat und von der ich mit Rat und Tat unterstützt wurde. Herzlichen Dank an Anette, Anita, Chrissi, Christian, Christine, Juliane, Micha und Rudi für die gute Zusammenarbeit.

Dr. Barbro Winkler für die gute Zusammenarbeit, die guten Ratschläge und fachlichen Diskussionen.

Peter Kary, aus der Abteilung für Experimentelle Umweltsimulation am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, für die technische Hilfe im Gewächshaus.

Dr. Juliane Neustifter und meinen Doktoranden-Kollegen Christine Götz und Christian Huber für die fachspezifischen Diskussionen, bezogen auf meine Arbeit, die wir geführt haben und für die Zeit, die wir gemeinsam gearbeitet haben.

Michaela Saur für die logistische Unterstützung bei der Kooperation mit PHYTOTECH (Schweiz), die mir in allen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand.

den Menschen, die mir besonders nahe stehen, mich geprägt und unterstützt haben: meine Eltern Lydia und Slaveyko Stoimenovi, meine Tante Edeltraut Ljubenow und mein Cousin Juri Ljubenow.

allen Freunden und Bekannten im Bulgarien und Deutschland, die mich während der Doktorandenzeit unterstützt haben: Vera, Tina, Guschi, Wolfgang, Crema, Veneta, Biser, Dessi.

Ruth Gehrke für die freundliche Unterstützung bei der Korrektur meiner Arbeit.

apl. Prof. Filip Machev aus der „Sv. Kliment Ochridski“ Universität Sofia, weil er mich auf das BAYHOST-Stipendium aufmerksam gemacht hat, das meine Promotion ermöglicht hat.

На моите родители искам да благодаря за оказаните ми от тях подкрепа и разбиране по време на докторантският ми престой в Мюнхен, както и за вярата им в мен.

## Lebenslauf

## Lyudmila Slaveykova Lyubenova

geboren am 06.02.1980

in Kyustendil, Bulgarien

01/2005 – 08/2007

Promotion an der TU München und GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg

04/2004 – 12/2004

Phytoremediationspraktikum an der TU München und GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg; finanziert durch ein Stipendium des Freistaates Bayern für Hochschulabsolventen aus mittel- und südeuropäischen Ländern

10/2002 – 02/2004

Masterstudium in Geologie und Umwelt an der Sofioter Universität „Sv. Kliment Ochridski“ in Sofia, Bulgarien

10/1998 – 09/2002

Bachelor in Geologie an der Sofioter Universität „Sv. Kliment Ochridski“ in Sofia, Bulgarien

09/1993 – 06/1998

Fremdsprachengymnasium „Dr. Peter Beron“ in Kyustendil, Bulgarien; erste Fremdsprache Deutsch und zweite Fremdsprache Englisch

09/1986 – 06/1993

Grundschule „Neofit Rilski“ in Kyustendil, Bulgarien