

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Die schwermetalltoleranten Moose
Mielichhoferia elongata und *Pohlia drummondii*
und ihre Reaktion gegenüber Schwermetallstress

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser: Stefan Wernitznig
Matrikel-Nummer: 0302199
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt): Ökologie
Betreuerin / Betreuer: Prof. Dr. Irene Lichtscheidl

Wien, am 14.12.2009

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern dafür danken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben Biologie zu studieren.

Dafür, dass sie mir dieses interessante Thema überlassen hat, will ich Prof. Dr. Irene Lichtscheidl danken; sowie für ihre Hilfe bei Problemen und auch ihrer Geduld. Besonders möchte ich mich bei ihr bedanken, dass sie mehrere Besuche bei Kongressen unterstützt hat.

Bei Dr. Ingeborg Lang möchte ich mich bedanken für die Unterstützung und hilfreiche Ratschläge bei mikroskopischen Fragestellungen, sowie die vielen zeitsparenden Ratschläge beim Schreiben der Diplomarbeit bedanken.

Für die vielen hilfreichen Stunden am Elektronenmikroskop möchte ich mich bei Dr. Marieluise Weidinger bedanken.

Bei Dr. Roland Albert bedanke ich mich vielmals für die Betreuung und Hilfe bei den AAS-Messungen im Department für Chemische Ökologie und Ökosystemforschung.

Prof. Dr. Robert Kartusch danke ich für die Durchführung der Messung der Lichtintensität bei den *in vitro* Kulturen.

Der gesamten Abteilung Cell Imaging danke ich für die schöne Zeit; gemeinsam mit den anderen Diplomanden gestellten sich die vielen Stunden im Labor immer sehr kurzweilig.

Mein Dank gilt auch der Gesellschaft zur Förderung der Pflanzenwissenschaften für die finanzielle Unterstützung für den internationalen Kongress in Finnland (FESPB 2008), welcher eine große Bereicherung war.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	3
2	Abstract.....	5
3	Einleitung.....	7
3.1	Schwermetalle.....	7
3.2	Spezielles zu Kupfer und Eisen.....	11
3.2.1	Eisen.....	11
3.2.2	Kupfer.....	12
3.3	Schwermetallstandort Schwarzwand.....	13
3.4	Schwermetallmoose.....	13
3.5	In vitro Kultur.....	16
4	Material und Methode.....	18
4.1	Material.....	18
4.2	<i>In vitro</i> Kultivierung.....	18
4.2.1	Sterilisation:.....	18
4.2.2	Kulturmedien.....	19
4.2.3	Schwermetallmedien.....	20
4.2.4	Kulturbedingungen.....	20
4.2.5	Kultivierung auf Cellophanpapier.....	20
4.2.6	Dokumentation.....	20
4.2.7	Zusätzliche Präparation für die Mikroskopie.....	21
4.3	AAS zur Bestimmung des löslichen Metallanteiles.....	21
4.4	Elementanalyse - EDX.....	22
4.4.1	Probenvorbereitung.....	22
4.4.2	Messung.....	22
4.4.3	Auswertung.....	22
4.5	Cytologische Untersuchungen.....	23
4.5.1	Neutralrotfärbung.....	23
4.5.2	Fluoreszenzfarbstoffe.....	23
4.5.3	Protonemawachstum.....	24
4.5.4	Resistenzversuche.....	25
4.6	Präparation für REM Bilder.....	26
4.7	Anatomische Präparate.....	26

5	Ergebnisse.....	28
5.1	Oberflächensterilisation	28
5.2	Medientest für <i>P. drummondii</i> und <i>M. elongata</i>	28
5.3	Kultivierungsbedingungen	33
5.4	Resistenz auf Agarplatten.....	35
5.5	AAS des Agars	40
5.6	Elementanalyse – EDX	41
5.7	Cytologische Untersuchungen.....	59
5.7.1	Neutralrotfärbung	59
5.7.2	Fluoreszenzfarbstoffe	62
5.7.3	Protonemawachstum	67
5.7.4	Resistenzversuche	74
5.8	Präparation für REM Bilder	76
5.9	Anatomische Präparate.....	78
6	Diskussion.....	80
6.1	Kultivierung	80
6.2	Einfluss der Schwermetalle.....	85
6.3	Resistenz.....	86
6.4	Elementanalyse.....	87
6.5	Zellbiologische Untersuchungen.....	93
6.5.1	Morphologie	93
6.5.2	Fluoreszenz.....	94
6.5.3	Protonemazelllängen	95
6.5.4	Spitzenwachstum.....	96
7	Ausblick	99
8	Literaturverzeichnis	100

1 Zusammenfassung

Die beiden Moose *Mielichhoferia elongata* und *Pohlia drummondii* kommen in der Natur auf schwermetallhaltigen Böden vor. Es ist auch bekannt, dass sie Schwermetalle aufnehmen können. Um die beiden Laubmoose näher untersuchen zu können, wurden von ihnen sterile *in vitro* Kulturen angelegt. Dies sollte ermöglichen, die reine Aufnahme von Kupfer und Eisen aus dem Substrat zu bestimmen.

Für eine optimale Kultivierung wurde aus 5 verschiedenen Nährmedien das modifizierte Benecke-Medium ermittelt. Auf diesem wurden die Wachstumsgrenzen bei Schwermetallstress mit Cu- und Fe-EDTA festgestellt. Bei *P. drummondii* lagen diese für Kupfer zwischen 10 mM und 0,1 M und bei Eisen zwischen 1 mM und 10 mM.

M. elongata überlebte sogar eine Kupferkonzentration von 0,1 M. Die Grenze bei Eisen war die gleiche wie bei *P. drummondii*.

Die Aufnahme der Schwermetalle wurde mithilfe des EDX-Systems im REM untersucht. Die Aufnahme von Kupfer für beide Moose konnte ab einer Konzentration von 1 mM nachgewiesen werden. Bei *P. drummondii* konnte eine maximale Aufnahme bei 16 mM festgestellt werden. Hingegen war bei *M. elongata* bei den Konzentrationen zwischen 1 mM und 0,1 M eine gleich hohe Aufnahme auszumachen.

Eine Eisenaufnahme war bei beiden Moosen nicht nachweisbar, nur bei 1 mM zeigte *M. elongata* eine deutliche Aufnahme.

Die Auswirkungen des Kupferstresses auf das Wachstum der Protonemata von *M. elongata* und *P. drummondii* wurde durch den Vergleich der Zelllängen untersucht. Das Protonema von *M. elongata* zeigte bei Chloronema und Caulonema eine Zunahme der Zelllängen, wenn diese in einem Medium mit 10 mM Cu-EDTA kultiviert wurden. Hingegen zeigte bei *P. drummondii* nur das Chloronema eine Zunahme der Zelllängen.

2 Abstract

In nature the two mosses *Mielichhoferia elongata* and *Pohlia drummondii* grow on heavy metal substrate. Their capability of heavy metal uptake is also known. These two mosses were taken into *in vitro* culture so they could be investigated under controlled conditions. So the uptake of copper and iron from the substrate without contaminations could be determined.

For optimal cultivation five different culture media were tested and the modified Benecke-Medium was chosen. On this medium the growth-limits under heavy metal stress were examined with Cu-EDTA and Fe-EDTA. The Limits for *P. drummondii* were determined on copper between 10 mM and 0,1 M and on iron between 1 mM and 10 mM. *M. elongata* even survived at a concentration of 0,1 M copper. Its growth limits on iron were the same as the ones for *P. drummondii*.

The uptake of the heavy metals was investigated with EDX-REM. For both mosses a significant uptake of copper could be found at a concentration of 1 mM copper upwards. *P. drummondii* showed a maximum at 16 mM. In contrast *M. elongata* had the same uptake rates in the higher concentrations. The uptake of iron from the substrate could be verified with one exception. *M. elongata* showed a significant higher amount of iron at 1 mM.

The influence of copper stress on the protonemal growth of *M. elongata* and *P. drummondii* were measured by comparison of their cell-lengths. If grown in a media with 10 mM copper the chloronema and caulonema cells of *M. elongata* both showed a significant increase of their lengths. However, only the chloronema cells of *P. drummondii* showed an increase but not the caulonema cells.

3 Einleitung

3.1 Schwermetalle

Schwermetalle sind natürliche Elemente, welche in verschiedenen Konzentrationen abhängig vom Untergrund in der ganzen Welt gefunden werden. Sie sind beständig und können daher nicht aus der Umwelt entfernt werden. Dies kann zu Problem führen, wenn ihre Verfügbarkeit aufgrund hoher Grundgehalte oder anthropogener Einflüsse erhöht ist. Durch menschliche Tätigkeiten sammeln sich Schwermetalle in Senken und Müll. Von dort werden sie durch Luft, Wasser und Ablagerungen in die Umwelt verfrachtet, wodurch die Schwermetallkonzentration in dieser ansteigt (Greger, 2004). Nieboer and Richardson (1980) haben die Metalle in folgende 3 Klassen eingeteilt:

1. A-Metalle: Haben eine hohe Affinität zu Sauerstoffgruppen in Makromolekülen (z.B. Carboxyl- und Alkoholgruppen). Dies sind die Elemente der 2. Hauptgruppe (Erdalkalimetalle) und Mn.
2. B-Metalle: zeichnen sich durch eine hohe Affinität zu Stickstoff und Schwefelgruppen (Sulphydryl- und Aminogruppen) aus. Dies sind z.B. Ag, Cd und Cu.
3. Übergangs-Metalle: Fassen die übrigen Metalle zusammen, welchen keine eindeutige Zuordnung in die beiden anderen Klassen möglich ist (z.B. Fe, Zn und Pb).

Neben den Hauptnährstoffen wie C, H, O, N, P, S, K, Ca, und Mg brauchen Pflanzen auch andere Element in geringen Mengen für ein gesundes Wachstum. Diese Elemente werden essentielle Spurenelemente genannt. Zu diesen zählen B, Cl, Cu, Mn, Fe, Zn, Mo. Einige Pflanzen brauchen auch noch Si, Co und Se.

Essentielle Spurenelemente können auf den Organismus in zweierlei Hinsicht negative Wirkung haben: erstens bei Unterversorgung, was in Mangelercheinungen wie gemindertem Wachstum zu erkennen ist, und zweitens bei Überangebot. Mit der Zunahme des Angebotes geht eine Wachstumssteigerung einher, bis ein Plateau erreicht wird, welches nicht überschritten werden kann. Steigt das Angebot weiter kommt es schnell zu toxischen Effekten.

Hingegen zeigt sich bei den nicht essentiellen Spurenelementen keine Förderung des Wachstums. Ab einer bestimmten Konzentration treten toxische Effekte auf. Sichtbare

Symptome der Metall-Toxizität sind am häufigsten die Verminderung des Wachstums, Chlorosen sowie Nekrosen und gelbe Blätter. All diese Erscheinungen sind das Resultat der Unterversorgung der Pflanze mit essentiellen Nährstoffen (meist P und Ca), hervorgerufen durch die Wirkung der Schwermetalle.

Um bei bestimmten Schwermetallkonzentrationen im Boden überleben zu können, haben die Pflanzen verschiedene Strategien entwickelt. So beschreibt (Baker, 1981) die Möglichkeit der Akkumulation sowie der Exklusion der vorliegenden Schwermetalle. Foster (1977) berichtet z.B. von einem kupfertoleranten Stamm der Alge *Chlorella vulgaris*, welcher das Cu im Medium nicht aufnahm und dadurch deutlich höhere Konzentrationen (bis zu 1mg l^{-1}) ertragen konnte, also nach Baker ein Exkluder ist.

In Pflanzen zeigen Schwermetalle eine große Bandbreite an Auswirkungen. Besonders der photosynthetische Apparat weist eine sehr hohe Sensitivität auf. Elemente wie Cd, Cu, Hg, Pb und Zn können die photosynthetischen Funktionen indirekt oder auch direkt beeinflussen. So zeigt sich, dass Schwermetalle mit dem photosynthetischen Apparat auf verschiedenen Ebenen der Organisation und Architektur reagieren:

- Akkumulation von Metallen in den Blättern (Hauptorgan der Photosynthese)
- Aufteilung in Blattgeweben, wie Stomata, Mesophyll oder Gefäß-Bündelscheiden
- Metall-Interaktionen mit cytosolischen Enzymen und organischen Stoffen
- Veränderung der Funktion der Chloroplasten-Membran
- Aktivität auf supramolekularer Ebene, insbesondere PSII und PSI, Acyllipide der Membranen und Carrier-Proteine in den Leitgeweben
- Interaktionen auf molekularer Ebene, besonders bei Enzymen des Calvinzyklus, Xanthophyll Zyklus und Adenylate

In submersen aquatischen Pflanzen, welche in metallkontaminierten Gewässern leben, konnte der Austausch des zentralen Mg-Atoms im Chlorophyll-Molekül durch Schwermetalle (Hg, Cd, Cu, Ni, Zn und Pb) *in vivo* als einer der schädlichsten Effekte ausgemacht werden. Dieser Austausch unterband das „Lichtsammeln“ und führte damit in weiterer Folge zum Zusammenbruch der Photosynthese (Küpper et al., 1996, 1998). Die Stärke der Schädigung variiert in Abhängigkeit von der Lichtintensität. Bei

niedriger Lichteinstrahlung sind alle Zentralatome des Chlorophylls für die Schwermetalle angreifbar, die gebildeten Schwermetall-Chlorophyll-Komplexe sind stabiler gegen Strahlung als Mg-Chlorophyll-Komplexe und daher sehen Pflanzen immer noch grün aus, auch wenn diese schon tot sind. Hingegen zerfällt bei hohen Strahlungen fast das gesamte Chlorophyll und ist bei diesen Bedingungen kaum angreifbar für Schwermetalle (Küpper et al., 1996 und Mysliwa-Kurdiel et al., 2004).

Auf molekularer Ebene kann die Toxizität von Metallen in groben Zügen auf 5 Effekte zurückgeführt werden:

1. Ersetzen von essentiellen Metallionen in Biomolekülen oder biologisch funktionellen Einheiten
2. Blockieren von essentiellen funktionellen Gruppen der Biomoleküle (Enzyme, Polynukleotide)
3. Modifizieren der aktiven Konformation der Biomoleküle
4. Stören der Integrität von Biomolekülen
5. Modifizieren anderer biologisch aktiver Stoffe

Diese Wirkungen beruhen auf der Eigenschaft der Metallionen eine starke Bindung mit Sauerstoff-, Stickstoff- und Schwefel-Atomen einzugehen. (Borovik, 1990)

Nach Devi and Prasad (2004) kann die schädliche Wirkung der Schwermetalle auf Zellebene durch 2 Punkte erklärt werden: erstens wird die Produktion von ROIs (reactive oxygen intermediates) erhöht und zweitens wird die Entfernung dieser verlangsamt. Zu den ROIs werden die Superoxid Radikale O_2^- , Hydrogenperoxid H_2O_2 , Hydroxyl-Radikale HO^\cdot und singlet Oxygen 1O_2 gezählt.

Schäden, welche durch ROIs verursacht werden, sind vor allem in tierischen Organismen gut untersucht. So kommt es durch die von Schwermetallen verursachten ROIs zu Lipidperoxidation, DNA-Schäden, Abbau der Sulfhydryle und Veränderung der Ca^{2+} -Homöostase. In Pflanzen geht durch die photosynthetischen Prozesse, bei welchen es zur Produktion von ROIs kommt, ebenfalls eine große Gefahr oxidativer Schäden aus.

Um ROIs unschädlich zu machen steht das Antioxidative System zur Verfügung. Dieses beinhaltet nicht-enzymatische und enzymatische Bestandteile. Erstere sind kleine Moleküle, wie Tripeptid-Gluthation, Cystein, Hydroxyquinon, Ascorbat, Carotin Pigmente und Alkaloide. Die enzymatischen Bestandteile sind Katalasen, Peroxidasen, Ascorbat Peroxidase, Superoxid Dismutase und Glutathion Reduktase (Shaw et al., 2004).

Die Superoxid Dismutase (SOD) ist eine der bekanntesten Vertreter und kann in allen aeroben Organismen gefunden werden. Diese Enzymgruppe schützt Gewebe vor dem schädlichem Einfluss freier Sauerstoffradikale. In belichteten Zellen sind die Chloroplasten jene Organellen mit der höchsten Rate an Sauerstoff-Umsatz, die Bildung von O_2 Radikalen und H_2O_2 eingeschlossen. Die CuZnSOD ist in Mitochondrien, Glyoxysomen, sowie gemeinsam mit der FeSOD in den Chloroplasten zu finden. Bei Kupferunterversorgung kommt es zu einer Abnahme der CuZnSOD-Aktivität und damit verbunden zu typischen Schäden in Chloroplasten durch Sauerstoffradikale, wie Schädigung der Intergrana Lamellen und geschwollene Grana-Stapel (Marschner, 1995).

Neben den Mechanismen gegen den indirekt induzierten Stress gibt es auch Systeme, welche die Schwermetalle in der Zelle abfangen und für die Pflanze unschädlich machen. Für die Entgiftung der Schwermetalle werden in den Pflanzen Phytochelatine genannt (Steffens, 1990). Grill et al. (1987) zeigte eine Anregung der Phytochelatinsynthese durch die Anwesenheit von Metallionen, jedoch keine Produktion von Metallothioninen, welche in tierischen Organismen für die Entgiftung zuständig sind. Untersuchte Pflanzen waren *Agrostis tenuis*, *Silene cucubalus*, *Brassica oleracea*, *Lycopersicon esculentum* und *Zea mays*. Cobbett (2000) zeigte, das Cd die Enzymaktivität sowie die Genexpression der Phytochelatine positiv beeinflusst. Saradhi and Saradhi (1991) zeigte bei den Pflanzen *Cajanus cajan*, *Vigna mungo* und *Triticum aestivum* eine durch Schwermetall hervorgerufene Erhöhung des Prolingehaltes, wobei Cadmium die deutlichste Reaktion hervorrief.

Da viele der Metalle auch Mikronährstoffe für Pflanzen sind, müssen Mechanismen vorhanden sein, welche es der Pflanze ermöglichen ihren Bedarf zu decken und gleichzeitig verhindern, dass eine für die Zelle toxische Konzentration aufgenommen

wird. Williams et al. (2000) beschreiben 3 verschiedene Klassen von Membrantransporter-Proteinen, welche dabei eine große Rolle spielen:

1. Die Schwermetall (CPx-type) ATPasen,
2. Die *natural resistance-associated macrophage protein* (Nramp) Familie
3. Mitglieder der *cation diffusion facilitator* (CDF) Familie

In normalen Konzentrationen wird das freie Cu^{2+} in pflanzlichen Zellen im Cytoplasma an Kupferchaperone gebunden. Diese Chaperone besitzen eine terminale carbon-helix Domäne, welche zur Bindung an RAN1 (Responsive to Antagonist1) dient. So kann das Kupfer in Vesikel oder post-Golgi gelangen. Von dort gelangt es möglicherweise zu Äthylen Rezeptoren (Himmelblau and Amasino, 2000).

3.2 Spezielles zu Kupfer und Eisen

3.2.1 Eisen

Das Metall Eisen ist im Boden durchschnittlich in einer Konzentration 0,5 bis 5 % vorhanden. In den Tropen, Laterite, oder in den Terra rossa Böden kann der Gehalt auch auf 10 % ansteigen

Im Boden liegt Eisen in Form von löslichen Ionen am häufigsten als ein Chelat von Fe(III) bzw. auch als Fe(II) Chelat vor. Eisen lässt sich dadurch charakterisieren, dass es sehr leicht einen Oxidationszustand ändern kann, $\text{Fe}^{3+} \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}$. Es formt häufig octohedrale Komplexe mit verschiedenen Liganden, wie zum Beispiel organische Säuren oder inorgan. Phosphaten. Je nach Ligand variiert das Redoxpotential sehr weit, was Eisen eine wichtige Rolle in biologischen Redoxsystemen einräumt. Die hohe Affinität von Fe^{3+} oder Fe^{2+} zu verschiedenen Liganden, wie den oben genannten, macht es sehr unwahrscheinlich, dass die Eisenionen Fe^{3+} und Fe^{2+} eine wichtige Rolle im Kurz- und Ferntransport spielen (Marschner, 1995).

Die Aufnahme des Eisens erfolgt entweder als Fe^{3+} Chelat oder nach Abspaltung und Oxidation als Fe^{2+} über spezielle Ionen-Kanäle ins Plasma. Mit Nutzpflanzen wurden viele Untersuchungen zu den nötigen Gehalten für eine ausreichende Versorgung der Pflanzen mit Eisen durchgeführt. Der Grenzwert einer Unterversorgung liegt demnach in den Blättern bei 50 bis 150 mg Fe pro kg Trockengewicht. Bei schnellwachsenden Meristemen, wie Spitzenmeristemen kann dieser Wert auf bis zu 200 mg ansteigen.

Toxische Wirkungen können ab einem Gehalt von 500 mg Fe pro kg Trockengewicht in Blättern festgestellt werden. Allerdings ist dies auch von andern Nährstoffen abhängig

3.2.2 Kupfer

Kupfer kommt im Boden normal nur in geringen Mengen von 5 - 50 ppm vor; in Mineralböden 20 – 50 ppm. Hier liegt es hauptsächlich als anorgan. Verbindung. In humusreichen Böden ist das Kupfer als Chelat vorhanden.

Kupfer hat gewisse Ähnlichkeiten mit Eisen, so die Bildung von sehr stabilen Komplexen und dass es sehr leicht den Oxidationszustand ändert ($\text{Cu}^{2+} \leftrightarrow \text{Cu}^+$). Die meisten Funktionen des Kupfers als Pflanzennährstoff liegen in der Teilnahme als enzymatisch gebundenes Kupfer an Redox-Reaktionen. Mehr als 98-99% des Kupfers liegen in der Bodenlösung, in den Wurzeln (Presssaft) und im Xylemsaft komplexiert vor. Das liegt daran, dass Kupfer eine hohe Affinität zu Peptiden und Sulfhydryl Gruppen, und daher insbesondere zu Cystein reichen Proteinen, sowie zu carboxyl und phenolischen Gruppen aufweist (Marschner, 1995). Diese hohe Affinität zu Chelatverbindungen führt auch dazu, dass das Kupfer andere Schwermetalle, vor allem Mn und Fe verdrängt. Die Pflanzen nehmen das Kupfer als Cu^{2+} -Ionen oder in Form von Chelaten auf. Die höchsten Gehalte sind allgemein in den Wurzeln zu finden. Dies deutet auf einen langsamen Transport von der Wurzel in den Spross hin. Neben der Wurzel ist Kupfer hauptsächlich noch in den Chloroplasten von entwickelten Blättern, in den Embryonen von Getreidekörnern und vor allem in den Staubbeutel zu finden. Durchschnittlich liegt der Gehalt bei 4 – 20 mg Cu pro kg Trockensubstanz. Unter 4 mg kommt es zu Mangelercheinungen. Hier zeigt sich, dass das Kupfer eine wichtige Rolle bei der Zellwandbildung spielt. Bei unterversorgten Pflanzen kommt es zu einer Abnahme des Zellwandanteils in der Trockensubstanz. Besonders betroffen ist der Anteil des Lignins, hier kommt es zu einer Halbierung des Anteils. Dies ist mit der Beteiligung des Kupfers an der Polyphenoloxidase und Diaminoxidase, welche bei der Ligninproduktion eine Rolle spielen, zu erklären. Allgemein sind generative Organe stärker von einer Unterversorgung betroffen als vegetative. Untersuchungen an Nutzpflanzen haben gezeigt, dass ab 20 – 30 mg Cu pro kg Trockengewicht toxische Effekte auftreten. In Verbindung damit zeigte sich je nach Fe-Quelle auch eine, durch die Cu-Toxizität hervorgerufene Fe-Unterversorgung (Taylor and Foy, 1985). Auf die Zelle hat Cu^{2+} nach Demidchik et al. (1997) den Effekt, dass die Cl^- Kanäle in der Plasmamembran inhibiert werden, was allerdings durch die Erhöhung des Ca^{2+} -

Spiegels verhindert werden kann. Weiters wird die lichtaktivierte elektrogene H^+ - ATPase der Plasmamembran unabhängig vom Ca^{2+} inhibiert.

3.3 Schwermetallstandort Schwarzwand

Die in dieser Arbeit untersuchten Moose wurden bei Hüttschlag im Großarlal in Salzburg gesammelt. Dort war in der Frühneuzeit ein Bergbaugebiet für Kupfer- und Schwefelkies. Das Abbaugelände der Schwarzwand reicht von ca. 1500 bis 1700m Seehöhe. Im Jahre 1835 wurde der Betrieb eingestellt, seither konnte sich dort eine Schwermetallflora ausbilden, welche in mehreren wissenschaftlichen Arbeiten Stummerer (1970), Saukel (1980), Sissolak (1984) und Hörmann (2001) untersucht wurde. In der Arbeit von Saukel wird die Schwarzwand in mehrere Teilbereiche (A-D) eingeteilt. Aus den aufgelassenen Stollen (Bereich B) tritt Wasser aus. Hier ist die Art *Mielichhoferia elongata* zu finden. Der nördlich gelegene Stollen enthält eine größere Menge an Kupfer, welches im Freien als Kupferhydroxidcarbonat ausfällt und dadurch die charakteristische blaue Färbung des Baches (Bereich C) verursacht. Am südlichen Bach tritt im Bereich C das Lebermoos *Scapania undulata* in großen Mengen auf. Das Laubmoos *Pohlia drummondii* ist hingegen im flacheren Bereich D zu finden.

3.4 Schwermetallmoose

Die Moose sind ein heterogene Gruppe, welche im Reich der Pflanzen zwischen den Grünalgen und Farnpflanzen eingestuft werden. Sie stellen hinsichtlich ihrer Anatomie und Physiologie einen Übergang zwischen Charophyten (Armleuchteralgen) und den Gefäßpflanzen dar.

Innerhalb dieser Gruppe können die beiden Abteilungen der Anthocerotophyta (Hornmoose) und Bryophyta (Moospflanzen) unterschieden werden. Die Bryophyta untergliedern sich in die Hepaticophytina (Lebermoose) und Bryophytina (Laubmoose i.w.S.).

Aus der Sicht des Wasserhaushaltes zählen die Moose gemeinsam mit den Thallophyten zu den poikilohydran Pflanzen. Das bedeutet, dass sie nur im befeuchteten Zustand stoffwechselaktiv sind und daher auch in direkter Beeinflussung durch Umweltfaktoren stehen. Durch das Fehlen eines Wurzelsystems nehmen die Moose Wasser

oberflächlich/äußerlich auf. Die gängige Lehrmeinung ist, dass zusammen mit dem Wasser auch die Nährstoffe aufgenommen werden (Frahm, 2001).

Der Generationswechsel der Moose ist heteromorph und heterophasisch. Die beiden Generationen, der Gametophyt und der Sporophyt unterscheiden sich sowohl in ihrer Gestalt als auch in ihrer Kernphase. Der haploide Abschnitt des Lebenszyklus, der Gametophyt, ist überdauernd und dient als Untergrund für die diploide Phase, den Sporophyt. Daher ist dieser mit dem Untergrund nie in Berührung und die Selektion bezüglich Schwermetalle belasteter Böden setzt nur am Gametophyten an (Shaw, 1989). Der Sporophyt produziert haploide Meiosporen, welche zu einem Vorkeim, dem Protonemata auswachsen. Auf den Zellfäden des Protonematas entwickeln sich Knospen, welche die eigentlichen Moospflanzen (Gametophyt) bilden. Die Gametophyten bilden die Gametangien aus, die weiblichen Archegonien und die männlichen Antheridien. Bei den Moosen gibt es, wie bei den Gefäßpflanzen auch, diözische, synözische oder parözische Arten, allerdings kann dies auch innerhalb einer Art variieren. Die in den Antheridien gebildeten Spermatozoide gelangen schwimmend zum Archegonium und sind daher vom Wasser abhängig. Ihre Reichweite beträgt allerdings nur 1,5 cm (bzw. 1,5 m „splash cup“). Über die Halskanalzelle des Archegoniums gelangen die Spermatozoide zur Eizelle. Aus der befruchteten Eizelle entwickelt sich der diploide Sporophyt (Frahm, 2001).

Es wurde schon in vielen Untersuchungen festgestellt, dass Bryophyten eine Tendenz zur Akkumulation von Schwermetallen haben, wie z.B. von Rejment-Grochowska (1976). Es zeigte sich auch, dass Gefäßpflanzen eher Makronährstoffe akkumulieren, hingegen Bryophyten eher Mikronährstoffe wie Cu, Pb, Zn, Cr und Ni.

Verschiedenste Untersuchungen zeigen die die Verwendbarkeit verschiedenster Moosarten bei der Indikation von Umweltverschmutzung auf (LeBlanc et al., 1974). Nebenbei können sie auch auf Erzen im Boden Hinweise geben. So beschreibt Brooks (1971) die Möglichkeit anhand des Auftretens von *Merceya* und *Mielichhoferia* auf einen Untergrund mit hohen Kupfergehalten schließen zu können. Crist et al. (1996) zeigten die Möglichkeit der Entfernung von Metallen aus verunreinigten Gewässern durch die Nutzung der hohen Ionenaustauschbarkeit von Torfmoosen. Moose können

als Indikatorpflanzen für Verschmutzung in der Atmosphäre verwendet werden (Onianwa, 2001).

Bei den Untersuchungen zur Beziehung zwischen Moosen und Schwermetallen wurde oft das Fehlen der Sporophyten auf belasteten Flächen beschrieben, jedoch konnte dieses Phänomen nicht nur auf Schwermetalle alleine festgestellt werden, sondern auch bei Fluoriden und SO₂ (und „künstlichem“ saurem Regen) beobachtet werden.

Es sind in der Literatur an die 7 sog. „Kupfermoose“ zu finden: *Gymnocolea acutiloba* (*G. inflata*)[Lebermoos], *Cephaloziella massalongi* (*C. nicholsoni*)[Lebermoos], *Gimmia atrata*, *Mielichhoferia*, *Scopelophila* (Shaw, 1989).

Mielichhoferia elongata kommt zusammen mit *M. mielichoferiana* auf kupferreichem Gestein vor. Beide Arten wurden als erstes in den Salzburger Alpen beschrieben. Einige Autoren nehmen daher an, dass es sich hier um ein und dieselbe Art handelt. Sie gehen davon aus, dass es eher unwahrscheinlich ist, dass zwei genetisch isolierte Arten, dieselbe geographische Verbreitung, dieselbe Disjunktion und genau gleiches lokales gemeinsames Auftreten haben. Es sei eher anzunehmen, dass es sich hier um Modifikationen einer Art handelt, besonders, wenn die morphologische Ähnlichkeiten in Betracht gezogen werden (Shaw and Crum, 1984).

Limpricht (1895) beschreibt die Anatomie von *M. elongata* mit einem kleinen, armzelligen und hyalinen Zentralstrang. Das Grundgewebe ist locker und dünnwandig, weist zur Randschicht kaum Unterschiede auf.

M. elongata bildet einen dichten Rasen von grünen bis blaugrünen, 0,5 – 4 cm hohen Gametophyten. Die lanzettlichen bis linealischen Blätter besitzen eine deutlich ausgebildete Mittelrippe, welche meist bis kurz vor die Blattspitze reicht bzw. bis in diese hineinläuft. Die Blattränder sind gesägt bis gezähnt. 1814 wurde sie von Mielichhofer in Salzburg auf der Schwarzwand als ein auf kupferhaltigen nassen oder berieselten Schiefergestein vorkommendes Moos beschrieben. *M. elongata* hat ein weites Verbreitungsgebiet auf der Nordhemisphäre, so kann es noch im arktischen Kanada gefunden werden (Brassard, 1969).

Die Gattung *Pohlia* wird nach Shaw (1989) nicht zu den bekannten Kupfermoosen gezählt. Nach den Arbeiten von Hörmann (2001) und Hus (2008) ist dies allerdings in Frage zu stellen. Auch andere Autoren, wie Folkesson and Anderssonbringmark (1988) beschreiben Arten der Gattung *Pohlia* auf Schwermetallstandorten. So wird zum Beispiel *Pohlia nutans* auf Standorten mit sehr hohen Nickel- und Kupfergehalten (z.B. Ontario, Schweden) in hoher Dichte auftretend beschrieben. Außerdem wird ein extrem gutes Wachstum auf feuchtem und sehr saurem Untergrund (pH<3,5) beschrieben (Dykeman and De Sousa, 1966).

Pohlia drummondii zählt nach Frahm and Frey (2004) zur *Pohlia annotina* agg.. Sie kommt auf feuchten sandigen Böden vor und bildet 1 – 4 cm hohe lockere bis dichte Rasen aus. Die Stämmchen sind grün bis rötlich. Sie ist überwiegend steril und bildet rotbraune Bulbillen in den oberen Blattachseln aus. Die Blätter sind eiförmig bis lanzettlich und besitzen eine am Blattgrund leicht verbreiterte Mittelrippe, welche häufig schon vor der Blattspitze endet. Die Blattzellen sind dünnwandig und linear rhombisch.

Das aquatische Lebermoos *Scapania undulata* kommt am Naturstandort in 2 Farbvarianten vor, einer grünen und einer roten. Nach Vincent et al. (2001) kann bei dieser Lebermoosart eine Anreicherung von einer ganzen Reihe von Schwermetallen festgestellt werden: Fe, Al, Pb, Mn, Cu, Cd und Zn. Der Anreicherungsfaktor nimmt dabei von Fe nach Zn in dieser Liste ab.

3.5 In vitro Kultur

Die Kultivierung und Züchtung von Pflanzen basiert auf der von Haberlandt 1902 postulierten Totipotenz der Pflanzenzelle. Das bedeutet, dass pflanzliche Zellen die Fähigkeit behalten neue Gewebe zu bilden. So konnte er damals aus Zellen des Palisadenparenchyms eine neue Pflanze ziehen. In der Bryologie fand die Kultivierung auch bald ihre Anwendung, da sie die Möglichkeit eröffnete verschiedenste Stufen des Wachstums genauer zu untersuchen und Auswirkungen von Temperatur und Nährstoffen zu dokumentieren.

Schon 1903 untersuchte Benecke (1903) das Wachstum von Moosen in Flüssigkulturen. Pringsheim (1921) legte erste sterile Kulturen auf Agar von *Leptobryum piriforme* (L.) Schpr. an. Die Kultivierung von Moosen auf Agarplatten wurde für die Forschung bald

zum Standard. So wurden mit dieser Methodik das reversible Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystem (Bauer and Mohr, 1959) nachgewiesen, der Einfluss von Phytohormonen (Jahn, 1964b), (Jahn, 1964a), (Bopp and Brandes, 1964), (Iwasa, 1965), Temperatur und Licht (Furness and Grime, 1982), (Chopra and Bhatla, 1981), (Nebel and Naylor, 1968) und verschiedenen Nährstoffen (Mehra and Pahwa, 1976), (Kato et al., 1980) beschrieben. *Physcomitrella patens* ist derzeit das am häufigsten verwendete Laubmoos in der *in vitro* Kultur und wird als Modelorganismus verwendet (Cove and Knight, 1993). Da ihr Genom sequenziert ist (Reski, 1999), können damit auch viele molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden.

Basierend auf den Erkenntnissen der vorangegangenen Arbeiten (Saukel, 1980, Hörmann, 2001 und Hus, 2008) war nun die Motivation da, in der vorliegenden Arbeit im speziellen auf die Frage nach der Aufnahme der beiden Schwermetalle Eisen und Kupfer durch das Lebermoos *Scapania undulata* und die beiden Laubmoose *Pohlia drummondii* und *Mielichhoferia elongata* einzugehen. Hierfür war es notwendig diese unter kontrollierbaren Bedingungen dem Stress der Schwermetalle auszusetzen; d.h. sterile *in vitro* Kulturen anzulegen. Die Aufnahme der Schwermetalle wurde anschließend mithilfe des EDX Systems im Rasterelektronenmikroskop untersucht. Zusammen mit den Ergebnissen von Hus (2008) sollte ein genaueres Bild bezüglich der Schwermetall-Thematik bei den Moosen gewonnen werden.

4 Material und Methode

4.1 Material

Das verwendete Moosmaterial wurde von der Schwarzwand (Sbg.) gesammelt. Die Moose werden in Plastikkisten aufbewahrt und in dieser Zeit nur mit Aqua. dest. feucht gehalten.

4.2 *In vitro* Kultivierung

4.2.1 Sterilisation: Um eine pilz- und bakterienfreie Kultur der Moospflanzen zu erhalten, ist es notwendig, vorher deren Oberflächen zu sterilisieren. Es wurden 3 verschiedenen Ansätze durchgeführt und auf ihre Wirkung in Bezug auf die Abtötung vorhandener Pilze und Bakterien sowie ihre Verträglichkeit für Moose getestet (als Kultivierungsmedium wurde das Knopmedium verwendet, siehe Kulturmedien).

4.2.1.1 HgCl₂: Es wird eine Stoke-Lösung mit 2.5g/100 ml hergestellt. Diese wird vor der Verwendung 1:100 verdünnt. Die Spitzen der Moospflanzen werden für eine Minute in diese Lösung gelegt und anschließend 3x je 2 Minuten in Schalen mit autoklaviertem H₂O ausgewaschen.

4.2.1.2 Danchlor: Die Hypochlorid-Lösung wird mit einem handelsüblichen Danchlor hergestellt. Dieses wird 1:10 verdünnt und auf 100 ml 3 Tropfen Triton X-100 dazu gegeben. Die Moospitzen werden für 5 Minuten eingelegt und wie beim HgCl₂-Ansatz 3x für jeweils 2 Minuten in autoklaviertem H₂O ausgewaschen.

4.2.1.3 H₂O₂: Hier wurde eine 3% H₂O₂-Lösung, wie sie im Handel erhältlich ist verwendet. Die abgeschnittenen Moose werden für 10 Minuten in die Lösung gelegt und anschließend auf die Nährmedien aufgebracht.

4.2.2 Kulturmedien: In der Literatur sind verschiedene Kompositionen von Nährmedien für die Kultivierung von Moosen zu finden. Fünf verschiedene Medien wurden getestet. Für die einzelnen Nährstoffe wurden Stoke-Lösungen von 100:1 hergestellt. D. h. für 100 ml Medium wurde je 1 ml der Stoke-Lösungen verwendet. Die Nährmedien wurden in Erlenmayerkolben (200 bis 500 ml, je nach Menge) hergestellt. Der pH für die Medien betrug 5.8 und wurde mit HCl bzw. KOH eingestellt. Vom Agar wurden 0,8 g pro 100 ml Medium dazugegeben und dieses anschließend am Magnetrührer erhitzt, bis der Agar vollständig gelöst war. Die Kolben wurden mit Watte und Alufolie verschlossen und nach dem Abkühlen im Autoklaven für 20 Minuten bei 120°C autoklaviert. Die sterilen Medien wurden, da fest, in einer Mikrowelle so lange erhitzt, bis sie wieder flüssig waren und in die sterile Werkbank eingeschleust. Die Hälse der Kolben wurden abgeflammt und anschließend die Medien in Plastikpetrischalen (Durchmesser 5 cm) gegossen. Nach dem Erstarren des Mediums konnten die Moosstämmchen auf den Agar aufgebracht werden; bzw. wurden die Platten in ihren Plastiksäcken steril verschlossen und im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Medien wurden folgende Zusammensetzungen verwendet:

4.2.2.1 Heller: Nach Heller (1953): 250 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 75 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 750 mg/l KCl, 600 mg/l NaNO_3 , 125 mg/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

4.2.2.2 BCD: Nach Ashton & Cove (1977): 246,47 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 244,96 mg/l KH_2PO_4 , 12,5109 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,011 mg/l KNO_3 , 0,055 mg/l CuSO_4 , 0,055 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,618 mg/l H_3BO_3 , 0,024 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,395 mg/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,028 mg/l KJ, 0,064 mg/l $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

4.2.2.3 MS: Medium nach Murashige und Skoog (1962)gemischt: 1650 mg/l NH_4NO_3 , 370 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 170 mg/l KH_2PO_4 , 440 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1900 KNO_3

4.2.2.4 Knop: Es wurde ein nach R. Reski und W.O. Abel (1985) abgewandeltes Knop Medium (Bopp and Brandes, 1964) verwendet: 250 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 250 mg/l KH_2PO_4 , 250 mg/l KCl, 1000 mg/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 12.5 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

- 4.2.2.5 Benecke:** Medium nach Benecke (1903), abgeändert nach Gang (Gang et al., 2003). 200 mg/l NH_4NO_3 , 100 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 400 mg/l KH_2PO_4 , 100 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 μM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 4.2.3 Schwermetallmedien:** Um die Wirkung von Eisen und Kupfer auf die Moose zu untersuchen, wurden die Medien mit Fe- und Cu-EDTA in den Konzentrationen 0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 0,1 mM, 1 mM, 10 mM und 0,1 M versetzt. Dazu wurde von beiden Schwermetallen eine 1 M Stoke-Lösung hergestellt
- 4.2.4 Kulturbedingungen:** Da jede Pflanze bei bestimmten Bedingungen ein Wachstumsoptimum besitzt, ist es wichtig die individuellen optimalen Licht- und Temperaturverhältnisse experimentell zu ermitteln. Die Vergleiche mit der Literatur (Furness and Grime, 1982) geben hierbei schon eine gewisse Richtung vor, allerdings ist dadurch eine gewissenhafte Untersuchung nicht zu ersetzen. Leider waren die vorhandenen Einrichtungen für diese genauen Untersuchungen nicht gegeben.
- 4.2.5 Kultivierung auf Cellophanpapier** nach (Jahn, 1964a): Um störende Agarrückstände bei der mikroskopischen Betrachtung an Protonemafäden zu vermeiden, wurden auf einige Agarplatten Cellophanpapier nach vorhergehender Sterilisation in H_2O_2 über Nacht gelegt. Auf dieses wurde dann jeweils ein Stämmchen eines Moooses aufgebracht.
- 4.2.6 Dokumentation:** Das Wachstums wurde mit Fotos festgehalten. Es wurden dazu eine Canon EOS 20D, Objektiv Digital Zoom 28-80 mm bzw. Olympus E 330, Objektiv Zuiko Digital 14-45 mm, 1:3,5 – 5,6, verwendet.

4.2.7 Zusätzliche Präparation für die Mikroskopie: Die Methodik von Mole Bajer and Bajer (1968) abgewandelt nach Jensen (1981) wurde hier angewendet. Auf einem Deckglas wird ein Tropfen noch flüssiges Nährmedium aufgetragen. Ist dieses abgekühlt, werden einige Protonema Fäden aufgelegt. Meinerseits erfolgte nur eine geringfügige Abwandlung, da statt wie in den angeführten Arbeiten nicht ein Draht verwendet wurde, um das warme Medium auf ein Deckglas aufzubringen, sondern eine 100 µl Pipette. Auf das Medium wurden anschließend Protonemazellen inokuliert. Das fertig präparierte Deckglas wurde dann mit dem Medium nach unten auf eine Agarplatte gelegt, in welche vorher eine kleine Mulde gemacht wurde. So wird verhindert, dass es zu Austrocknungserscheinungen kommt. Die Petrischalen wurden bis zur weiteren Behandlung im Kulturschrank belassen. Die so präparierten Protonemazellen wurden zur Untersuchung des Spitzenwachstums der Caulonemazellen verwendet.

4.3 AAS zur Bestimmung des löslichen Metallanteiles

Es wurden 2 verschiedene Ansätze durchgeführt: beim ersten wurden in 25 ml Kolben je 10 ml Nährboden gefüllt. Beim zweiten 60 ml in 100 ml Kolben, dieser wurde nach dem Erstarren zerstückelt um die Oberfläche zu vergrößern. Untersucht wurden folgende Nährböden: Cu-EDTA, CuSO₄ und CuCl₂ mit den Konzentrationen 0,1 M und 0,01 M. Es wurden Aufschlüsse mit H₂O (24 h geschüttelt), NH₃NO₄ (3 h) und Königswasser (bis sich der Nährboden vollständig gelöst hat) gemacht. Die Lösungen wurden vor dem Messvorgang filtriert und falls nötig noch entsprechend verdünnt.

4.4 Elementanalyse - EDX

4.4.1 Probenvorbereitung: Die Moospflänzchen wurden über dem Agar abgeschnitten und bei 50°C für 24 Stunden luftgetrocknet. Anschließend wurden sie mit Leitkohle auf Stubs befestigt. Die Leitkohle wurde bei Bedarf mit Lösungsmittel versetzt damit sie die richtige Konsistenz bekommt. Es musste einerseits darauf geachtet werden, dass die Moose einen guten Kontakt mit der Unterlage bekamen, aber gleichzeitig durften sie nicht in die Leitkohle einsinken. Damit das ganze Lösungsmittel abdampfen kann, wurden die fertig präparierten Stubs in einen Trockenschrank bei 50°C für mindestens eine Stunde gestellt.

4.4.2 Messung: Die Messung erfolgte mit der energiedispersiven Röntgenmikroanalyse an einem Rasterelektronenmikroskop (Philipps XL 20). Die Einstellungen waren: Arbeitsabstand 12; 30kV; Tilt 15; Take off Angle 27,21; Death Time ~30%; Lsec 100. Die Daten wurden mit dem Programm EDAX-Genesis gesammelt. Es wurden bei den Messungen die Elemente C, O, Na, Mg, Si, P, S, Cl, K, Ca, Fe und Cu berücksichtigt.

4.4.3 Auswertung: Die somit erhaltenen Daten wurden aus dem Genesis Programm heraus gelesen und in eine Excel Tabelle überführt. Für die statistische Auswertung wurde SPSS verwendet. Zunächst werden die Daten auf Normalverteilung hin untersucht. Wenn diese gegeben war konnten die Werte mittels ANOVA verglichen werden, andernfalls wurde der nichtparametrische Test nach Kruskal-Wallis zum Vergleich herangezogen. Werte mit einer Signifikanz von ,05 wurden als solche akzeptiert, Werte mit einer Signifikanz von kleiner als ,01 wurden als hoch signifikant und Werte kleiner als ,001 als sehr hoch signifikant angegeben.

4.5 Cytologische Untersuchungen

4.5.1 Neutralrotfärbung: Mit dieser Methode sollen saure Kompartimente der Zelle sichtbar gemacht werden. Aus dem Pulver wurde mit deionisiertem Wasser eine 0.1% Lösung hergestellt und der pH-Wert auf 7 und pH 4 eingestellt. Einzelne Blätter, Stammstücke sowie Protonemafäden wurden in einen Tropfen Neutralrot auf den Objektträger gelegt und anschließend im Lichtmikroskop (Olympus BX41) untersucht.

4.5.2 Fluoreszenzfarbstoffe: Die folgenden verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe wurden im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop untersucht. Um die mögliche Eigenfluoreszenz der Präparate zu ermitteln wurde ein Lambda-Scan mit den unbehandelten Zellen durchgeführt. Das Detektionsfenster umfasste dabei 20 nm. Der Scan umfasste die Bandbreite von 495 bis 750 nm bei 50 Schritten. Zur Anregung wurde die Wellenlänge bei 488 nm bei 45% Intensität verwendet.

4.5.2.1 Bei **DiOC₆** handelt es sich um einen Membranfarbstoff, der sich in Membranen einbaut, die ein Membranpotential aufweisen. Das ist der Fall bei der Kernhülle, den Plastiden, den Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Reticulum (ER). Da bei Schädigung der Membran, zum Beispiel durch Schwermetalle, das Potential zusammenbricht, kann mit DiOC₆ auch auf den Zustand der Zelle geschlossen werden. Es wurde aus einer Stoke-Lösung eine 5 µg/l Lösung hergestellt und die Pflänzchen für 10 Minuten eingelegt. Ohne Auswaschen werden die Objekte auf einen Objektträger gelegt und mit Vaseline versiegelt. Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Laser auf 50%) wurden die Detektionsfenster für DiOC bei 501-553 nm und für die Eigenfluoreszenz der Chloroplasten der Blattzellen bei 645-665 nm gewählt.

4.5.2.2 Rhodamin123: Es wurde eine 1mg/ml H₂O Stoke-Lösung hergestellt. Aus dieser wurden 5 µg/ml Arbeitslösungen hergestellt. In diese Lösungen wurden die Pflänzchen für 5 Minuten eingelegt. Danach in dest. Wasser ausgewaschen. Die Objekte wurden mit Vaseline versiegelt. Da keine Voreinstellungen für Rhodamin123 vorhanden waren, wurde zuerst ein Lambda-Scan durchgeführt. Bei einer Anregung mit 488 nm (40%) konnte ein Maximum im Bereich von 526 bis 550 nm ermittelt werden.

4.5.2.3 FM: Bei diesem Versuch soll die Aufnahme des Farbstoffes FM1-43 untersucht werden. Dazu wurde eine 16 μM Stoke-Lösung mit dem Medium 1:1 gemischt. In dieses Gemisch, 8 μM FM1-43, wurden Protonemafäden gelegt. Im CLSM wurde zuerst das Detektionsfenster für den Farbstoff mittels Lambda-Scan festgestellt. Es wurde für die nachfolgenden Aufnahmen bei 580-600 nm eingestellt. Die Detektion für die Autofluoreszenz der Chloroplasten in den Protonemazellen wurde bei den Wellenlängen von 670-710 nm vorgenommen. Für die Pulse-Färbung wurden die Protonemafäden für 5 Minuten in den Farbstoff eingelegt und danach ausgewaschen. Alle 5 Minuten wurde ein Bild aufgenommen.

4.5.3 Protonemawachstum: Um das Wachstum des Protonemas zu dokumentieren und Vergleiche zwischen dem Wachstum in schwermetallfreiem und belastetem Medium anstellen zu können, wurden von Kontrollplatten Stämmchen mit Protonemafäden in flüssiges Medium überführt. Von diesen Kulturen wurde neues Protonema auf einen Objektträger mit einem Tropfen flüssigem Medium gelegt.

4.5.3.1 Längenmessungen: Die Zellenlängen der Protonemafäden werden im Cell-D Programm vermessen. Es wird dabei auf mögliche Unterschiede zwischen Chloronemata und Caulonemata sowie die Spitzenzellen und deren Nachbarzellen besonderes Augenmerk gelegt. Die Messungen erfolgten nach 4 Wochen Kultivierung. Danach wurde das Medium erneuert und bei späteren Messungen mittels statistischen Vergleichs sichergestellt, dass die beiden Messgruppen gleich sind. Die so gesammelten Daten wurden im SPSS statistisch ausgewertet.

4.5.3.2 Spitzenwachstum der Caulonemazellen: Die mit dem Protonema inokulierten Deckgläser wurden auf einen Objektträger gelegt und mit Vaseline umschlossen um eine Austrocknung des Präparates zu verhindern. Die so präparierten Objekte wurden im Olympus BX41 untersucht. Um das Wachstum zu dokumentieren wurde im Cell-D Programm die Funktion „Schnelle Bildaufnahme“ verwendet. Das Aufnahmeintervall betrug 5 Minuten und die gesamte Aufnahmelänge 10 Stunden. Es wurde eine geringe Lichtstärke (1,5 am Einstellrad) gewählt, um den Lichtstress zu vermindern. Die aufgenommenen Bilder wurden einerseits als Einzelbilder, andererseits als Video (avi-Datei) abgespeichert. Zur Auswertung des Wachstums wurde der Zuwachs pro 20 Minuten vermessen. Dazu wurde dieser von den Einzelbildern auf eine Klarsichtfolie übertragen und mit einem Lineal vermessen. Die ermittelten Werte wurden im SPSS statistisch ausgewertet.

4.5.4 Resistenzversuche: Blättchen von *P. drummondii* und *M. elongata* wurden sowohl von Kontrollplatten entnommen und für 48 Stunden in Cu- und Fe-EDTA-Lösungen in den Abstufungen von 1 M, 10^{-1} bis 10^{-9} M sowie in aqua dest. (Kontrolle) in Schnappdeckelgläser eingelegt. Bei den Kupferansätzen wurden auch Moose von 10 mM Cu-Platten entnommen um mögliche Veränderungen der Resistenz zu untersuchen. Nach 48 Stunden wurden die Blättchen in einer 0,8 M D-Mannitol Lösung für mindestens 10 Minuten eingelegt um eine Plasmolyse auszulösen. Falls eine Plasmolyse festgestellt werden konnte, kamen die Blättchen anschließend noch in eine 0,3 M D-Mannitol Lösung, wiederum für ca. 10 Minuten, um eine Deplasmolyse zu bewirken. Um die Plasmolysen bzw. die Deplasmolysen festzustellen und zu dokumentieren, wurden mit den Blättchen Präparate hergestellt, welche im Olympus BX41 und im Reichert Univar untersucht wurden. Die Bilder sind in beiden Fällen im Cell-D Programm erstellt worden.

4.6 Präparation für REM Bilder: Stämmchen von *P. drummondii* (Kontrolle und 24 mM Cu) und *M. elongata* (Kontrolle und 0,1 M Cu) wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dazu wurden 1,5 ml Eppendorfgefäße in einem Styroporbehälter fixiert, in welches der flüssige Stickstoff gefüllt wurde. Die abgeschnittenen Stämmchen wurden mit einem Zahnstocher in die Eppendorfgefäße transferiert. Die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -20°C. Während des Transfers auf das Botanische Institut am Rennweg wurden die Proben auf Trockeneis gelagert. Dort wurden sie unter Hilfestellung von Dr. Vogelmayr in einem Gefriertrockner getrocknet.

4.7 Anatomische Präparate: Um anatomische Schnitte herzustellen, wurden zur Fixierung ganze Stämmchen in ein Gemisch aus Methanol (abs.), Formaldehyd (40%) und Eisessig (1:1:1) überführt. Entnommen wurde die Zusammensetzung dieses sog. Pfeiffers Gemisches aus (Gerlach, 1984). Die Stämmchen wurden im Gemisch für 20 Stunden in den Kühlschrank gestellt. Die fixierten Stämmchen wurden anschließend zweimal in 30% Alkohol gewaschen, danach für 15 Minuten in 30% Alkohol, dann für 30 Minuten in 50%igen, für 60 Minuten in 70%igen und für 30 Minuten in 90%igen eingelegt. Nach der Entwässerung wurden die Stämmchen in das Zwischenmedium (Isopropanol) für 30 Minuten, danach in eine 1:1 Mischung von Isopropanol und Chloroform für ebenfalls 30 Minuten überführt. Danach wurden die Stämmchen zweimal in reines Chloroform eingelegt, jeweils bis diese untergehen. Die Stämmchen wurden über Nacht in eine gesättigte Chloroform-Paraffin-Mischung gelegt. Eine gesättigte Lösung wurde durch Schmelzen des gesamten Paraffins bei einer Temperatur über 57°C hergestellt. Die Stämmchen wurden zum Schluss zweimal für drei Stunden in reines flüssiges Paraffin überführt. Nach dem zweiten Überführen wurden die Stämmchen in flüssiges Paraffin gegeben und dieses schnell abgekühlt. Die festen Paraffinblöcke wurden getrimmt und auf einen Holzwürfel aufgeklebt. Die mit einem Schlittenmikrotom hergestellten Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgebracht. Dieser wurde zuvor mit Azeton entfettet und Eiweiß-Glycerin auf einer Fläche des Deckglases mit dem Finger oder Pinsel (fettfrei) aufgetragen. Auf diese Fläche wurde noch ein Tropfen Wasser gegeben und anschließend der Schnitt draufgelegt.

Um eine Streckung der Schnitte zu erzielen wurden die Objektträger kurz über eine Heizplatte gehalten (bis die Schnitte leicht glasig sind). Die so behandelten Objektträger wurden in einen Ofen bei ca. 40°C gelegt. Nach dieser Behandlung können die Schnitte lange Zeit bis zur weiteren Behandlung staubgeschützt aufbewahrt werden.

Um die Schnitte zu färben, mussten sie vorher vom Paraffin befreit werden. Daher wurden die Objektträger nach der Reihe zweimal in Orangenöl, danach in Orangenöl 50% und Propanol 50%, reines Propanol, Propanol-Ethanol 1:1 Gemisch, reines Ethanol (96%ig), 70% Ethanol, 30% Ethanol und in aqua dest. gestellt. Im ersten Schritt blieb der Schnitt so lange im Orangenöl, bis kein Paraffin mehr zu sehen war. Alle anderen Lösungen wurden in 5 Minuten Intervallen gewechselt. Vom aqua dest. wurden die Objekte in eine 0,02% Tuloidin-Blau Färbelösung überführt. In dieser blieben sie für 10 Minuten, anschließend wurden sie so lange in Aqua dest. gewaschen, bis es zu keiner Blaufärbung des Wassers mehr kam. Nach einer kurzen Kontrolle wurden alle Schritte in umgekehrter Reihenfolge wiederholt (ebenfalls in 5 Minuten Intervallen). Um schlussendlich ein Dauerpräparat zu erhalten, wurden die Objektträger vorsichtig mit einem Filterpapier vom restlichem Orangenöl befreit, ein Tropfen Kanadabalsam (Art.-Nr.: 10-0314; Ch. 041222) aufgetragen und mit einem Deckglas verschlossen. Bis der Kanadabalsam ausgehärtet war wurde darauf geachtet, dass der Objektträger waagrecht lag, damit das Deckglas nicht verrutschen konnte.

5 Ergebnisse

5.1 Oberflächensterilisation

Mielichhoferia elongata: Nach Oberflächensterilisation mit Danchlor waren die Pflanzen im Vergleich mit HgCl_2 anfälliger für Pilzbefall. So zeigte sich in allen drei Danchlor-Petrischalen Pilzbefall, hingegen war bei den vier untersuchten HgCl_2 -Petrischalen nur in zwei ein Pilzbefall. Die Verträglichkeit für das Pflanzenmaterial war allerdings genau umgekehrt. Es konnten nur in einer HgCl_2 -Petrischale noch grüne Explantate festgestellt werden. In allen anderen hatten diese ihr Chlorophyll bereits verloren. Im Danchlor-Ansatz fanden sich dagegen in allen Petrischalen mindestens 3 grüne Explantate.

Pohlia drummondii: Bei den Danchloransätzen waren 5.3% abgestorben, 2.6% zwar grün, aber ohne neue Triebe und 92% hatten neue Triebe entwickelt (n=75). Zu diesem Zeitpunkt war kein Pilzbefall zu sehen. Im Ansatz mit HgCl_2 waren 23.7% abgestorben, 23.7% von Pilzen befallen, 59.2% waren grün, mit nur wenig neuem Wachstum.

Scapania undulata: Die auf das Medium aufgebrachten grünen Blättchen hatten bei beiden durchgeführten Ansätzen ihr Chlorophyll verloren. So konnte als einziger Unterschied der beiden Sterilisationsmethoden, wie bei *M. elongata*, festgestellt werden, dass HgCl_2 besser gegen Pilzbefall wirkt als Danchlor. Hier fiel die Beobachtung deutlich aus, da beim HgCl_2 -Ansatz kein Befall, beim Danchlor-Ansatz dagegen von 5 Petrischalen 4 von Pilzen befallen waren. Da sowohl Danchlor als auch HgCl_2 bei *S. undulata* keine befriedigenden Ergebnisse erzielten, wurden hier zusätzlich noch H_2O_2 getestet. Dies stellte sich als deutlich schonender für das Moos heraus. So konnten einige lebende Exemplare erhalten werden. Zwar war auch hier der Prozentsatz von Infektionen immer noch sehr hoch, jedoch bestand hier eine gute Chance, dass es in einigen Fällen gelang eine sterile Kultur anzulegen.

5.2 Medientest für *P. drummondii* und *M. elongata*

Um ein geeignetes Kultivierungsmedium für die beiden Moose zu finden, wurden diese auf 5 verschiedenen Medien kultiviert. Diese waren das Medium nach Heller, BCD, MS, Knop und Benecke.

Die nachfolgenden Bilder zeigen das Wachstum von *P. drummondii* innerhalb 4 Wochen. Bei dem Medium nach Heller konnte in keinem Fall ein Wachstum festgestellt werden (Abb. 1 A; B). Auf BCD-Medium wuchsen sowohl die Protonemata- als auch Stämmchen, wobei das Protonemata allerdings wenig Seitenverzweigungen hatten (Abb. 1 C; D). Ähnliches gilt für die Moose auf MS-Medium. Das Wachstum der Protonemata ist hier bei manchen Pflanzen unwesentlich weiter fortgeschritten und es konnte auch ein verändertes Wachstum bei Ansätzen festgestellt werden, welche weniger bzw. keine gleichmäßige Lichteinwirkung erfahren haben (Abb. 1 E; F). Bei Knop (Abb. 1 G; H) war das Wachstum bezogen auf Stämmchen und Protonemata nicht so weit fortgeschritten wie bei den Ansätzen auf BCD- und MS-Medien. Beim Benecke-Medium (Abb. 1 I; J) waren die Stämmchen weniger gestaucht als beim BCD- und MS-Medium. Die Protonemata waren ebenfalls mehr ausgewachsen und weniger zentral um die Plantate lokalisiert. Auf diesem sind schon erste Knospen zu erkennen.

Für die Entscheidung, welches Medium für die weiteren Tests verwendet werden soll, waren zwei Faktoren ausschlaggebend. Erstens sollten keine der untersuchten Schwermetalle im Medium vorhanden sein, damit die Untersuchung nicht verfälscht wird, und zweitens sollte das Wachstum der Protonemata deutlich ausgebildet sein. Einerseits um dieses später besser untersuchen zu können, und andererseits kann bei den Moosen, welche sich neu aus dem Caulonema entwickeln, davon ausgegangen werden, dass sie wenig bis gar nicht mehr von dem Plantat beeinflusst werden und die aufgenommenen Substanzen aus dem Medium beziehen.

Da, anders als ursprünglich geplant, aufgrund neuer Erkenntnisse über die Zusammensetzung des Naturstandortes (Hus, 2008) nicht Cu- und Zn-Stress sondern Cu- und Fe-Stress untersucht werden sollten, konnten die Medien Knop und BCD wegen ihrer hohen Fe-Gehalte nicht in Betracht gezogen werden. Ebenfalls war das Heller-Medium, wegen des schon oben beschriebenen fehlenden Wachstums der Moose, nicht geeignet. So blieben nur noch MS und Benecke übrig. Obwohl das MS-Medium ein besseres Wachstum, bezogen auf die Moospflänzchen, zeigte, wurde doch das Benecke-Medium gewählt, da hier das Protonemawachstum besser ausgebildet war und auch von einer besseren oder zumindest schnelleren Neubildung von Moospflänzchen aus den entwickelten Protonemata ausgegangen werden kann, was für

weitere nachfolgende Untersuchungen von Bedeutung war. Zwar ist in der Zusammensetzung des Benecke-Mediums auch eine geringe Menge an Fe enthalten, diese wurde bei den weiteren Kultivierungen weggelassen und es konnte keine negative Auswirkung festgestellt werden.

Die Kultivierungsversuche mit *M. elongata* auf den fünf verschiedenen Medien zeigen für das Heller-Medium (Abb. 2 I) und BCD-Medium (Abb. 2 A; B) kein Wachstum bzw. nur ein schlechtes. Die drei restlichen Medien führten zu einem deutlichen Wachstum, was sowohl das Protonema als auch die Moose an sich betrifft. Auf dem MS-Medium (Abb. 2 C; D) weisen die Moose das kräftigste Wachstum auf. Die Moose wurden nach 31 und 64 Tagen fotografiert.

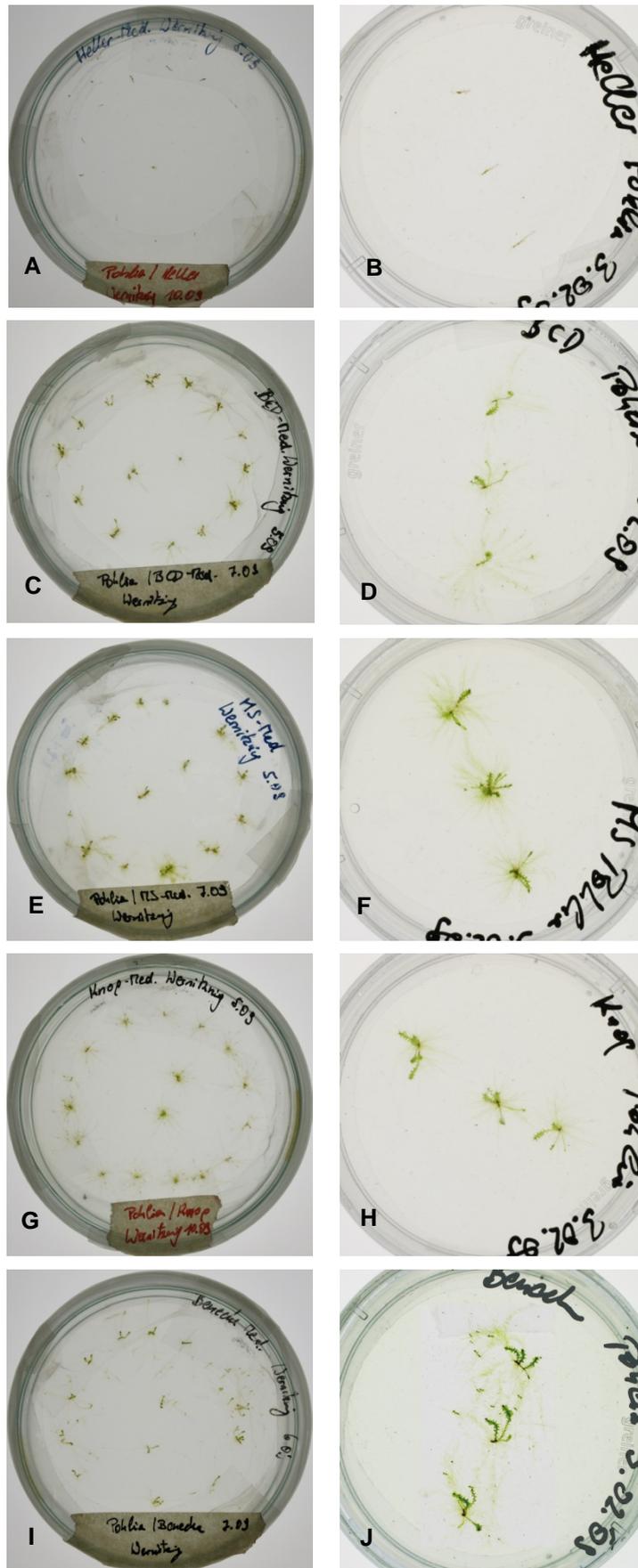


Abb. 1 *P. drummondii* Wachstum nach 4 Wochen; A,B Heller; C,D BCD; E,F MS; G,H Knop; I,J Benecke

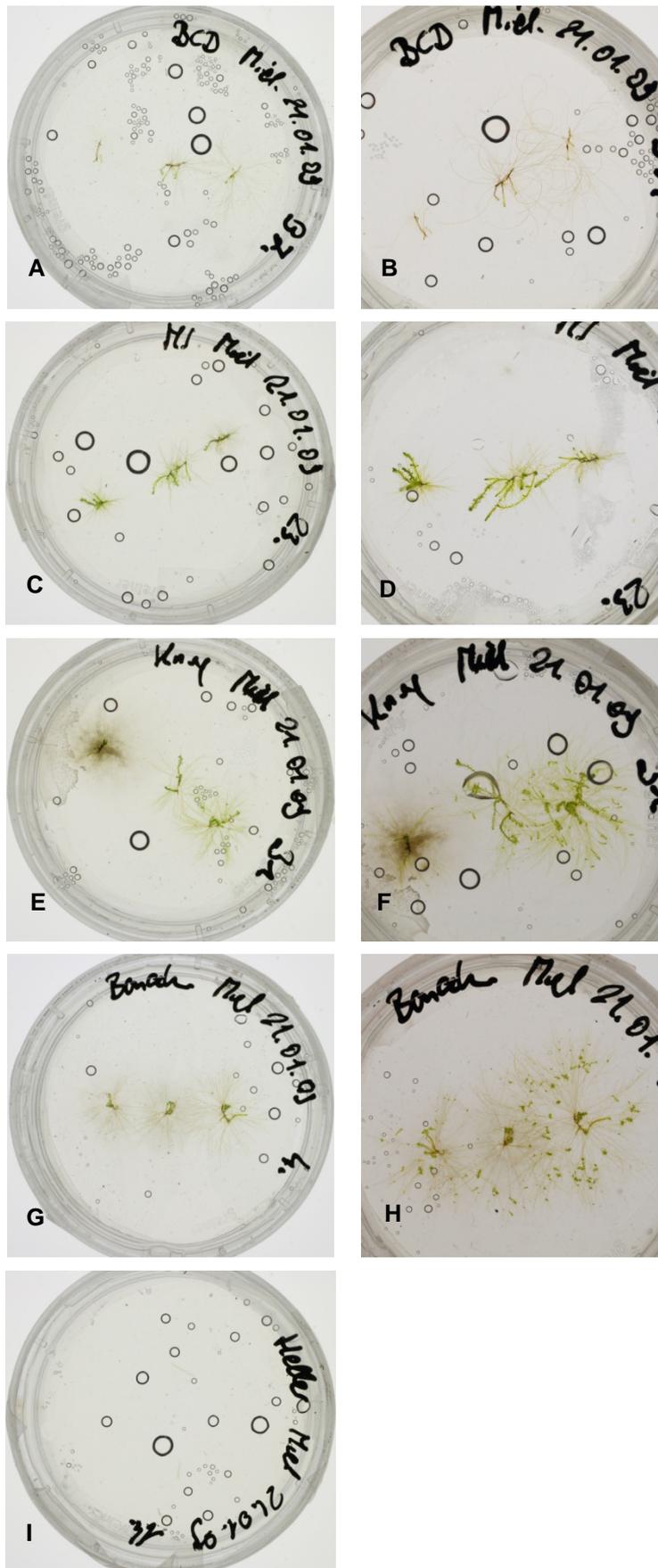


Abb. 2 *M. elongata* Wachstum nach 31 Tagen (A,C,E,G,I) und 64 Tagen (B,D,F,H); A,B BCD, C,D MS; E,F Knop; G,H Benecke; I Heller

5.3 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung im Labor zeigte für *P. drummondii* recht gute Resultate. Die Lichtbedingungen sind hier auch in einem guten Bereich; die Messungen ergaben durchschnittlich $48,08 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ bzw. $12,034 \text{ Watt}\cdot\text{m}^{-2}$. Die Temperatur ist hier über die zentrale Klimaanlage geregelt. In Abbildung 3 ist eine exemplarische Messung des Temperaturverlaufes dargestellt. Diese Temperaturen waren, bei Funktionieren der Klimaanlage, über das ganze Jahr gegeben.

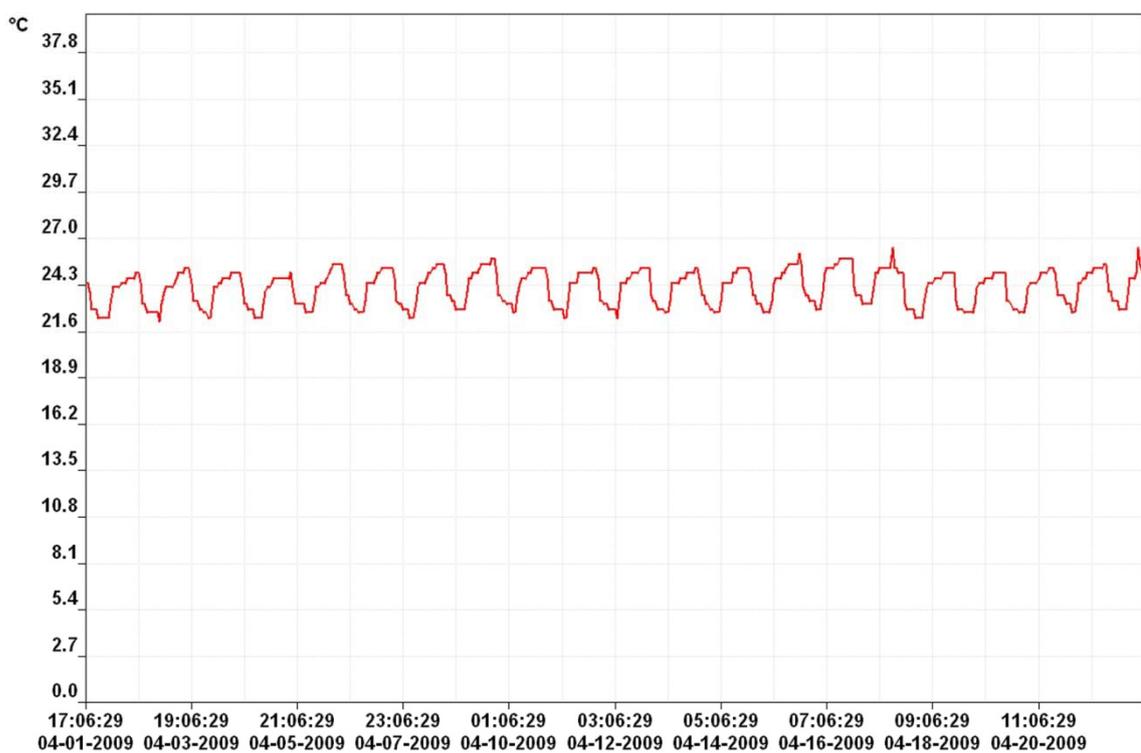


Abb. 3 Temperaturverlauf - Labor

Die Temperaturen im Glashaus waren hingegen niedriger und stellten sich für die Kultivierung von *M. elongata* als empfehlenswerter heraus. Allerdings sind im Glashaus höhere Temperaturschwankungen vorhanden und die tieferen Temperaturen sind nur in den Wintermonaten konstant. So sind z.B. im August auch Spitzenwerte von über 27°C zu messen (Abb. 4), hingegen im Jänner nur 16°C (Abb. 5).

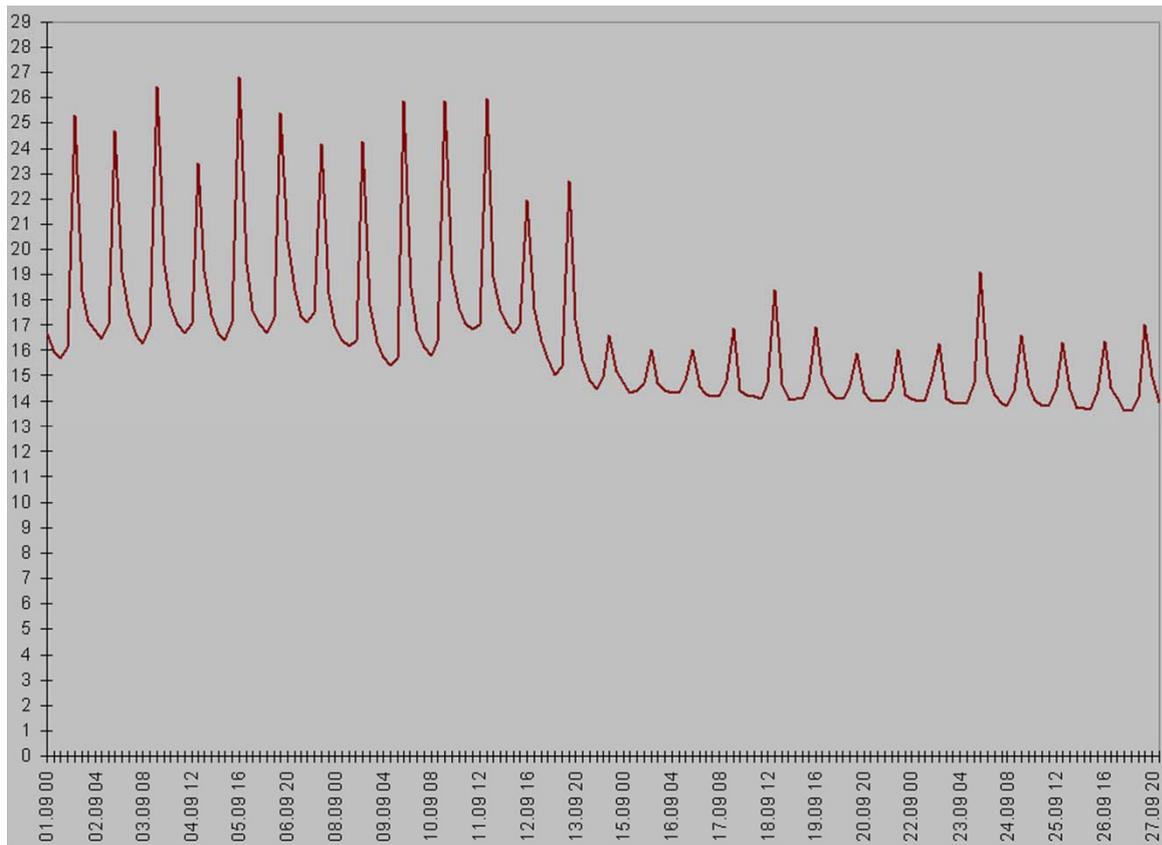


Abb. 4 Glashaustemperatur 1.09.08 bis 28.09.08

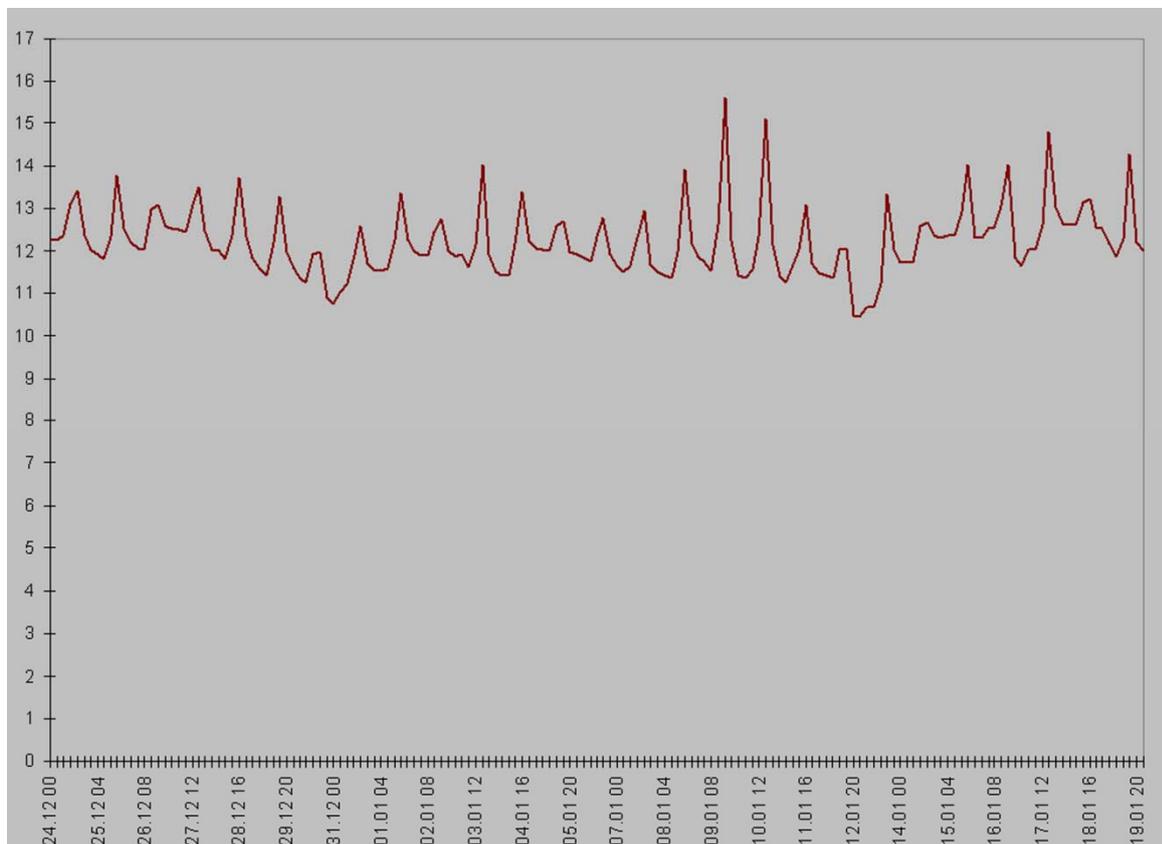


Abb. 5 Glashaustemperatur 24.12.08 bis 20.01.09

5.4 Resistenz auf Agarplatten

Die Wachstumsgrenzen von *P. drummondii* und *M. elongata* wurden durch die Kultivierung auf Agarplatten mit verschiedenen Konzentrationen (1 μ M bis 0,1 M) von Eisen und Kupfer bestimmt. Nach den ersten Ansätzen wurde für eine genauere Feststellung der Grenzen bei Kupfer noch Medien mit 13, 16, 24 und 31 mM getestet.

P. drummondii zeigte bei 0,1 M Kupfer kein Wachstum mehr. Bei 16 mM waren eine Verminderung bezüglich der Ausdehnung der Protonemata und Knospenbildung zu erkennen (Abb. 6 D-I). Allerdings war das Wachstum bei 24 mM (Abb. 6 J-O) wieder dem in der Kontrolle (Abb. 6 A-C) ähnlich. Bei den Moosen auf 31 mM wurden viele neue Knospen gebildet, welche zerstreut über die ganze Platte zu finden sind. Sie sind nicht im Kries anordnet, wie dies zum Teil bei 24 mM der Fall war.

M. elongata hatte im Vergleich zur Kontrolle bei den Konzentrationen 13 und 16 mM eine fast gleich große Ausdehnung der Protonemata, nur die Dichte so wie die Knospenhäufigkeit waren etwas reduziert (Abb. 8 B-D). Bei 31 mM war diese Reduzierung noch deutlicher zu sehen (Abb. 8 E-F). Hier war das Protonematawachstum auch geringer. Das Wachstum auf den 0,1 M Cu-Platten war schlussendlich deutlich verlangsamt (Abb. 8 G-H). Über einen längeren Zeitraum breiteten sich die Protonemafäden zwar über fast die gesamte Platte aus, allerdings kam es kaum zu neuen Knospenbildungen.

Die Grenze des Wachstums für Eisen lag bei beiden Moosen bei 1 mM (Abb. 7; 9). Bei dieser Konzentration wuchsen sie, vor allem *M. elongata*, deutlich langsamer als in den niedrigeren Konzentrationen. Hingegen war bei Kupfer eine höhere Toleranz vorhanden. Auch hier war bei den höchsten Konzentrationen eine Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit fest zu stellen.

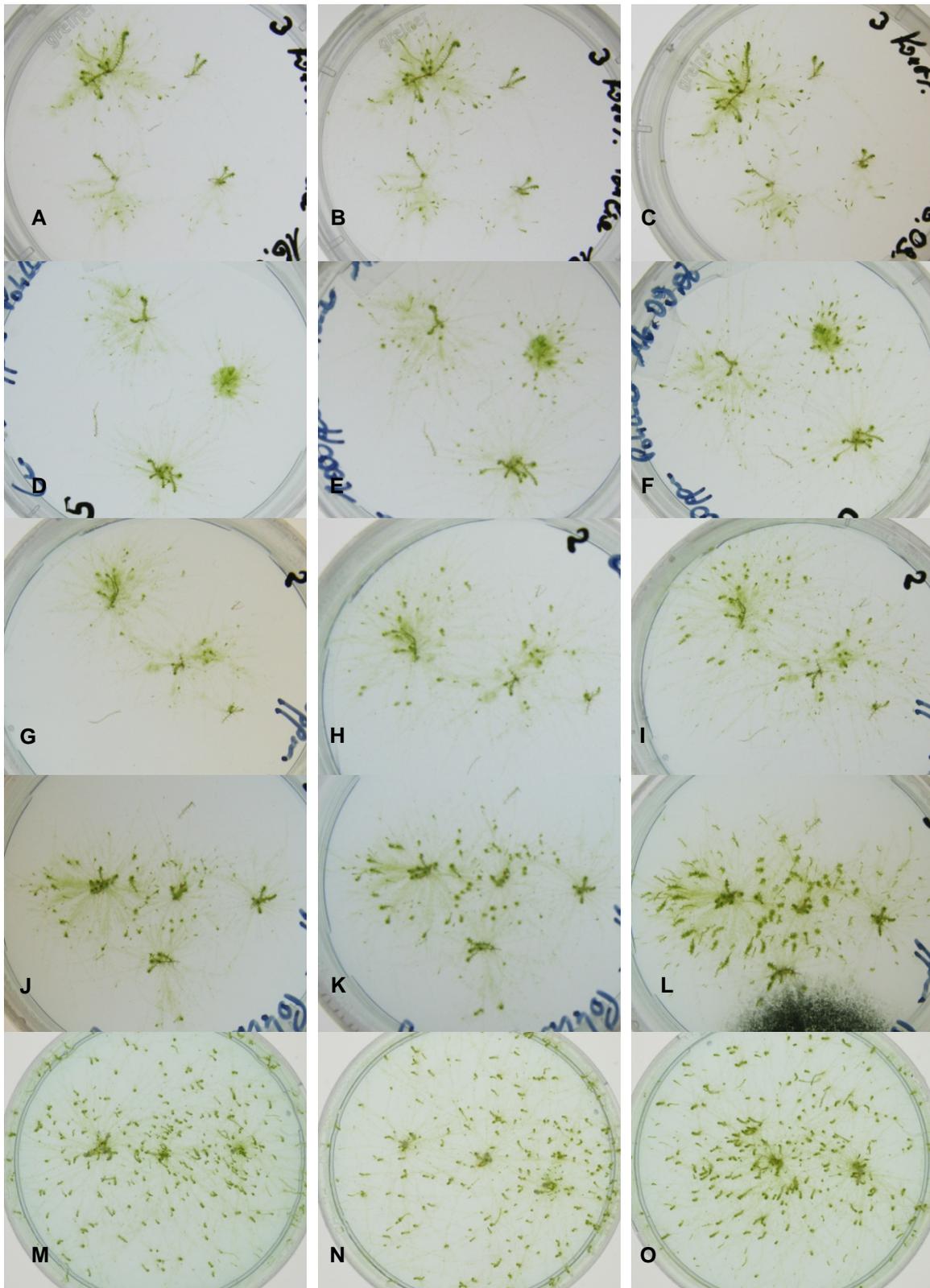


Abb. 6 *P. drummondii*; nach 37 Tagen (A,D,G,J); nach 44 Tagen (B,E,H,K); nach 51 Tagen (C,F,I,L,M,N,O); A-C Kontrolle; D-F 16 mM Cu; G-L 24 mM Cu; M-O 31 mM

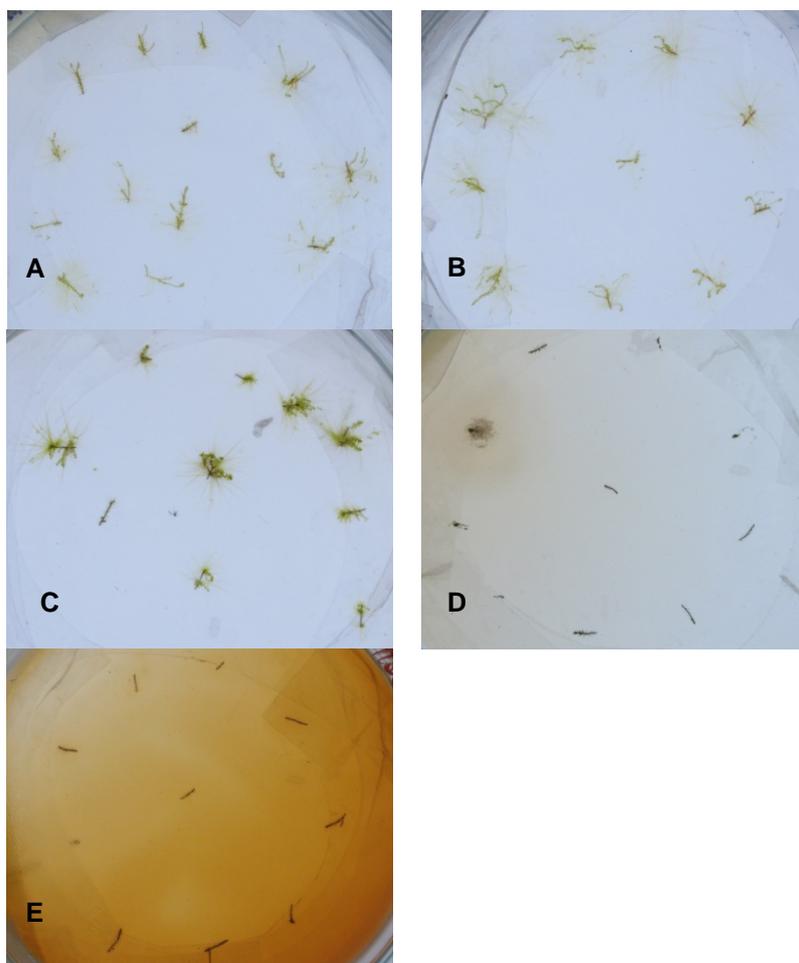


Abb. 7 *P. drummondii* A Kontrolle; B 100 µM Fe; C 1 mM Fe; D 10 mM Fe; E 0,1 M Fe

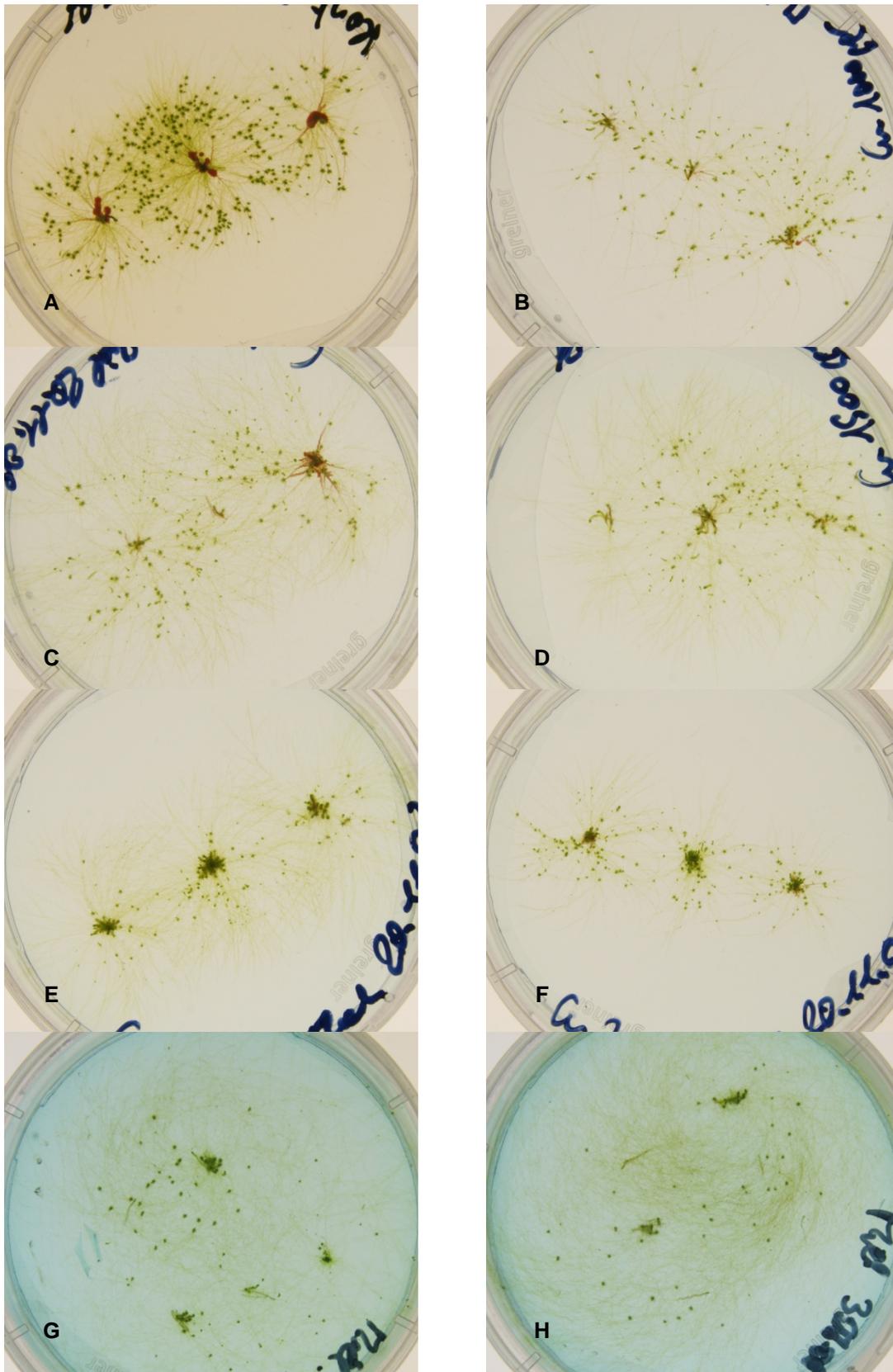


Abb. 8 *M. elongata*; nach 64 Tagen (A-F); nach 204 Tagen G,H); A Kontrolle; B-C 13 mM Cu; D 16 mM; E-F 31mM Cu; G-H 0,1 M Cu;

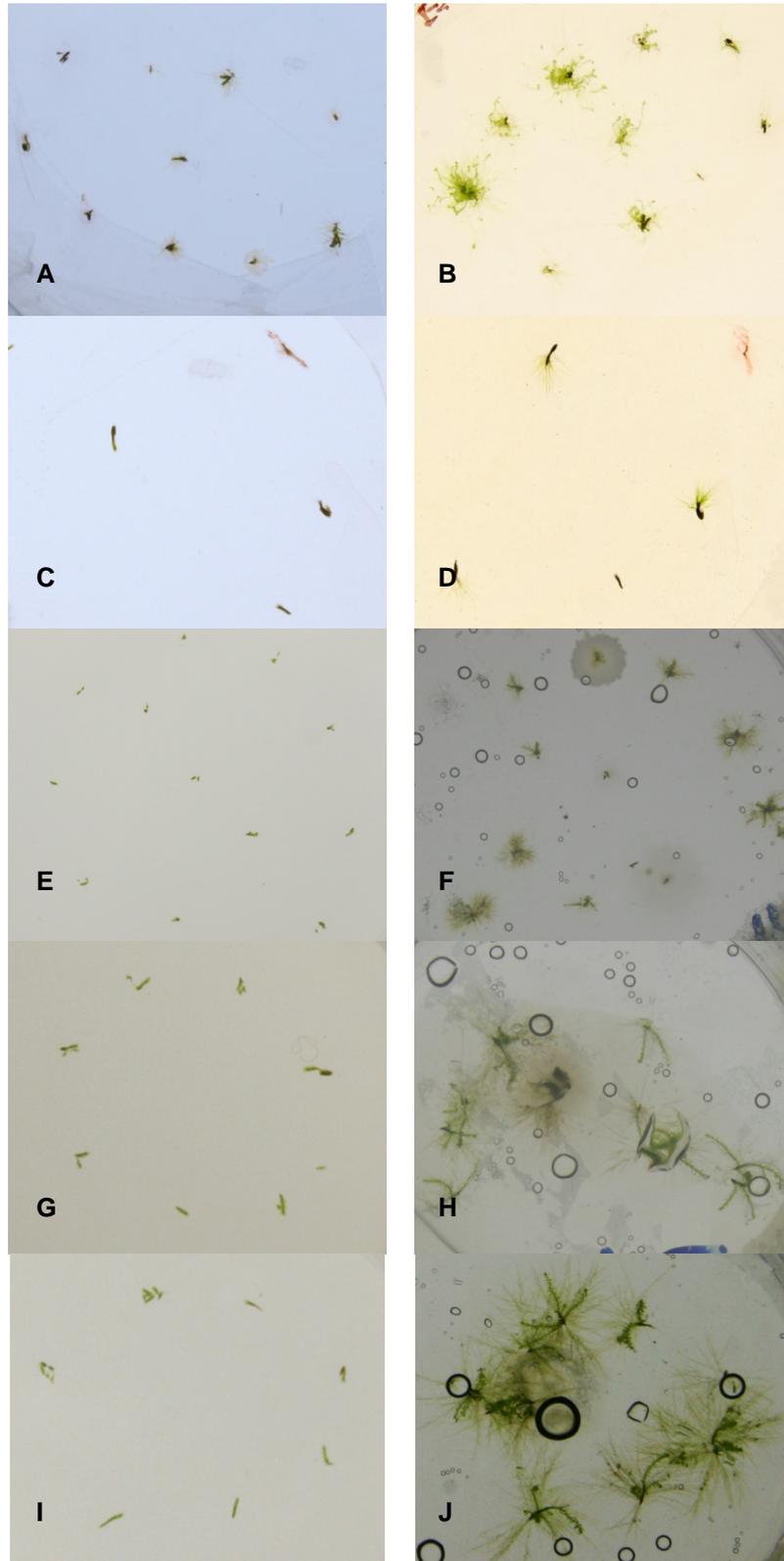


Abb. 9 *M. elongata* A,B 0,1 mM; C,D 1mM; E,F Kontrolle; G,H 0,1 mM; I,J 10 μ M

5.5 AAS des Agars

Hier wurden verschiedene Kupfersalze bezüglich ihrer Verfügbarkeit im Agar untersucht. Dazu sind Aufschlüsse mit H₂O, NH₄NO₃ und Königswasser hergestellt worden und anschließend in der AAS gemessen worden.

Die AAS Ergebnisse zeigten, dass mit EDTA im H₂O als auch im NH₃NO₄ Aufschluss die Verfügbarkeit des Kupfers höher ist als wenn SO₄²⁻ oder Cl⁻ als Gegenionen verwendet werden. Erst im Königswasseraufschluss wurde bei diesen beiden Gegenionen eine höhere Verfügbarkeit festgestellt (Tab. 1).

Medium	Konz.	Aufschluss	Messung 1	Messung 2	Mittel
Cu-EDTA	0,1 M	H ₂ O	47,76	55,31	51,54
		NH ₄ NO ₃	42,21	74,67	58,44
		Königswasser	74,63	76,51	75,57
	0,01 M	H ₂ O	63,62	41,47	52,54
		NH ₄ NO ₃	42,88	65,54	54,21
		Königswasser	78,80	71,81	75,31
CuSO ₄	0,1 M	H ₂ O	2,26	0,87	1,57
		NH ₄ NO ₃	4,67	3,87	4,27
		Königswasser	93,67	74,96	84,32
	0,01 M	H ₂ O	21,50	14,64	18,07
		NH ₄ NO ₃	47,09	37,45	42,27
		Königswasser	89,23	110,60	99,91
CuCl ₂	0,1 M	H ₂ O	0,23	0,19	0,21
		NH ₄ NO ₃	0,75	1,52	1,13
		Königswasser	81,75	58,51	70,13
	0,01 M	H ₂ O	12,97	11,58	12,27
		NH ₄ NO ₃	29,27	23,64	26,46
		Königswasser	140,72	94,84	117,78

Tab. 1 Vergleich der Kupferverfügbarkeit im Agar aufgrund der verschiedenen Gegenionen EDTA, SO₄²⁻ und Cl⁻; Angaben in % vom Ausgangswert

5.6 Elementanalyse – EDX

Die beiden Moose *P. drummondii* und *M. elongata* wurden mittels des EDX Systems im REM bezüglich der Elementverteilung untersucht. Dazu sind sie luftgetrocknet und mit Kohle bedampft worden. Nach Möglichkeit wurden in jeder Region - Spitze, Mitte und Basis - je 3 Blätter und ein Stämmchen gemessen. Die ermittelten Daten wurden mit SPSS statistisch ausgewertet

Die ermittelten EDX-Werte für *P. drummondii* zeigen eine Aufnahme des dargebotenen Kupfers. Allerdings konnte keine direkte Korrelation zwischen dem Gehalt im Moos und dem im Medium ermittelt werden. Der durchgeführte Test auf Normalverteilung zeigte nicht für alle Ansätze eine Normalverteilung. Daher wurde der Vergleich zwischen den verschiedenen Konzentrationen mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Dieser weist eine sehr hohe Signifikanz für Kupfer aus, weshalb noch einmal einzelne Gruppen unter Anwendung des Mann-Whitney-Tests miteinander verglichen wurden. Die Auswahl erfolgte nach dem Ergebnis eines erstellten Whiskas-Box-Plot Diagrams (Abb.10). So fanden sich signifikante Unterschiede in den Gehalten zwischen 0,1 mM und 1 mM ($p < ,001$), zwischen 10 mM und 13 mM ($p < ,001$) sowie zwischen 13 mM und 16 mM. ($p < ,001$). Somit ergibt sich für die Verteilung von Kupfer in *P. drummondii* folgendes Bild: bis zu einer Konzentration von 0,1 mM kann keine gesicherte erhöhte Aufnahme festgestellt werden, in den darüber liegenden schon. Moose, welche auf dem Medium mit 13 mM Cu-EDTA gewachsen sind, heben sich in dieser Gruppe wiederum mit einem signifikant höheren Wert ab. Diese Aufgliederung kann auch aus der Tabelle der Mittelwerte (Tab. 2) entnommen werden.

Medien	Cu (Mittelwert)	n
Kontrolle	0,0493 ± 0,0061	44
1 µM	0,0562 ± 0,0092	37
0,1 mM	0,0559 ± 0,0072	59
1 mM	0,1441 ± 0,0134	79
10 mM	0,2204 ± 0,0287	79
13 mM	0,7025 ± 0,1349	12
16 mM	0,2189 ± 0,0436	53
24 mM	0,1536 ± 0,0238	36

Tab. 2 Mittelwerte und Standardabweichung des Kupfers in *P. drummondii*

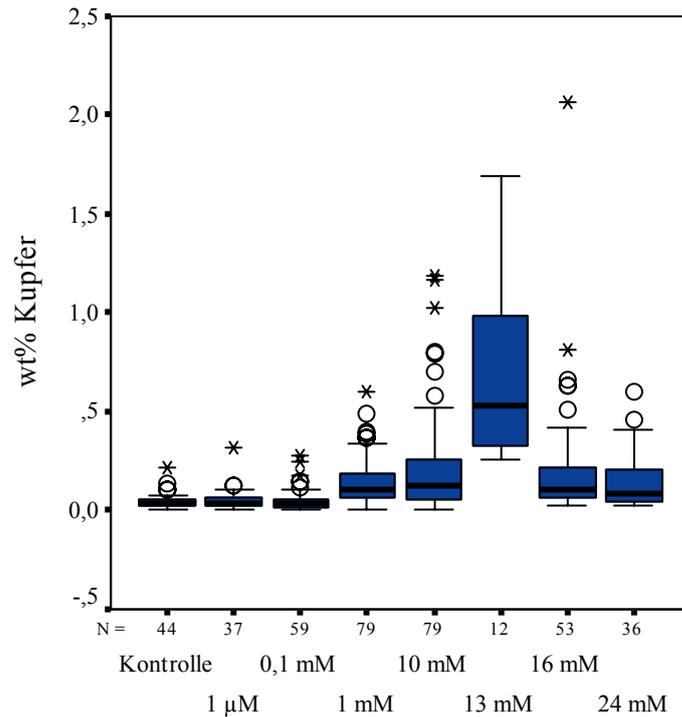


Abb. 10 Box-Plot der Kupferwerte für *P. drummondii*; Box = 50 aller Werte, Whiskas = alle Werte ohne Ausreißer, Strich = Median, Ringe = Ausreißer; Sterne = Extremwerte

Im Gegensatz zum Kupfer kann bei den Eisen-Werten keine verstärkte Aufnahme ausgemacht werden. Hier zeigte sich in der Kontrolle der höchste Durchschnitts-Wert (Tab. 3) und auch das erstellte Whiskas-Box-Plot Diagramm (Abb. 11) verdeutlicht dies.

Medien	Fe (Mittelwert)	n
Kontrolle	0,0958 ± 0,0077	45
1 µM	0,0723 ± 0,0031	47
10 µM	0,0932 ± 0,0116	25
0,1 mM	0,0592 ± 0,0047	12
1 mM	0,0824 ± 0,0036	55

Tab. 3 Mittelwerte und Standardabweichung des Eisens in *P. drummondii*

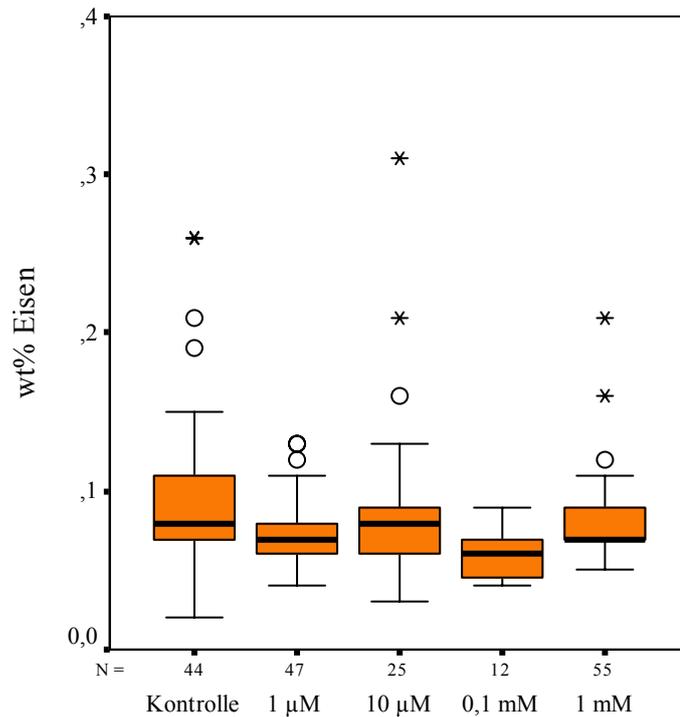


Abb. 11 Box-Plot der Eisenwerte für *P. drummondii*

Bei *M. elongata* zeigen die EDX-Werte für die Kupferaufnahme ein ähnliches Muster, wie bei *P. drummondii*. Da auch hier nicht in allen Fällen eine Normalverteilung vorlag, wurde wiederum ein Kruskal-Wallis-Test, sowie für eine Spezifizierung der Unterschiede ein Mann-Whitney-Tests durchgeführt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen 0,1 mM und 1 mM ($p < ,002$). Zwischen den höheren Ansätzen kann kein signifikant unterschiedlicher Kupfergehalt ermittelt werden. Es wird also genauso wie bei *P. drummondii* eine Aufnahme ab einer Konzentration von 1 mM Cu-EDTA erzielt (Tab. 4 und Abb. 12).

Medien	Cu (Mittelwerte)	n
Kontrolle	0,0296 ± 0,0042	23
1 µM	0,0239 ± 0,0089	23
0,1 mM	0,0709 ± 0,0173	22
1 mM	0,1712 ± 0,0423	26
10 mM	0,2409 ± 0,0348	32
0,1 M	0,2300 ± 0,0463	29

Tab. 4 Mittelwerte und Standardabweichung des Kupfers in *M. elongata*

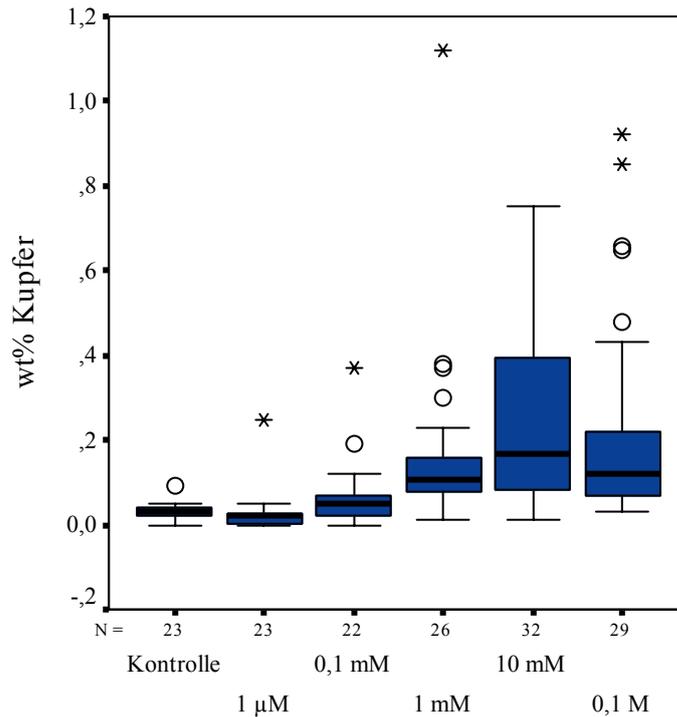


Abb. 12 Box-Plot der Kupferwerte für *M. elongata*

Der Vergleich des Gesamtgehaltes an Eisen in den Pflanzen bei den untersuchten Konzentrationen zeigt einen erhöhten Gehalt bei den Pflanzen, welche auf 1 mM Fe-EDTA gewachsen sind (Tab. 5). Die übrigen Ansätze konnten nicht voneinander unterschieden werden (Abb. 13).

Medien	Fe (Mittelwerte)	n
Kontrolle	0,0548 ± 0,0074	23
0,1 µM	0,0721 ± 0,0066	24
1 µM	0,0580 ± 0,0028	25
10 µM	0,0800 ± 0,0089	18
0,1 mM	0,0657 ± 0,0037	23
1 mM	0,1238 ± 0,0169	21

Tab. 5 Mittelwerte und Standardabweichung des Eisens in *M. elongata*

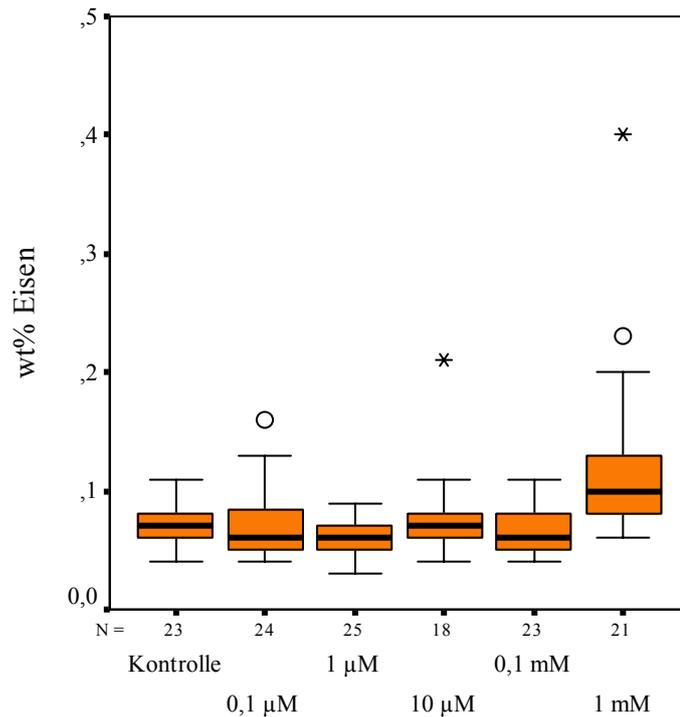


Abb. 13 Box-Plot der Eisenwerte von *M. elongata*

Wenn die EDX-Daten nun hinsichtlich der Verteilung innerhalb der Moose aufgliedert werden, zeigt sich folgendes Bild bei den Kupferansätzen von *P. drummondii* (Tab. 6). In den Konzentrationen 1 µM, 10 mM, 13 mM und 16 mM kann keine Unterscheidungen zwischen den drei untersuchten Regionen gemacht werden. In der Kontrolle (Abb. 14) kann zwischen den drei Regionen, Basis, Mitte und Spitze nur zwischen Spitze und Mitte eine signifikante Unterscheidung getroffen werden. Bei 0,1 mM (Abb. 15) ist eine Trennung der Basis von der Mitte und der Basis von der Spitze möglich. Die Basis kann von der Spitze bei 1 mM (Abb. 16) sowie bei 24 mM (Abb. 17) mit hoher Signifikanz getrennt werden.

Cu Medien	Basis	Mitte	Spitze	n
Kontrolle	0,0613 ± 0,0098	0,0420 ± 0,0134	0,0431 ± 0,0064	15/15/16
1 µM	0,0477 ± 0,0122	0,0508 ± 0,0072	0,0708 ± 0,0243	13/12/12
0,1 mM	0,0917 ± 0,0191	0,0423 ± 0,0050	0,0379 ± 0,0076	18/22/19
1 mM	0,1016 ± 0,0213	0,1393 ± 0,0192	0,1881 ± 0,0259	25/27/27
10 mM	0,1537 ± 0,0271	0,2732 ± 0,0708	0,2440 ± 0,0487	27/22/30
13 mM	0,8800 ± 0,2391	0,7125 ± 0,3319	0,5150 ± 0,1027	4/4/4
16 mM	0,3765 ± 0,1218	0,1206 ± 0,0240	0,1683 ± 0,0350	17/18/18
24 mM	0,0792 ± 0,0170	0,1475 ± 0,0369	0,2342 ± 0,0517	12/12/12

Tab. 6 Mittelwerte und Standardabweichung des Kupfers in den 3 untersuchten Regionen in *P. drummondii*

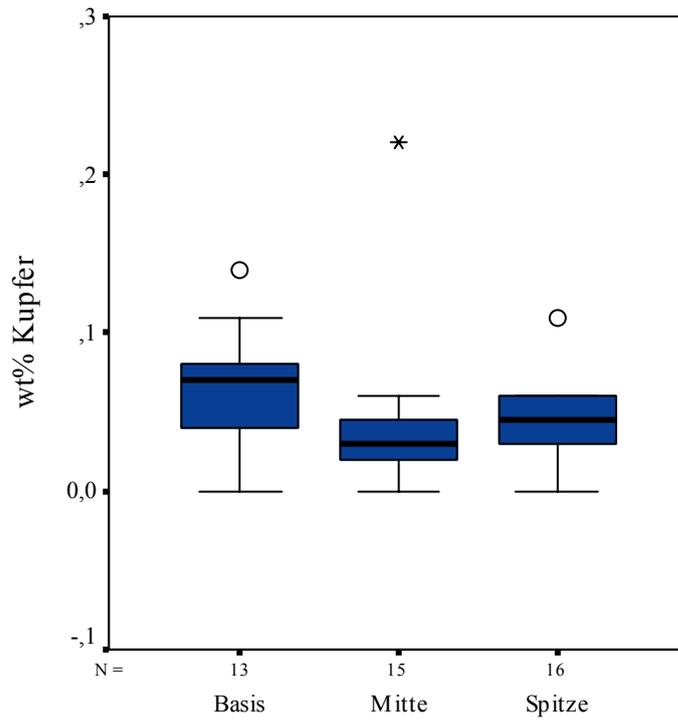


Abb. 14 Box-Plot der Kupferverteilung in der Kontrolle von *P. drummondii*

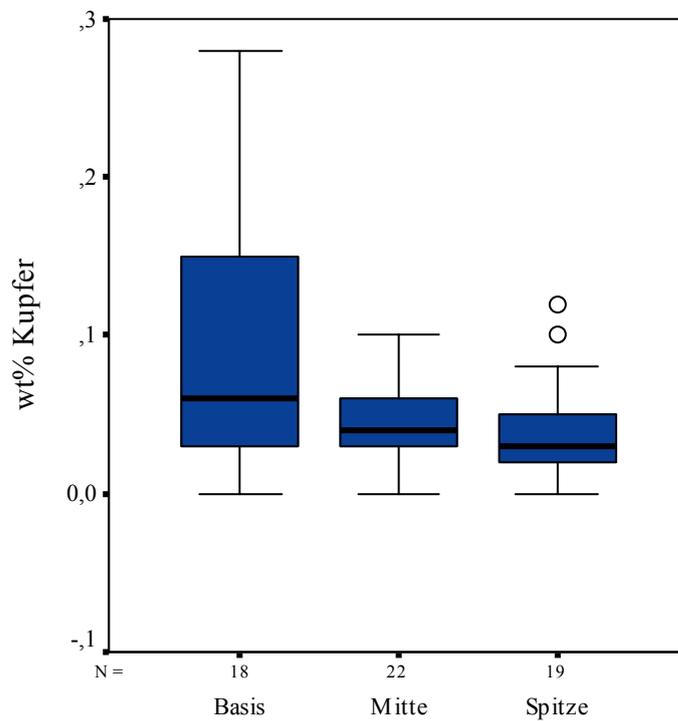


Abb. 15 Box-Plot der Kupferverteilung in *P. drummondii* des 0,1 mM Cu-EDTA Ansatzes

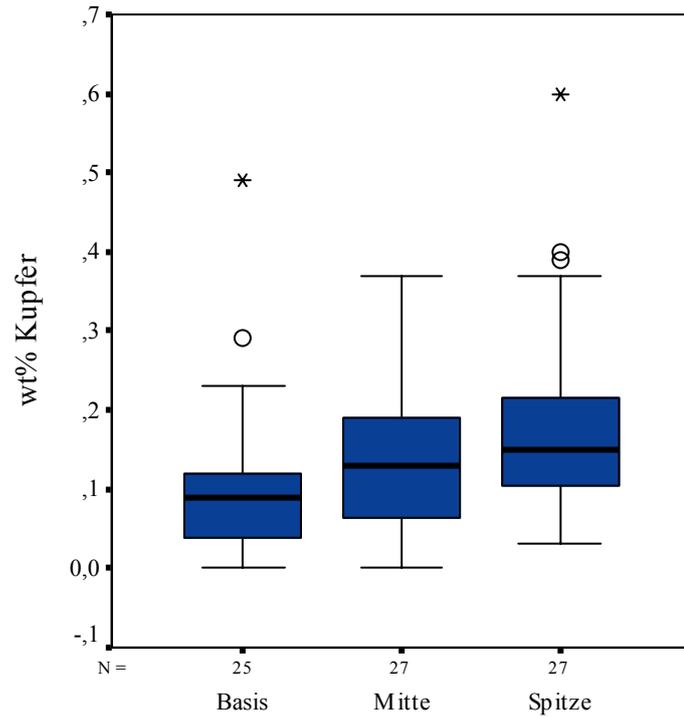


Abb. 16 Box-Plot der Kupferwerte von *P. drummondii* des 1 mM Cu-EDTA Ansatzes

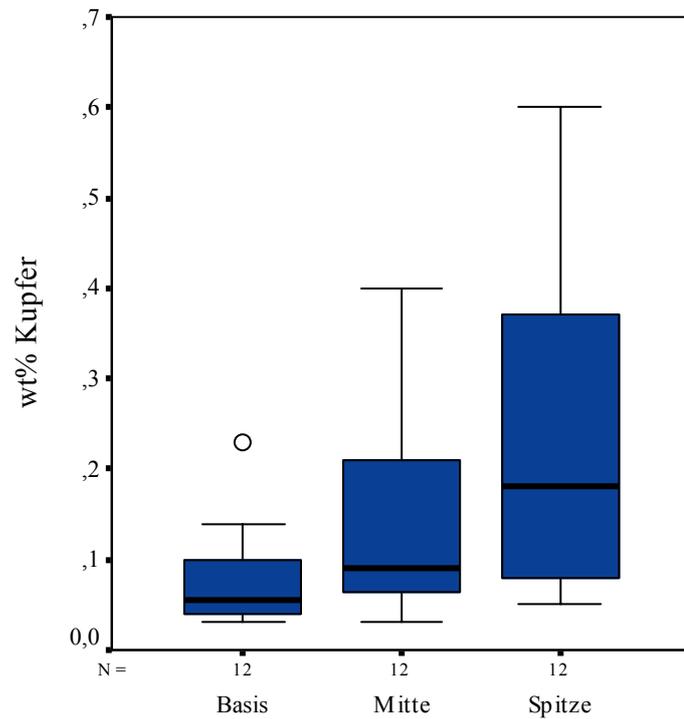


Abb. 17 Box-Plot der Kupferwerte von *P. drummondii* des 24 mM Cu EDTA Ansatzes

Die Eisengehalte zeigen hingegen nur bei 0,1 mM Fe-EDTA (Abb. 18) zwischen Basis und Mitte einen signifikanten Unterschied. Bei den anderen Konzentrationen (Tab. 7) sowie der Kontrolle kann keine Unterscheidung getroffen werden.

Fe Medien	Basis	Mitte	Spitze	n
Kontrolle	0,1200 ± 0,0159	0,0867 ± 0,0136	0,0819 ± 0,0071	15/15/16
1 µM	0,0756 ± 0,0062	0,0728 ± 0,0052	0,0586 ± 0,0044	16/18/14
10 µM	0,1078 ± 0,0262	0,0838 ± 0,0118	0,0863 ± 0,0189	9/8/8
0,1 mM	0,0425 ± 0,0025	0,0650 ± 0,0087	0,0700 ± 0,0041	4/4/4
1 mM	0,0835 ± 0,0057	0,0778 ± 0,0033	0,0859 ± 0,0090	20/18/17

Tab. 7 Mittelwerte und Standardabweichung des Eisens in den 3 untersuchten Regionen in *P. drummondii*

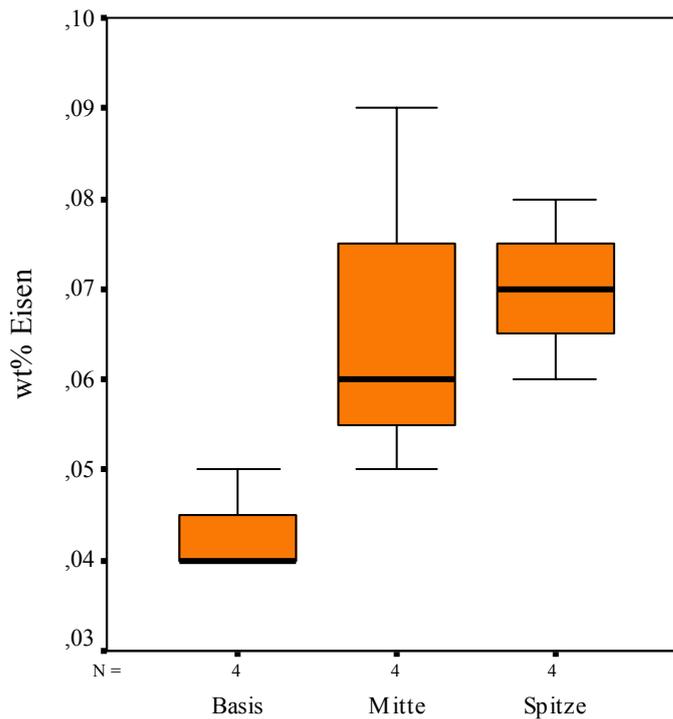


Abb. 18 Box-Plot der Eisenverteilung in *P. drummondii* des 0,1 mM Fe-EDTA Ansatzes

Bei *M. elongata* zeigen die Werte, gegliedert nach Regionen, keine Unterschiede zwischen der Kontrolle, 1 µM, 0,1 mM und 1 mM Cu-EDTA (Tab. 8). Nur die Konzentrationen 10 mM und 0,1 M sind unterschiedlich, bei den Moosen vom 10 mM Ansatz (Abb. 19) kann einerseits zwischen der Mitte und Spitze (hohe Signifikanz), andererseits zwischen der Basis und Spitze (sehr hohe Signifikanz) unterschieden werden. Bei 0,1 M (Abb. 20) kann zwischen der Basis und Spitze (hohe Signifikanz) eine deutliche Abnahme beobachtet werden.

Cu	Basis	Mitte	Spitze	n
Kontrolle	0,0443 ± 0,0084	0,0213 ± 0,0052	0,0250 ± 0,0063	7/8/8
1 µM	0,0143 ± 0,0069	0,0200 ± 0,0050	0,0475 ± 0,0295	7/8/8
0,1 mM	0,0756 ± 0,0200	0,0775 ± 0,0424	0,0550 ± 0,0150	9/8/8
1 mM	0,0900 ± 0,0089	0,1750 ± 0,0378	0,2330 ± 0,1049	8/8/10
10 mM	0,3367 ± 0,0655	0,2592 ± 0,0453	0,0700 ± 0,0170	12/12/8
0,1 M	0,2841 ± 0,0673	-	0,1423 ± 0,0511	17/-/13

Tab. 8 Mittelwerte und Standardabweichung des Kupfers in den 3 untersuchten Regionen in *M. elongata*

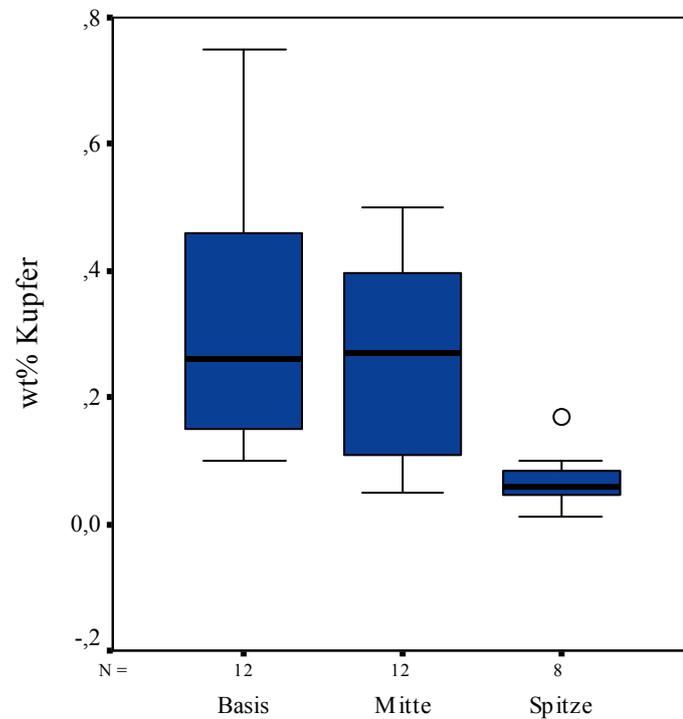


Abb. 19 Box-Plot der Kupferverteilung in *M. elongata* des 10 mM Cu-EDTA Ansatzes

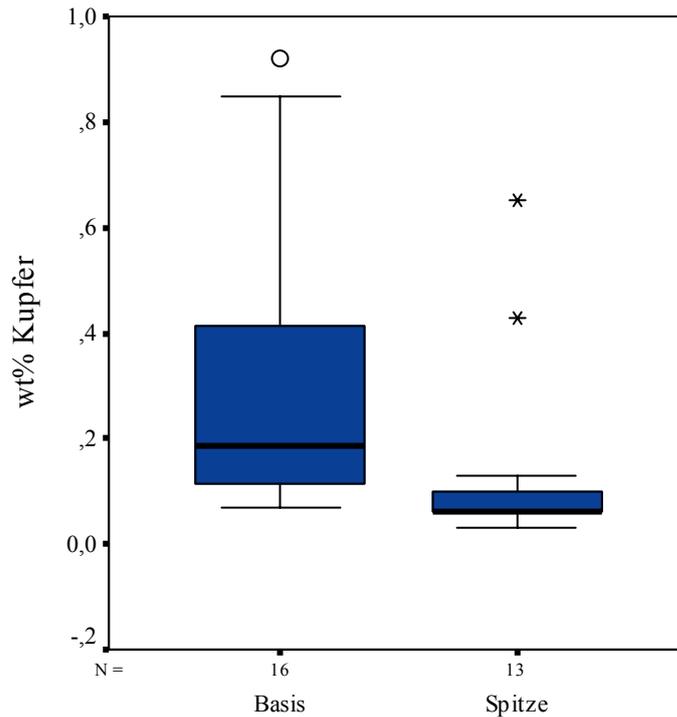


Abb. 20 Box-Plot der Kupferverteilung in *M. elongata* des 0,1 M Cu-EDTA Ansatzes

Die drei verschiedenen Regionen in den Moosen von den untersuchten Eisenansätzen zeigten bei Kontrolle, 10 μM und 1 mM keine signifikanten Unterschiede (Tab 9). Einzig in den Moosen des 0,1 mM Fe-EDTA-Ansatzes (Abb. 21) war ein erhöhter Gehalt an Eisen in der Basis zu erkennen. Es kann zwischen Basis und Mitte (hohe Signifikanz) und Basis und Spitze (signifikant) unterschieden werden.

Fe	Basis	Mitte	Spitze	n
Kontrolle	0,0771 \pm 0,0068	0,0663 \pm 0,0065	0,0713 \pm 0,0072	7/8/8
0,1 μM	0,0863 \pm 0,0096	0,0550 \pm 0,0038	0,0750 \pm 0,0158	8/8/8
1 μM	0,0589 \pm 0,0039	0,0613 \pm 0,0040	0,0536 \pm 0,0068	9/8/8
10 μM	0,0725 \pm 0,0144	0,0717 \pm 0,0095	0,0900 \pm 0,0177	4/6/8
0,1 mM	0,0814 \pm 0,0059	0,0575 \pm 0,0037	0,0600 \pm 0,0060	7/8/8
1 mM	0,1075 \pm 0,0092	0,1429 \pm 0,0484	0,1233 \pm 0,0203	8/7/6

Tab. 9 Mittelwerte und Standardabweichung des Eisens in den 3 untersuchten Regionen in *M. elongata*

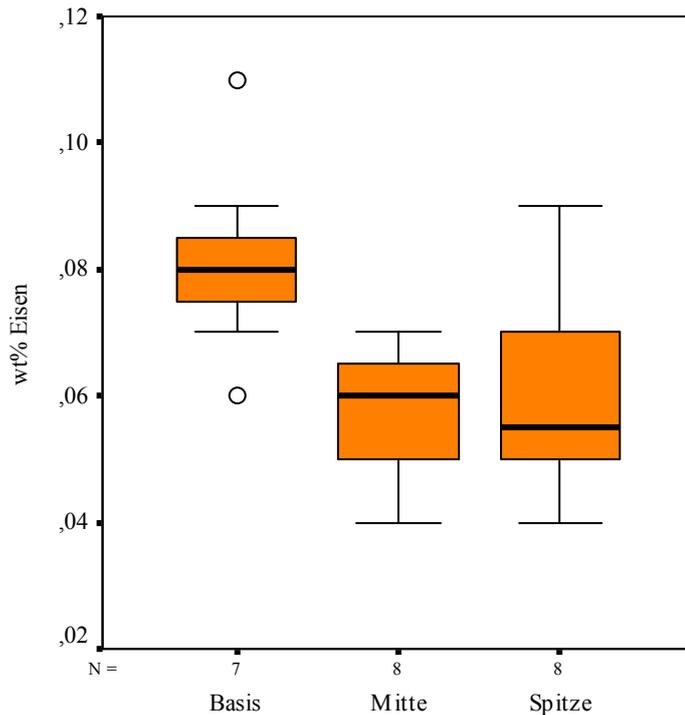


Abb. 21 Box-Plot der Eisenverteilung in *M. elongata* des 0,1 mM Fe-EDTA Ansatzes

Mit *P. drummondii* wurde ein Ansatz durchgeführt, um die kombinierte Aufnahme von Eisen und Kupfer zu untersuchen. Dafür wurden in das Medium sowohl Fe-EDTA als auch Cu-EDTA mit einer Konzentration von 1 mM gemischt.

Der Vergleich der Gesamt-Kupfergehalte in den Moosen zeigt, dass die dem Mischmedium entnommenen einen höheren Gehalt (sehr hohe Signifikanz) an Kupfer aufweisen als jene von den reinen Kupfermedien (Abb. 22). Die Verteilung innerhalb der Moose zeigt eine Zunahme hin zur Spitze (Tab. 10). Statistisch signifikant können die Werte von der Basis von jenen der Mitte und der Spitze getrennt werden (Abb. 23). Werden die Einzelwerte der drei Zonen untereinander verglichen, kann kein Unterschied in den Gehalten der Basis festgestellt werden. Hingegen ist die Verteilung in der Mitte hoch signifikanter unterschiedlich. In der Spitze ist ebenfalls eine signifikante Unterscheidung möglich.

Medien	Gesamt	Basis	Mitte	Spitze	n
FeCu-EDTA	0,3175 ± 0,0601	0,1475 ± 0,0434	0,3525 ± 0,0754	0,4525 ± 0,1454	24/8/8/8
Cu-EDTA	0,1441 ± 0,0134	0,1016 ± 0,0213	0,1393 ± 0,0192	0,1882 ± 0,0259	79/25/27/27

Tab. 10 Mittelwerte und Standardabweichung des Kupfers im Mischmedium und reinen Cu-EDTA Medium von *P. drummondii*

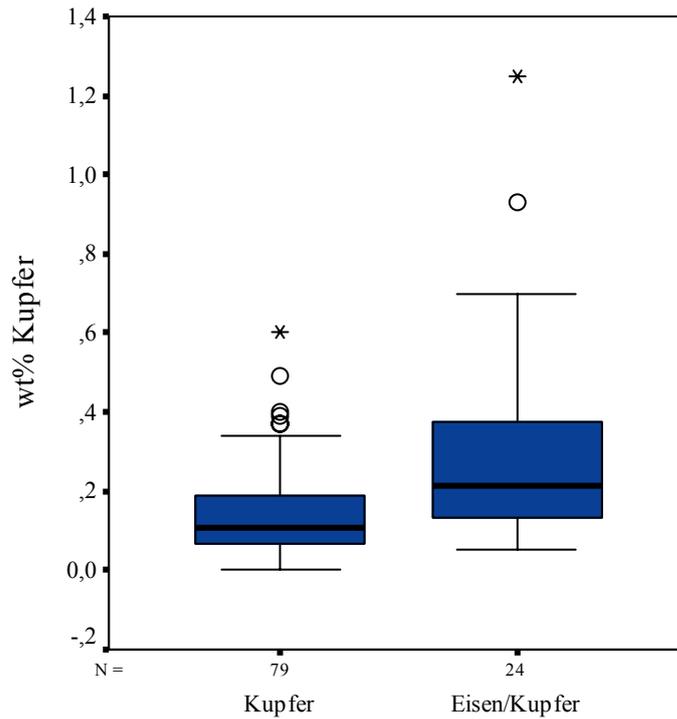


Abb. 22 Box-Plot des Kupfergehaltes in *P. drummondii* im Mischmedium und 1 mM Cu-EDTA Ansatz

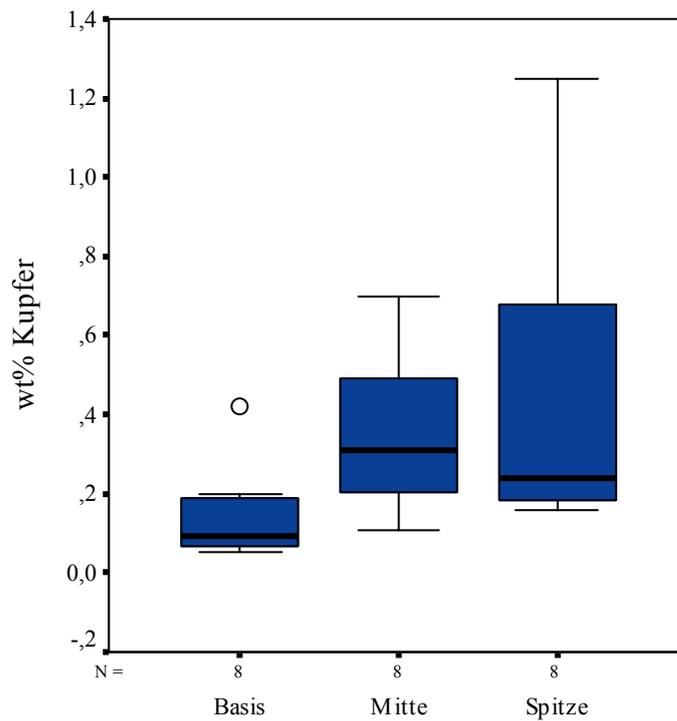


Abb. 23 Box-Plot der Kupferverteilung in *P. drummondii* im Mischmedium

Die Verteilung des Eisens zeigt ein umgekehrtes Muster (Tab. 11). Der Eisengehalt nimmt von der Basis zur Spitze hin ab, allerdings ist diese Beobachtung statistisch nicht belegbar (Abb. 24). Im Gegensatz zum Kupfer kann beim Vergleich zwischen den Eisenwerten vom Mischmedium und dem reinen Eisenmedium kein signifikanter

Unterschied bezüglich der Eisengehalte in den drei Regionen festgestellt werden (Abb. 25).

Medien	Gesamt	Basis	Mitte	Spitze	n
FeCu-EDTA	0,0863 ± 0,0048	0,0975 ± 0,0075	0,0850 ± 0,0085	0,0763 ± 0,0080	24/8/8/8
Fe-EDTA	0,0824 ± 0,0036	0,0835 ± 0,0057	0,0778 ± 0,0033	0,0859 ± 0,0090	55/20/18/17

Tab. 11 Mittelwerte und Standardabweichung des Eisens im Mischmedium und reinen Fe-EDTA Medium von *P. drummondii*

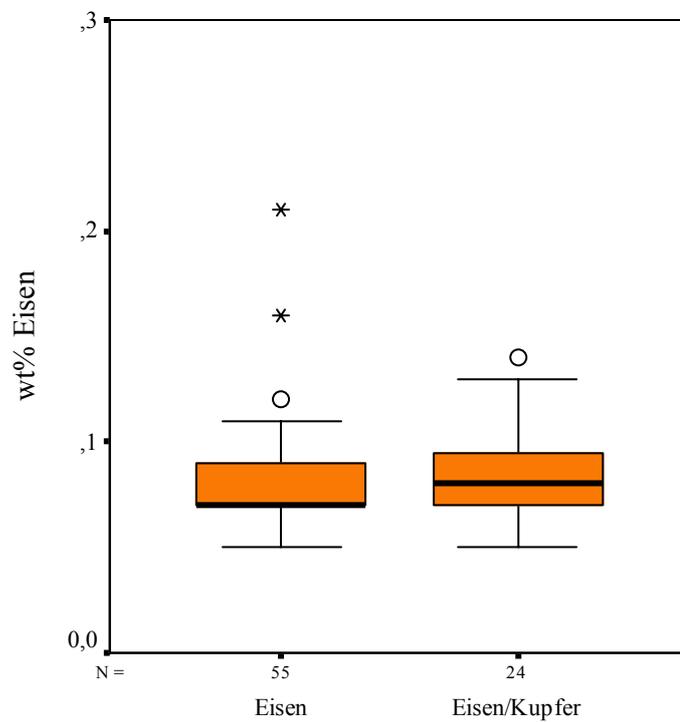


Abb. 24 Box-Plot des Eisengehaltes in *P. drummondii* im Mischmedium und 1 mM Fe-EDTA Ansatzes

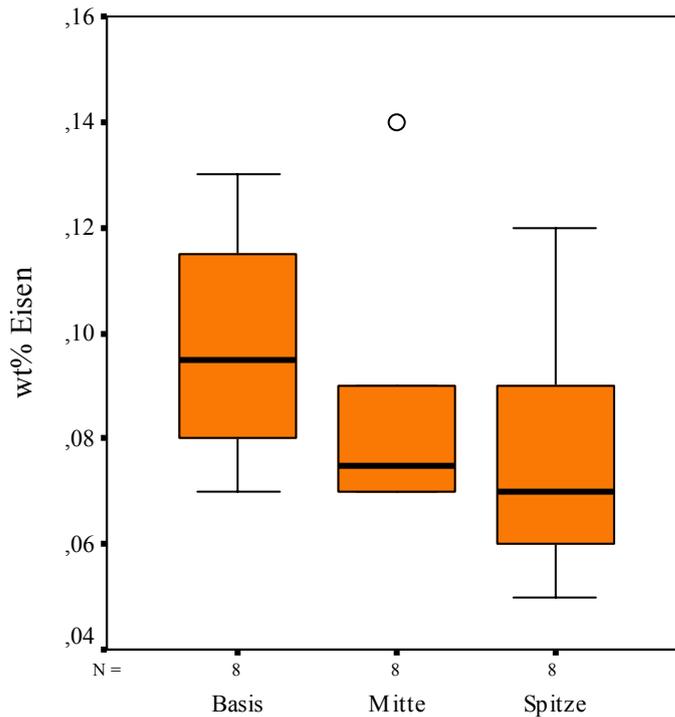


Abb. 25 Box-Plot der Eisenverteilung in *P. drummondii* im Mischmedium

Da bei den Messungen zwischen Blättern und Stämmchen unterschieden wurde, können die Daten auf eine unterschiedliche Verteilung zwischen diesen beiden Organen hin untersucht werden. Für *P. drummondii* sind folgende Werte bezüglich des Kupfergehaltes ermittelt worden (Tab. 12):

Cu Medien	Blatt	Stämmchen	n
Kontrolle	0,0413 ± 0,0041	0,0708 ± 0,0188	32/12
1 µM	0,0457 ± 0,0066	0,0889 ± 0,0304	28/9
0,1 mM	0,0504 ± 0,0074	0,0800 ± 0,0202	48/11
1 mM	0,1341 ± 0,0145	0,1778 ± 0,0318	61/18
10 mM	0,2194 ± 0,0321	0,2300 ± 0,0666	65/14
13 mM	0,6344 ± 0,1624	0,9067 ± 0,2370	9/3
16 mM	0,1544 ± 0,0275	0,3986 ± 0,1385	39/14
24 mM	0,1163 ± 0,0209	0,2656 ± 0,0598	27/9

Tab. 12 Mittelwerte und Standardabweichung des Kupfers in den Blatt und Stämmchen von *P. drummondii*

Mittels Mann-Whitney-Test konnte für 1 mM (Abb. 26) ein signifikanter und für 16 mM (Abb. 27) sowie 24 mM (Abb. 28) ein hoch signifikanter Unterschied in den Kupfergehalten festgestellt werden. Es zeigt sich durch die gesamte Messserie ein

höherer Wert im Stämmchen als in den Blättern. Bei den niedrigeren Konzentrationen ist dieser allerdings nicht signifikant höher.

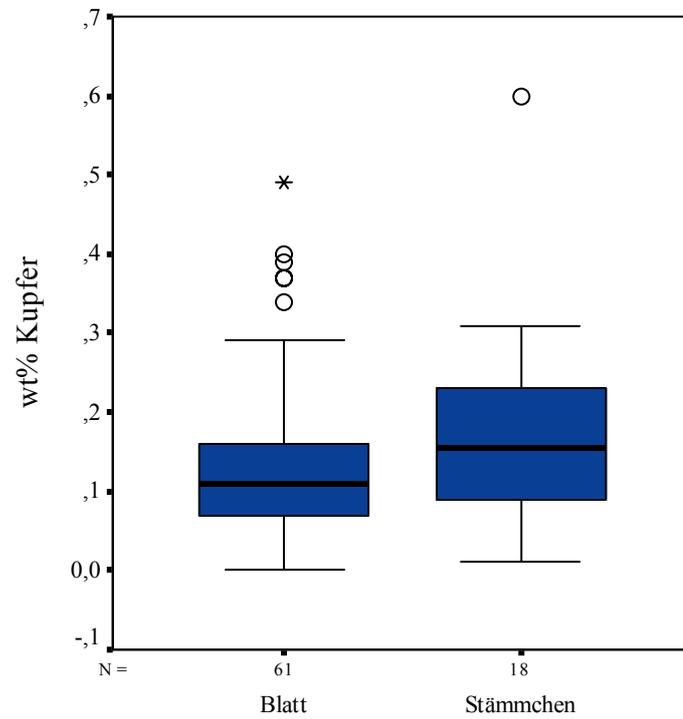


Abb. 26 Box-Plot der Kupferverteilung in *P. drummondii* des 1 mM Cu-EDTA Ansatzes

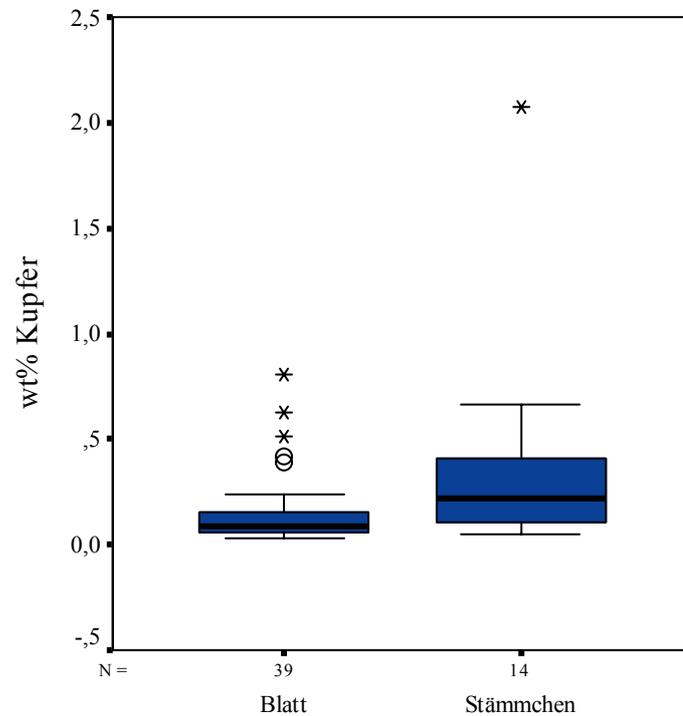


Abb. 27 Box-Plot der Kupferverteilung in *P. drummondii* des 16 mM Cu-EDTA Ansatzes

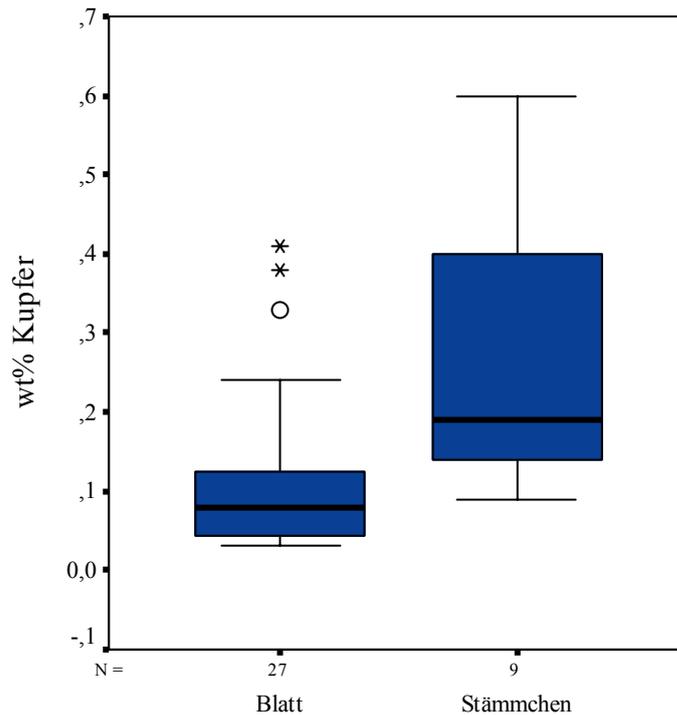


Abb. 28 Box-Plot der Kupferverteilung in *P. drummondii* des 24 mM Cu-EDTA Ansatzes

Die Tabelle 13 zeigt die Messergebnisse für die Verteilung des Eisens in *P. drummondii*. Bei der Kontrolle (Abb. 29) und dem 1 mM-Ansatz (Abb. 30) kann ein hoch signifikanter Unterschied zwischen dem Eisengehalt in den Blättern und dem Stämmchen festgestellt werden. In den Moosen der niedrigeren Konzentrationen war dies hingegen nicht möglich. Wie schon bei den präsentierten Kupferwerten zeigen auch die Eisenwerte durchgehend einen höheren Durchschnittswert im Stämmchen.

Fe Medien	Blatt	Stämmchen	n
Kontrolle	0,0837 ± 0,0075	0,1317 ± 0,0175	32/12
1 µM	0,0685 ± 0,0028	0,0823 ± 0,0083	34/13
10 µM	0,0822 ± 0,0097	0,1214 ± 0,0323	18/7
0,1 mM	0,0544 ± 0,0041	0,0733 ± 0,0120	9/3
1 mM	0,0750 ± 0,0022	0,1062 ± 0,0113	42/13

Tab. 13 Mittelwerte und Standardabweichung des Eisens in Blatt und Stämmchen von *P. drummondii*

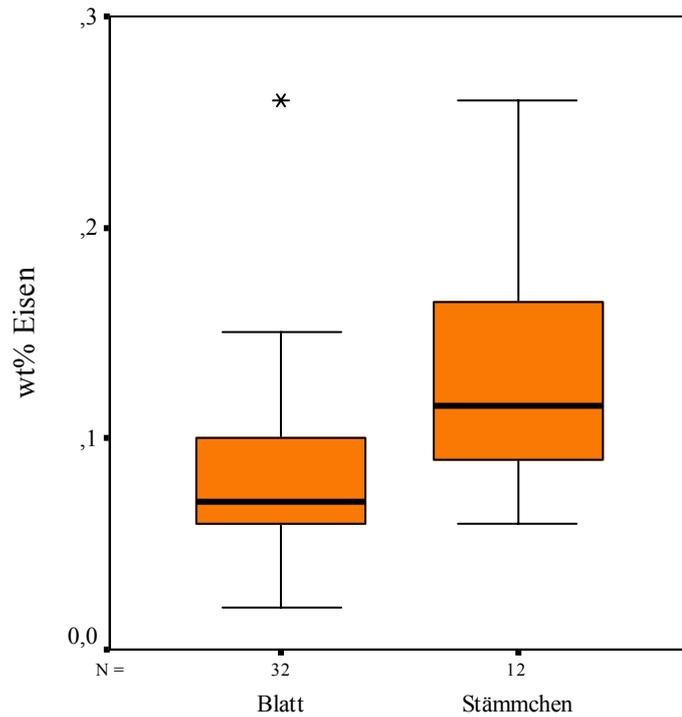


Abb. 29 Box-Plot der Eisenverteilung von *P. drummondii* der Kontrolle

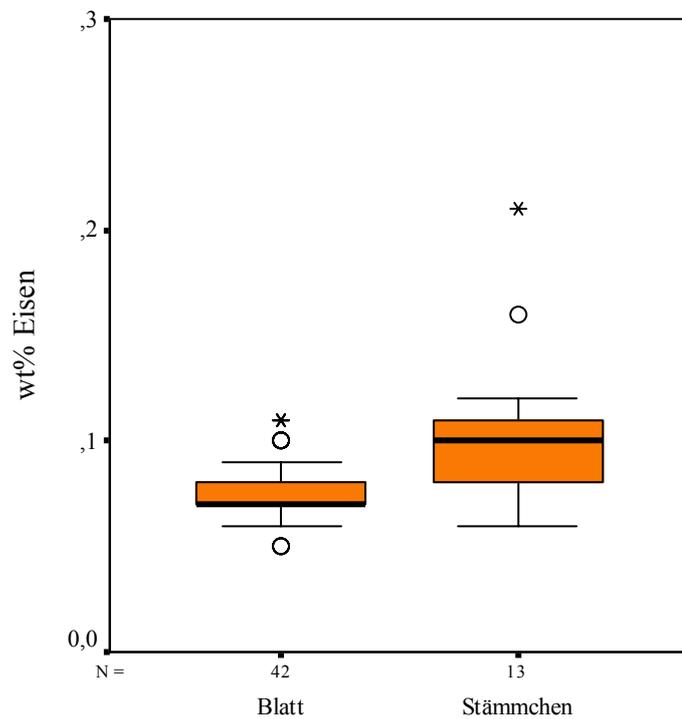


Abb. 30 Box-Plot der Eisenverteilung bei *P. drummondii* des 1 mM Fe-EDTA Ansatzes

Die signifikanten Unterschiede der 1 mM Konzentration in den Kupfer- und in den Eisen-Ansätzen konnten auch in dem Mischmedium (Fe und Cu 1 mM) wieder gezeigt werden. Sie sind bei Kupfer signifikant und für Eisen hoch signifikant.

Für die Verteilung des Kupfers innerhalb von *M. elongata* konnte nur für 10 mM (Abb. 31) ein signifikanter Unterschied zwischen den gemessenen Blättern und den Stämmchen ermittelt werden. Bei den übrigen Ansätzen sowie der Kontrolle kann keiner festgestellt werden. Bis auf 0,1 mM (da hier die Messungen an den Stämmchen nicht möglich waren) ist in allen untersuchten Ansätzen ein höherer Gehalt an Kupfer im Stämmchen zu finden als in den Blättern (Tab. 14).

Cu Medien	Blatt	Stämmchen	n
Kontrolle	0,0265 ± 0,0053	0,0383 ± 0,0048	17/6
1 µM	0,0295 ± 0,0116	0,0100 ± 0,0100	21/2
0,1 mM	0,0745 ± 0,0187	0,0300 ± 0,0300	20/2
1 mM	0,1658 ± 0,0449	0,2350 ± 0,1450	24/2
10 mM	0,2048 ± 0,0325	0,4360 ± 0,1088	27/5

Tab. 14 Mittelwerte und Standardabweichung des Kupfers in Blatt und Stamm von *M. elongata*

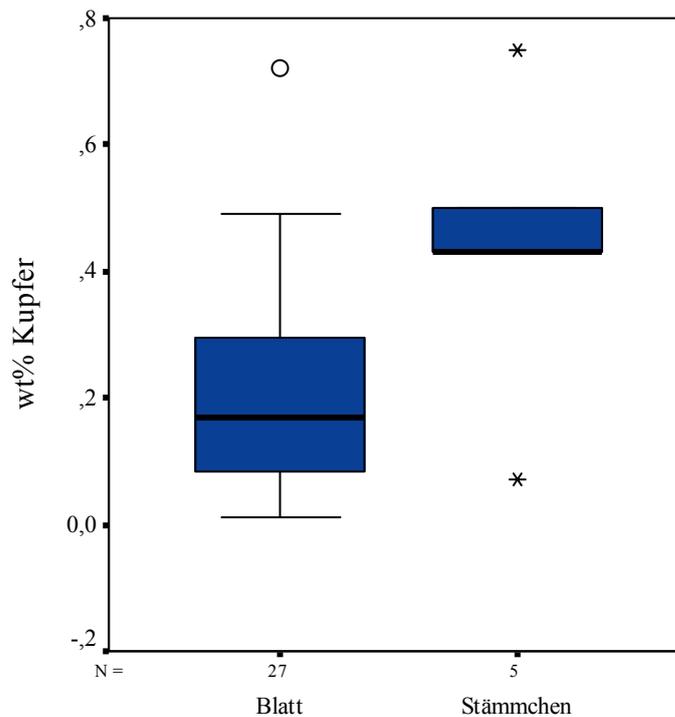


Abb. 31 Box-Plot der Kupferverteilung in *M. elongata* des 10 mM Cu Ansatzes

Bei Eisen war eine gleichmäßige Verteilung festzustellen (Tab. 15). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Eisengehalt in den Blättern und Stämmchen gefunden werden. Die Mittelwerte zeigten nur einen etwas höheren Gehalt in den Stämmchen als in den Blättern.

Fe Medien	Blatt	Stämmchen	n
Kontrolle	0,0694 ± 0,0047	0,0767 ± 0,0067	17/6
0,1 µM	0,0719 ± 0,0074	0,0733 ± 0,0133	21/3
1 µM	0,0567 ± 0,0028	0,0614 ± 0,0074	18/7
10 µM	0,0777 ± 0,0115	0,0860 ± 0,0129	13/5
0,1 mM	0,0641 ± 0,0032	0,0700 ± 0,0113	17/6
1 mM	0,1200 ± 0,0187	0,1467 ± 0,0441	18/3

Tab. 15 Mittelwerte und Standardabweichung des Eisens in Blatt und Stamm von *M. elongata*

Ebenfalls im EDX-REM wurde untersucht, ob die Moose, welche auf Cellophanpapier gezogen wurden, Kupfer aus dem Medium aufnehmen können oder nicht. Die Versuche zeigten, dass die Moose auf dem Cellophanpapier ein Wachstum haben, welches mit dem der Moose auf Agar vergleichbar ist.

	Cu	n
Celophankultur	0,1952 ± 0,0404	25
Agarkultur	0,1536 ± 0,0238	36

Tab. 16 Vergleich der Kupferaufnahme in *P. drummondii* zwischen Agarkultur und Celophankultur; beide mit 24 mM Kupfer im Agar

Die Werte der Tabelle 16 zeigen, dass die Moose, welche auf Cellophan gewachsen sind, einen ähnlich hohen Gehalt an Kupfer aufweisen. Der etwas erhöhte Mittelwert ist nicht signifikant.

5.7 Cytologische Untersuchungen

5.7.1 Neutralrotfärbung

Die durchgeführte Untersuchung mit Neutralrot hatte den Sinn, saure Kompartimente, im bestimmten Fall die Vakuole, darzustellen. Es konnte eine deutliche Färbung der Vakuole in den Protonemazellen erzielt werden (Abb. 32). Im gleichen Zeitraum zeigten die Blattzellen keine Aufnahme des Farbstoffes (Abb. 32 B). Die schnelle Aufnahme des Farbstoffes in den Protonemazellen kann bis zu deren Ursprungszelle am Stämmchen verfolgt werden (Abb. 32 A). Nach 10 Minuten war der Farbstoff vollständig aufgenommen (Abb. 32 D; Abb. 33 A). Diese Ergebnisse konnten mit dem Farbstoff mit einem pH-Wert 7 erzielt werden. Bei pH 4 konnte hingegen nur eine

Färbung der Protonemazellen beobachtet werden (Abb. 32 B). Auch nach 30 Minuten konnte nicht einmal eine Färbung der Zellwände bei den Blattzellen gefunden werden (Abb. 32 C).

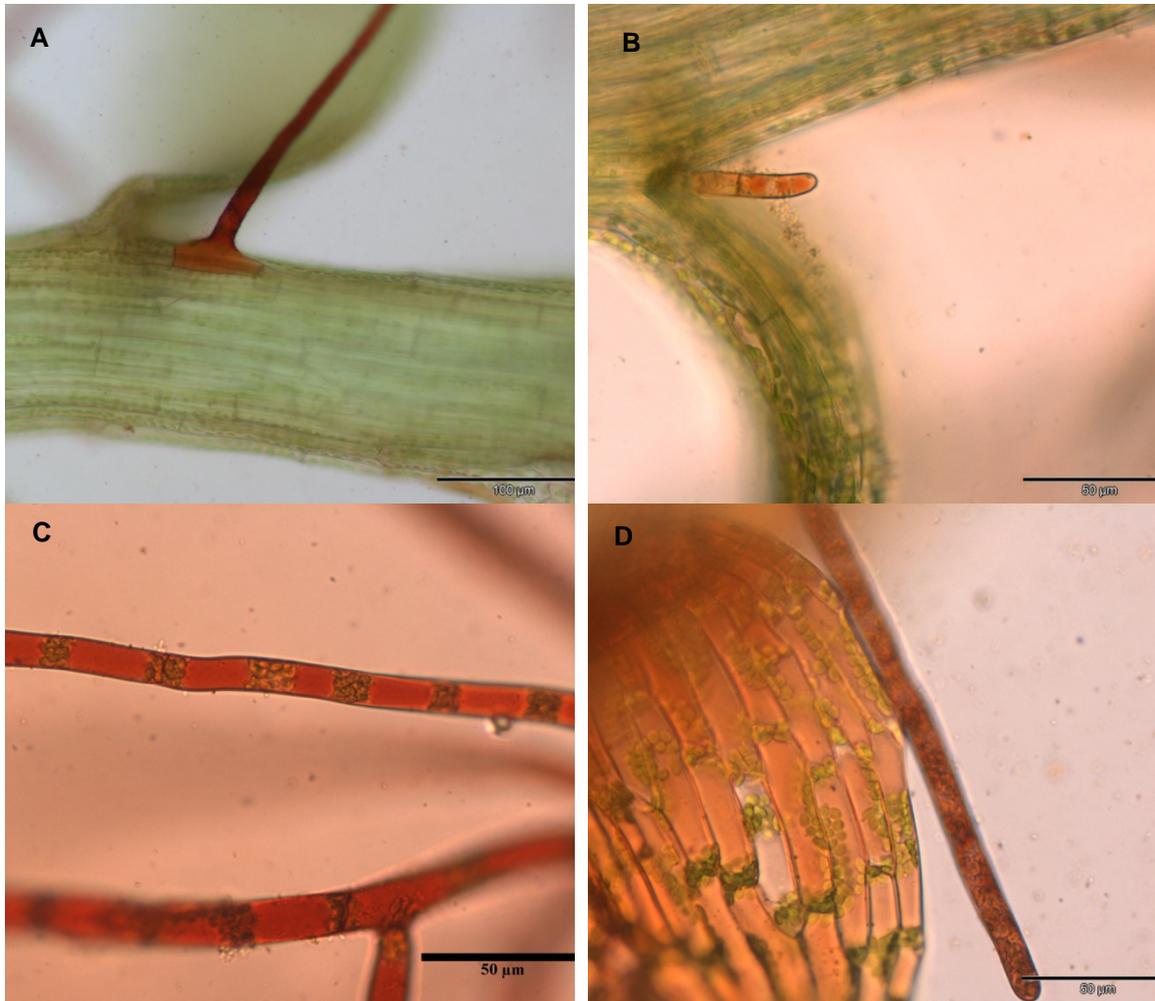


Abb. 32 Neutralrot *P. drummondii*, A; B; C; D bei pH=7; D nach 10 Minuten

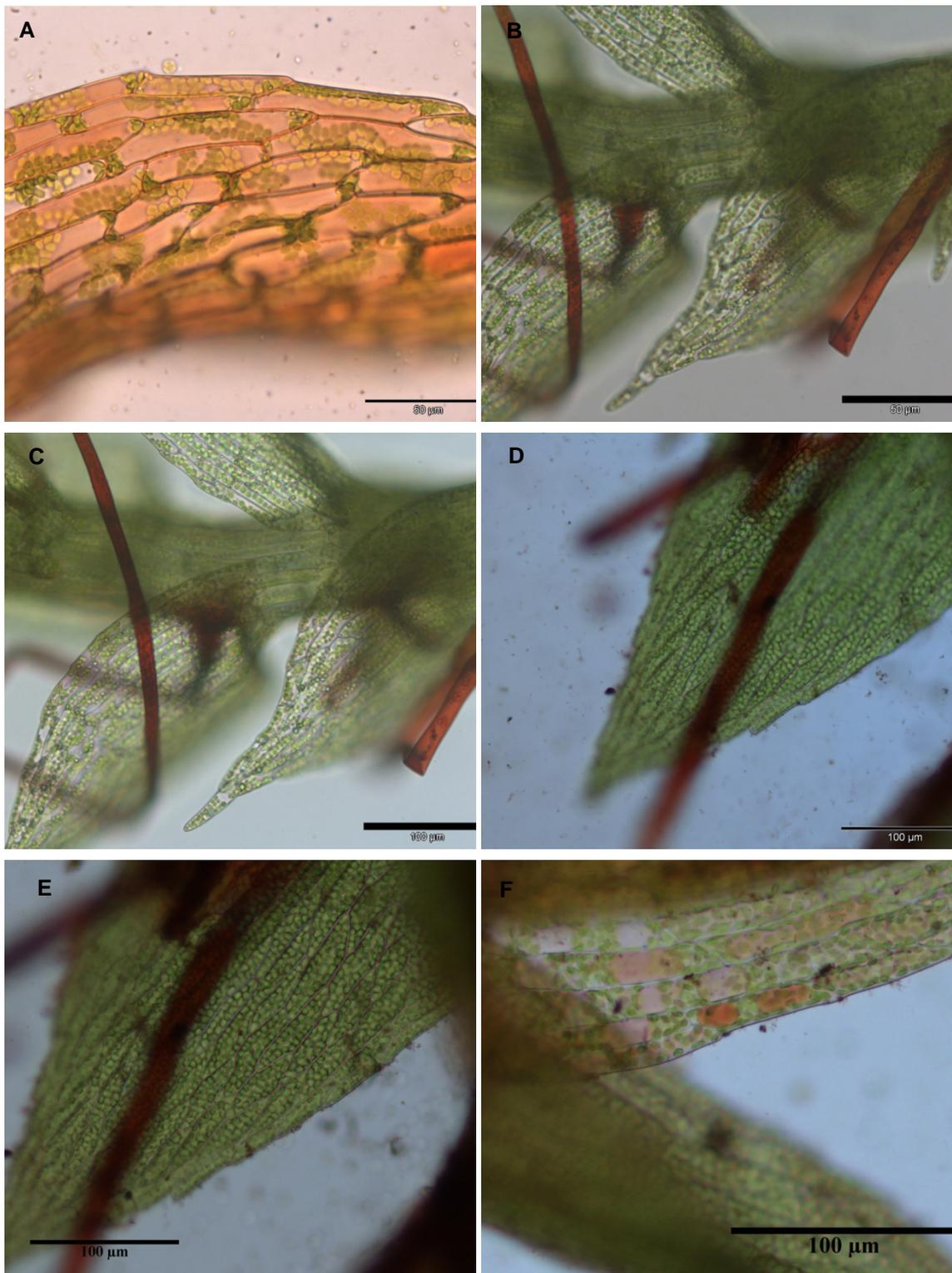
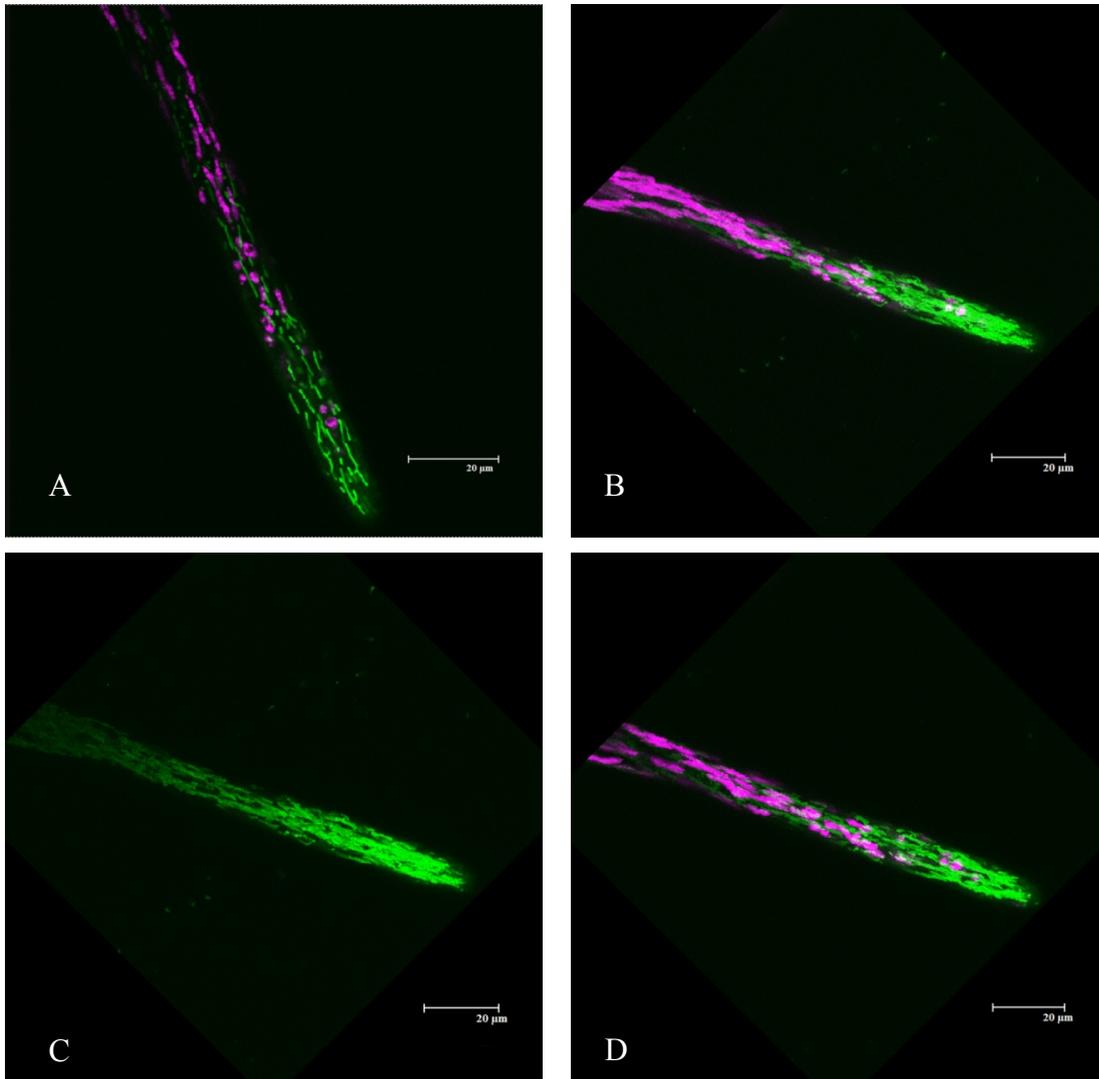


Abb. 33 *P. drummondii* A pH 7 nach 10 min; B pH 4 nach 1 min; C pH 4 nach 30 min;
M. elongata D pH 7 nach 1 min; E pH 7 nach 30 min; F pH 7 nach 20 min

5.7.2 Fluoreszenzfarbstoffe

DiOC₆: Mithilfe dieser Färbung kann neben der Darstellung des Membransystems (Abb. 34 G;H) auch die Bewegung der Mitochondrien in einer Caulonemazelle mit Spitzenwachstum dargestellt werden (Abb. 34 A-F). Es handelt sich hier um einen Z-Scan im CLSM. Während des Scannens verlängerte sich die Zelle und die zusammengesetzten Ebenen verdeutlichen die hohe Organellendichte in der Spitzenregion. In Chloronemazellen sammeln sich die Organellen an den Zellwänden zweier benachbarter Zellen an (Abb. 34 G; H).



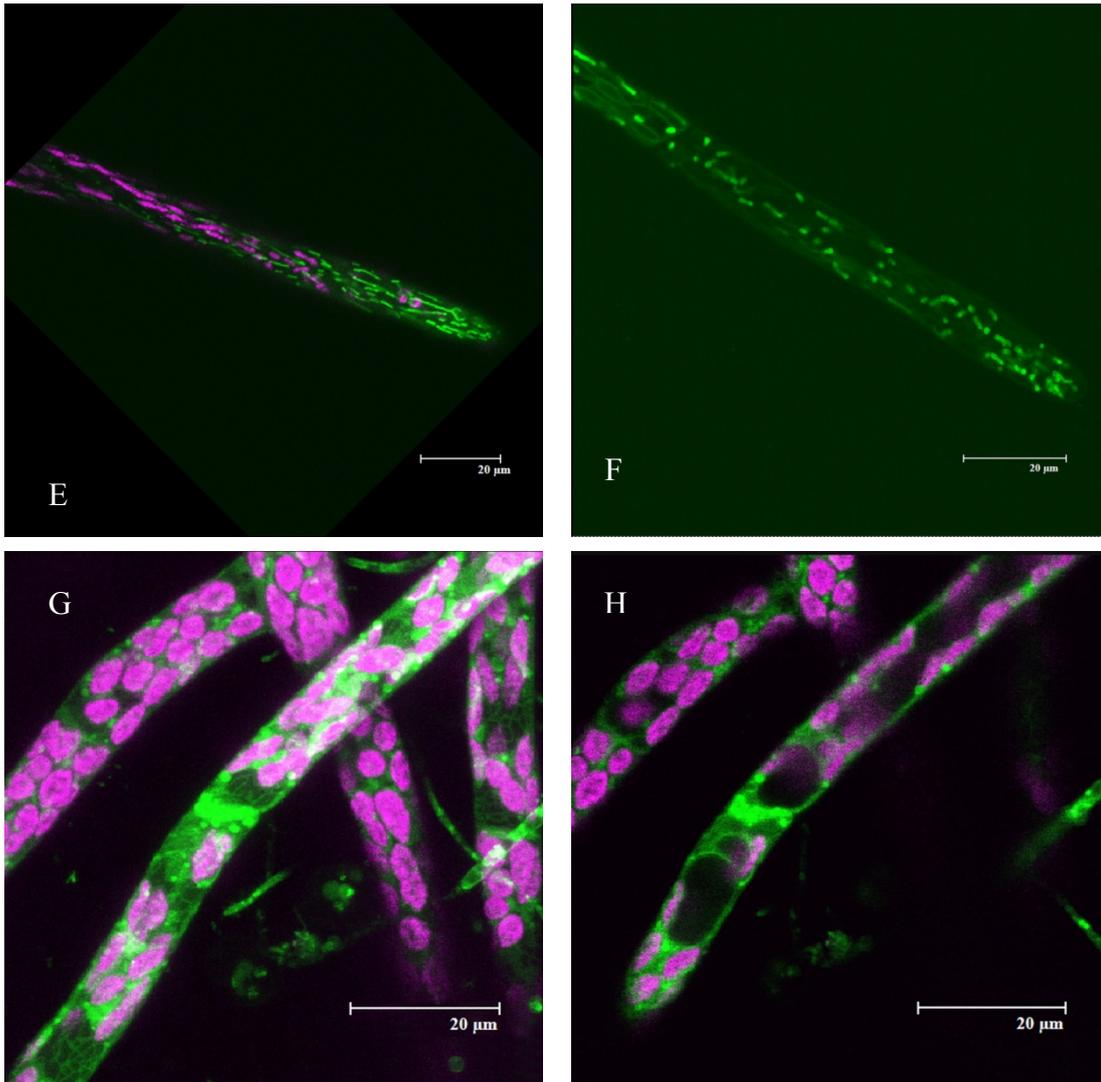
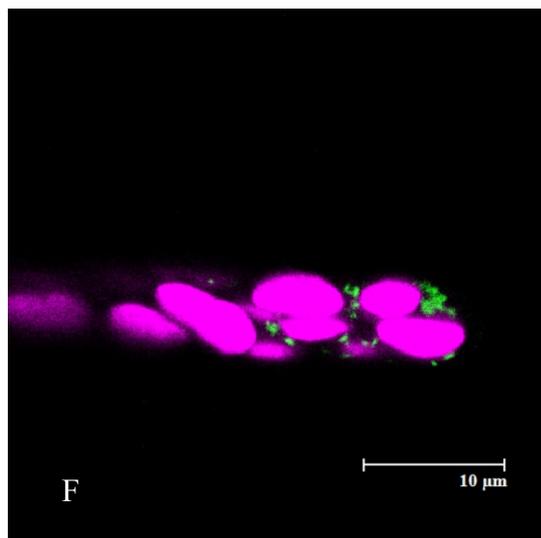
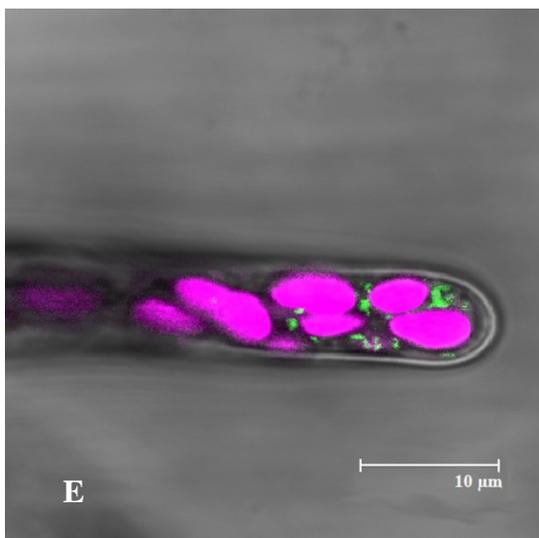
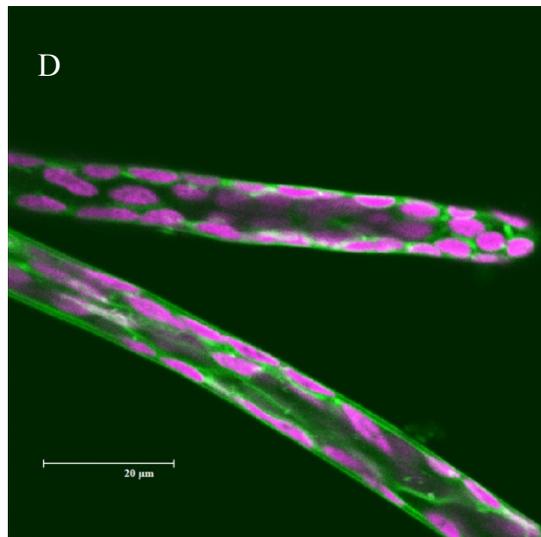
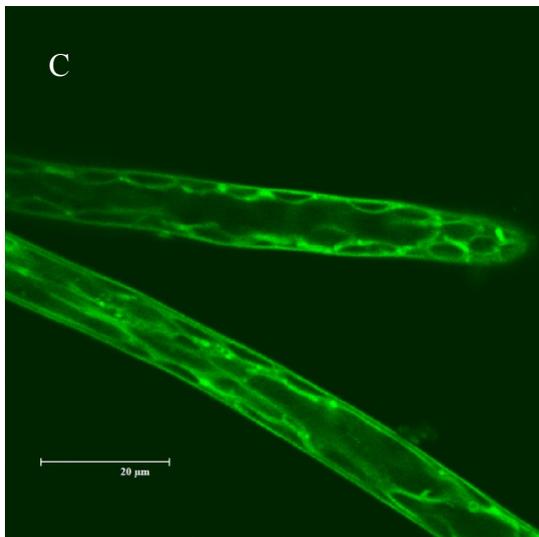
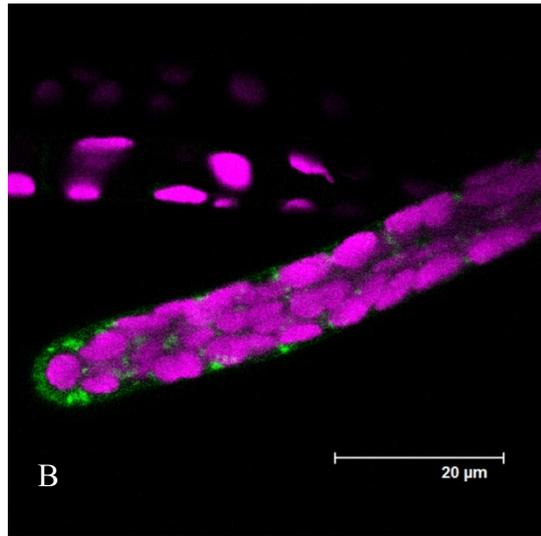
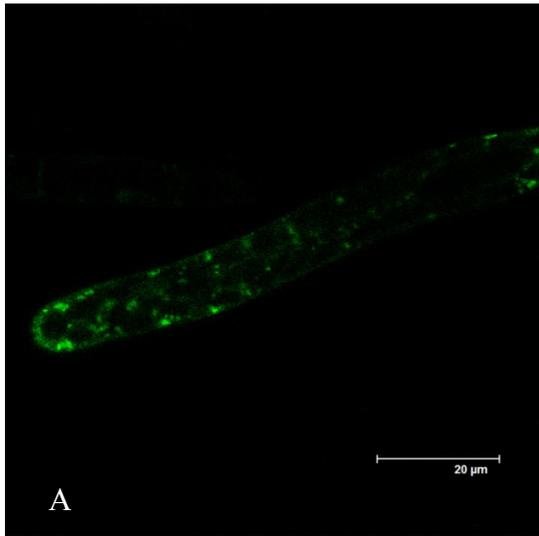


Abb.34. CLSM-Bilder, DiOC₆-Färbung 5 µg/l für 10 min A-F Caulonemazelle, mit Spitzenwachstum,; G-H Chloronemazellen; Balken = 20 µm

FM1-43: Auch mit diesem Membranfarbstoff ist eine Darstellung des Membransystems in den Protonemazellen möglich (Abb. 35 A-D). Mittels Pulse-Färbung (5 Minuten Färbung, danach kurz Auswaschen) ist es möglich die Vesikel in der Zelle zu verfolgen. Das erste Bild wurde nach insgesamt 10 Minuten nach Beginn der Präparation aufgenommen. Die Aufnahmen alle 5 Minuten lieferten keine guten Ergebnisse. Wie die Bilder E-K in Abbildung 35 zeigen, kann keine eindeutige Wanderung der Vesikel beobachtet werden.



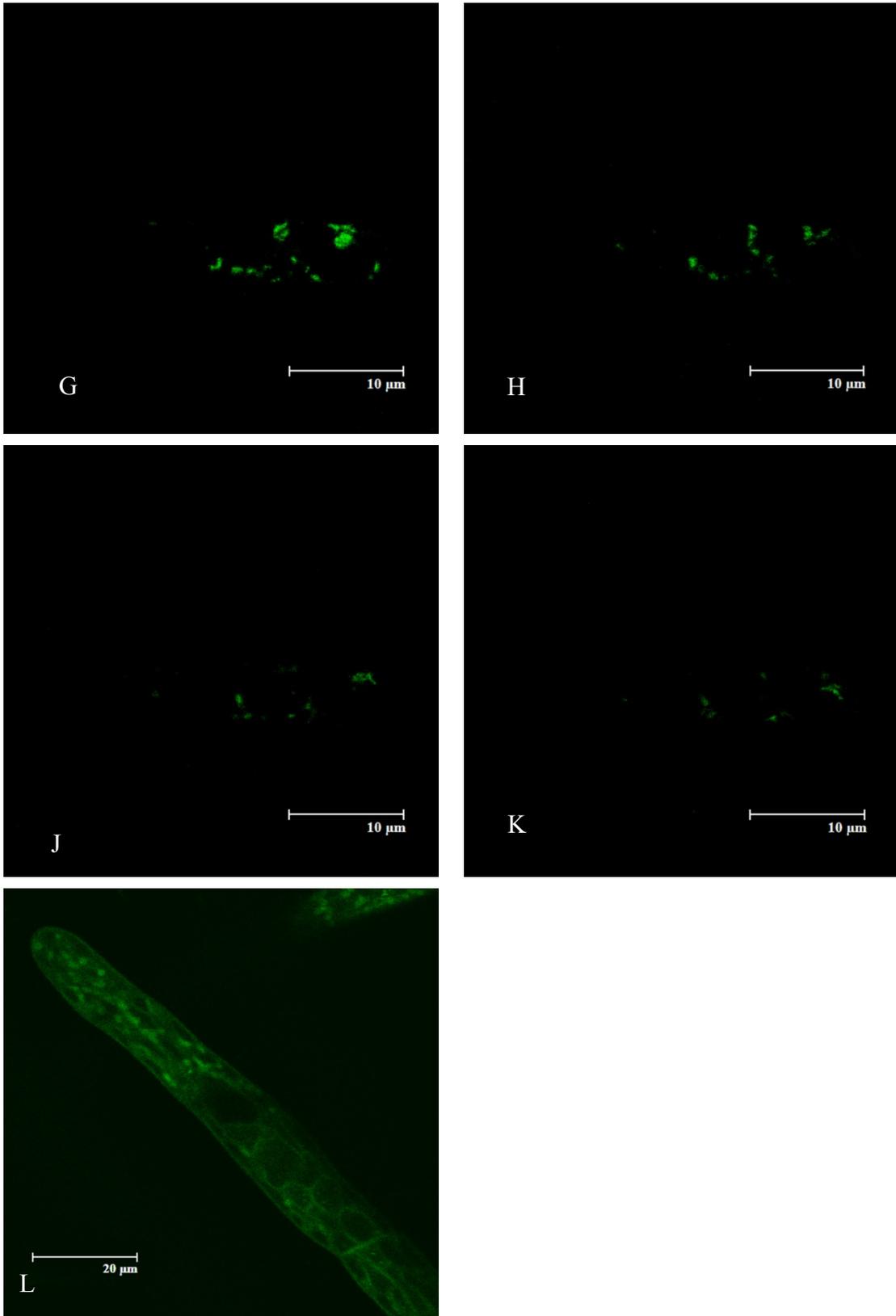
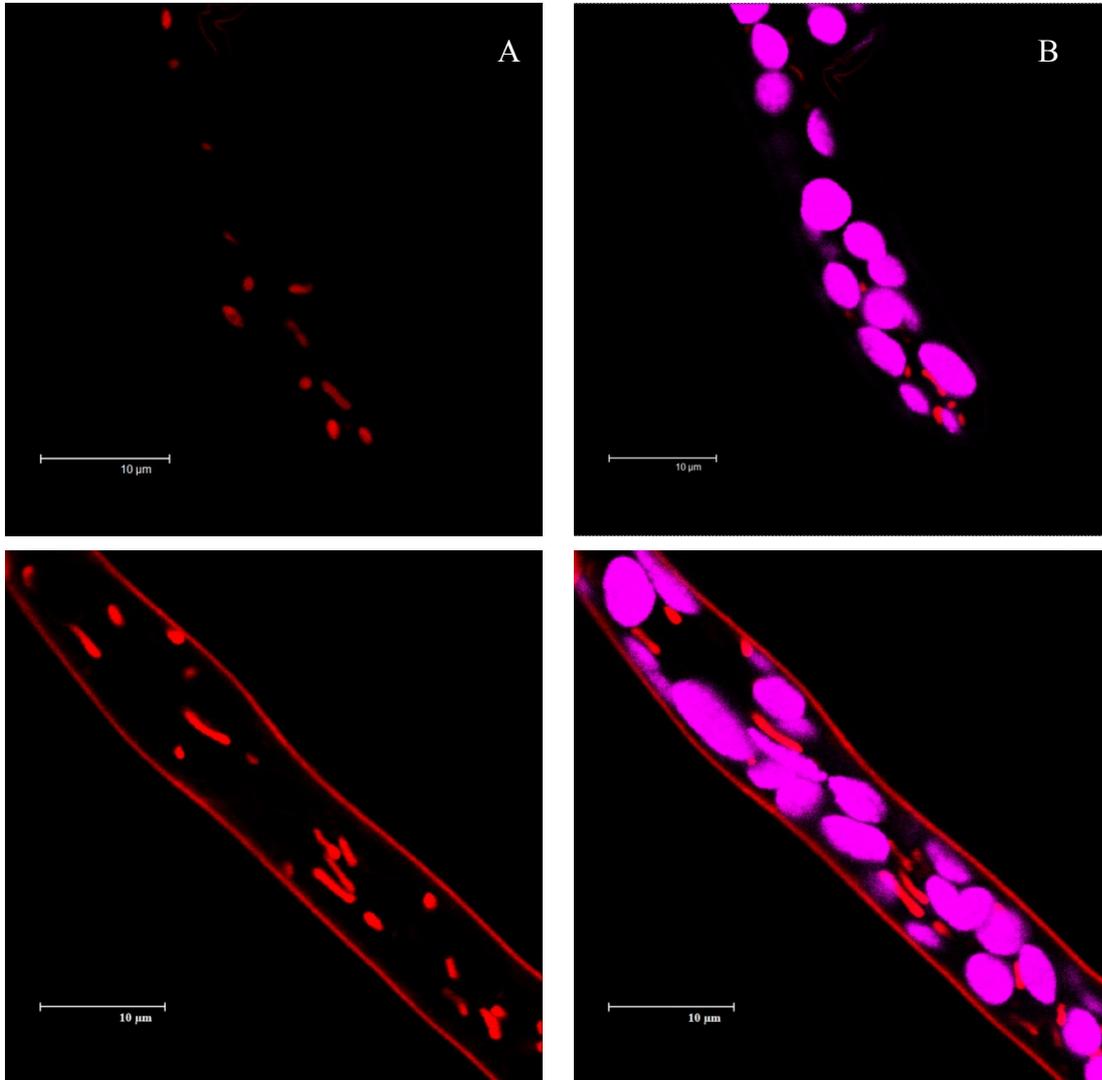


Abb. 35. CLSM, FM1-43 8 µM A-D Fluoreszenz des Membransystems nach Färbung mit FM1-43, E Spitzenzelle unterlegt mit Transmissionbild; F-K Impulsfärbung, erstes Bild nach 10min (Präparationszeit), Bilder in 5 min Schritten; L Membransystem gefärbt – deutliche Lage des Zellkerns zu sehen

Rhodamin123: Die Färbung der Mitochondrien mit Rhodamin 123 bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ in den Zellen des Protonematas hat eine sehr gute Qualität. Ebenso können die Mitochondrien auch in Knospen gezeigt werden (Abb. 36). Es wird deutlich, dass sich die Mitochondrien häufig an die Chloroplasten anlegen. Aufgrund der guten Ergebnisse wurden höhere Konzentrationen nicht mehr ausgetestet.



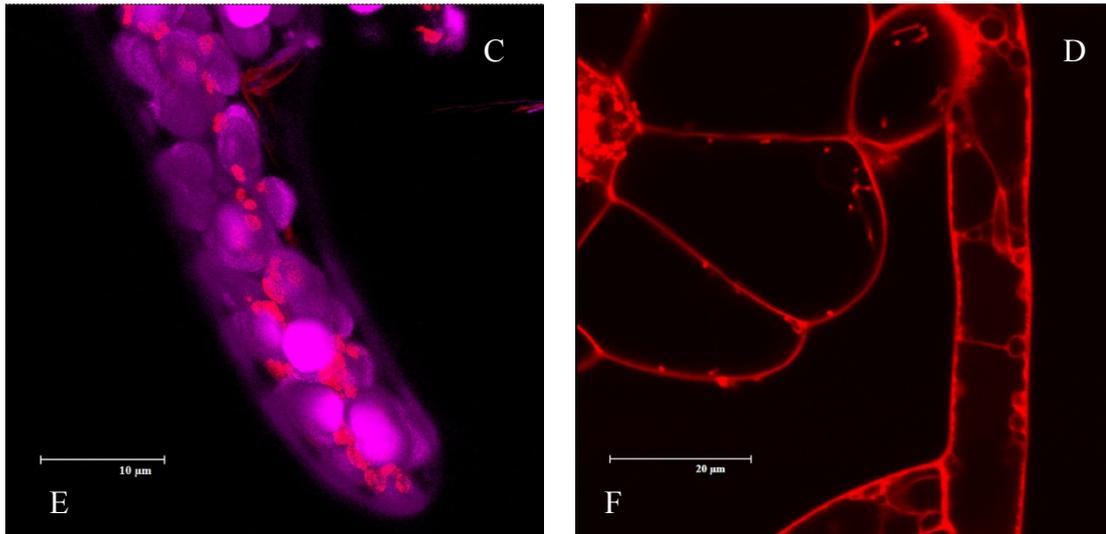


Abb. 36. CLSM, Rhodamin123 A,C Chloronemazelle nur Mitochondrien; B,D-E Overlay mit den Chloroplasten; F Knospenbereich

5.7.3 Protonemawachstum

5.7.3.1 Zelllängen

Für den Vergleich der Zelllängen von Chloronemata und Caulonemata von *P. drummondii* und *M. elongata* wurden von beiden Arten Flüssigkulturen mit Kontrollmedium und 10 mM Cu in Küvetten hergestellt. Nach 4 Wochen wurden mit Hilfe des Cell-D Programms die Zelllängen vermessen und statistisch ausgewertet.

Die ermittelten Längen zeigen, dass zwischen den beiden Protonema-Arten, Chloronema und Caulonema, eine deutliche Längendifferenz besteht. In der folgenden Tabelle (Tab. 17) sind die Mittelwerte für *P. drummondii* und *M. elongata* zu sehen. Bei der Auswertung des Mittelwertes wurden vorher alle Messungen der Spitzenzellen entfernt.

	<i>P. drummondii</i>	<i>M. elongata</i>	
Kontrolle	L (µm)	L (µm)	n
Chloronema	93,2303 ± 2,2621	55,707 ± 1,3076	92/161
Caulonema	209,39 ± 8,8864	182,041 ± 10,6828	70/39

Tab. 17 Mittelwerte und Standardabweichung der Protonemazelllängen von *P. drummondii* und *M. elongata* in der Kontrolle

Die gleichen Messungen wurden mit Protonemafäden durchgeführt, welche in 10 mM Cu-EDTA gewachsen sind. Die Tabelle 18 listet die ermittelten Messungen auf.

	<i>P. drummondii</i>	<i>M. elongata</i>	
Cu-EDTA	L (µm)	L (µm)	n
Chloronema	103,668 ± 1,6781	61,0887 ± 1,6339	129/84
Caulonema	202,245 ± 7,3995	292,865 ± 6,7587	33/21

Tab. 18 Mittelwerte und Standardabweichung der Protonemazelllängen von *P. drummondii* und *M. elongata* in 10 mM Cu-EDTA

Beim Vergleich zwischen den Protonemazelllängen der Kontrolle und des Kupferansatzes mittels Oneway ANOVA und den Post-Hoc-Tests Turkey-HSD und LSD kann bei *P. drummondii* (Abb. 37) eine statistisch sehr hohe signifikante Längenzunahme bei den kupfer-gewachsenen Chloronemazellen festgestellt werden. Dagegen zeigen die Caulonemazellen keinen signifikanten Unterschied und es kann von einem Trend zu kürzeren Zellen gesprochen werden.

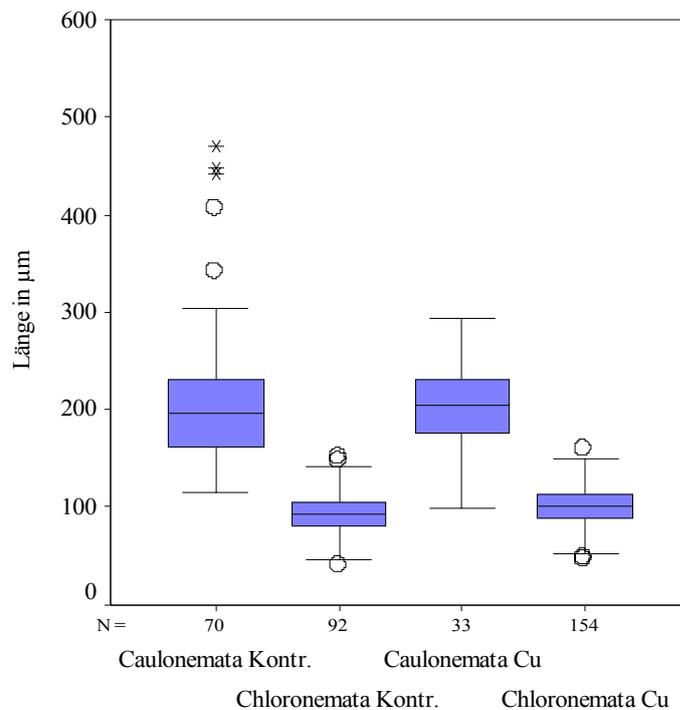


Abb. 37 Box-Plot der Protonemazelllänge von *P. drummondii* in der Kontrolle und dem 10mM Cu-EDTA Ansatz

Die Chloronema- und Caulonemazellen von *M. elongata* weisen ebenfalls eine Längenzunahme auf. Wobei hier die Zunahme der Zelllängen des Chloronemas nicht als signifikant ausgewiesen wird, hingegen für die Caulonemazellen eine sehr hohe Signifikanz ermittelt wurde (Abb.38).

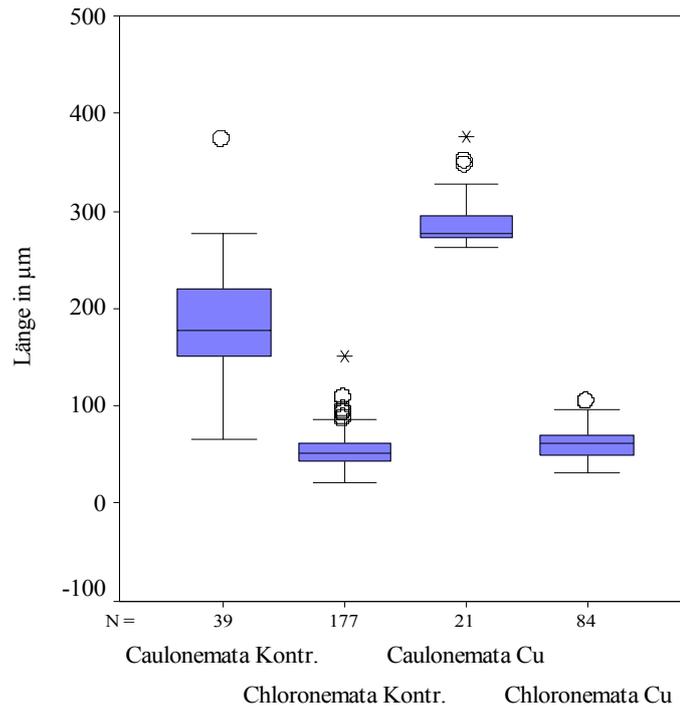


Abb. 38 Box-Plot der Protonemazelllänge von *M. elongata* in der Kontrolle und dem 10 mM Cu-EDTA Ansatz

Im Vergleich zwischen den beiden untersuchten Arten hat *P. drummondii* die im Durchschnitt längeren Zellen, sowohl bei den Chloronemata als auch bei den Caulonemata. Im Kupfermedium gilt dies nur für die Chloronemazellen. Die Caulonemazellen sind hier bei *M. elongata* deutlich länger (Abb. 39).

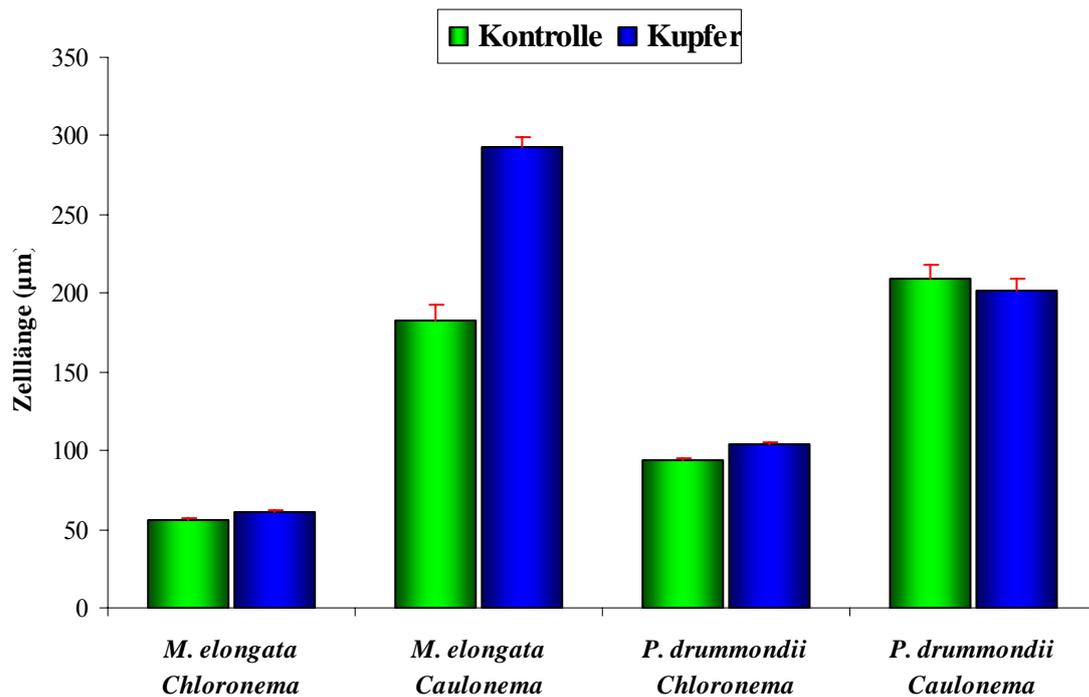


Abb. 39 Mittlere Zelllängen der Protonemafäden von *P. drummondii* und *M. elongata* in der Kontrolle und in 10 mM Cu-EDTA

5.7.3.2 Spitzenwachstum

Zur Dokumentation des Caulonemawachstums wurden Protonemafragmente auf Deckgläsern mit Agar angewachsen. Im Mikroskop wurden Caulonemazellen gesucht und mit dem Cell-D Programm alle 5 Minuten für 10 Stunden Bilder aufgenommen. Für die bessere grafische Darstellung sind alle 20 Minuten zusammengefasst worden.

Der Zuwachs der untersuchten Caulonemaspitzen betrug im Kontroll-Ansatz durchschnittlich $7,396 \mu\text{m}$ ($\pm 0,267\mu\text{m}$) pro 20 Minuten in den untersuchten 10 Stunden (Abb. 40).

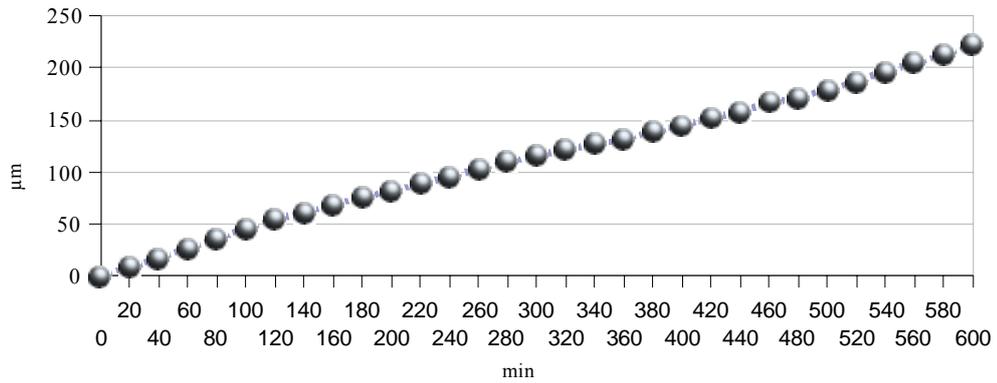


Abb. 40 Wachstum einer Caulonemazelle in der Kontrolle

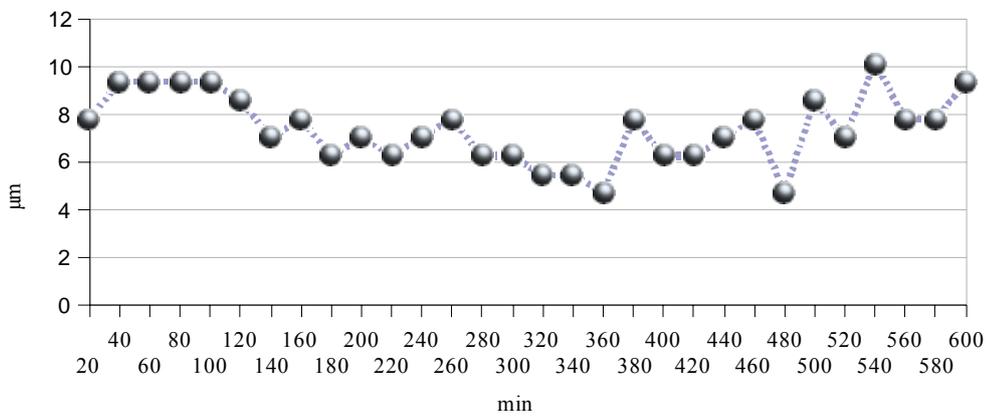


Abb. 41 Zuwachs pro 20 Minuten in der Kontrolle

Die Caulonemaspitzen des 10 mM Cu-EDTA Ansatzes (Abb. 42) zeigten im gleichen Zeitraum einen durchschnittlichen Zuwachs von $7,436\mu\text{m} (\pm 0,316\mu\text{m})$.

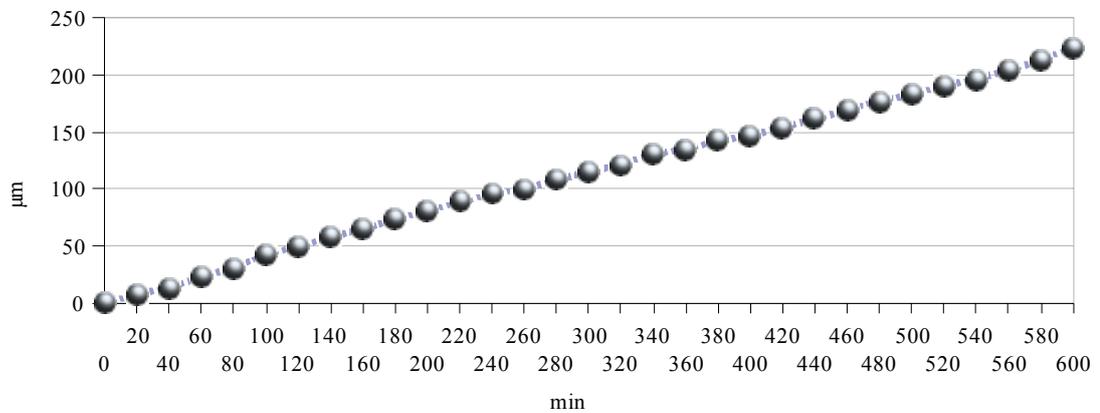


Abb. 42 Wachstum einer Caulonemazelle in 10 mM Cu-EDTA

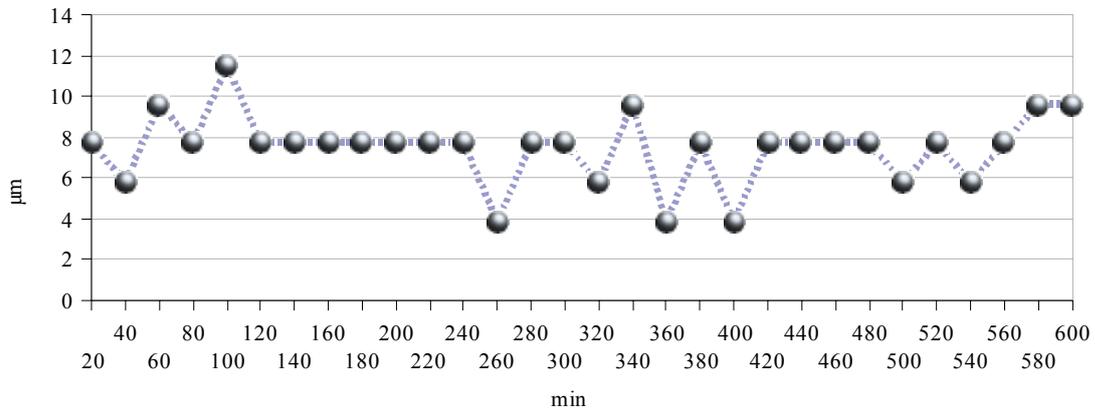


Abb. 43 Zuwachs pro 20 Minuten in 10 mM Cu-EDTA

Das Wachstum des Caulonemas im 2 mM Eisenmedium (Abb. 44) zeigte ein durchschnittliches Wachstum von $8,75\mu\text{m} (\pm 1,13)$.

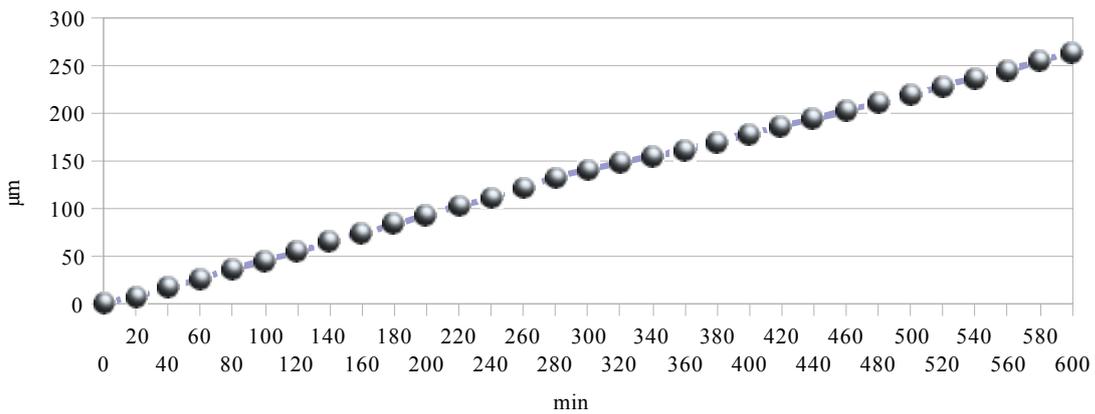


Abb. 44 Wachstum einer Caulonemaszelle in 2 mM Fe-EDTA

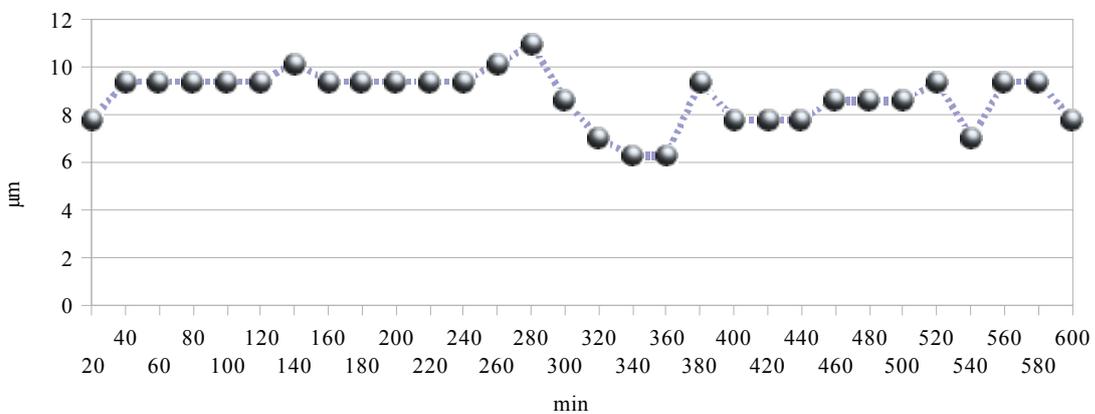


Abb. 45 Zuwachs pro 20 Minuten in 2 mM Fe-EDTA

Der K-S-Anpassungstest auf Normalverteilung zeigte für die Daten der Kontrolle im Gegensatz zum 10 mM Kupferansatz keine Normalverteilung. Daher wurde für den weiteren Vergleich der beiden Proben der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Dieser zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen dem Zuwachs der Kontrolle und dem 10 mM Kupfer-Ansatz (Tab. 19). Zwischen der Kontrolle und dem 2 mM Eisen-Ansatz, sowie zwischen dem 10 mM Kupfer-Ansatz und dem 2 mM Eisen-Ansatz war jeweils ein hoch signifikanter Unterschied (Abb. 46).

Medium	Zuwachs ($\mu\text{m}/20\text{min}$)	n
Kontrolle	$7,396 \pm 0,266923$	30
10mMCu	$7,43567 \pm 0,315798$	30
2mMFe	$8,75 \pm 1,131208$	30

Tab. 19 Mittelwerte und Standardabweichung des Zuwachses in Kontrolle, 10 mM Cu-EDTA und 2 mM Fe-EDTA

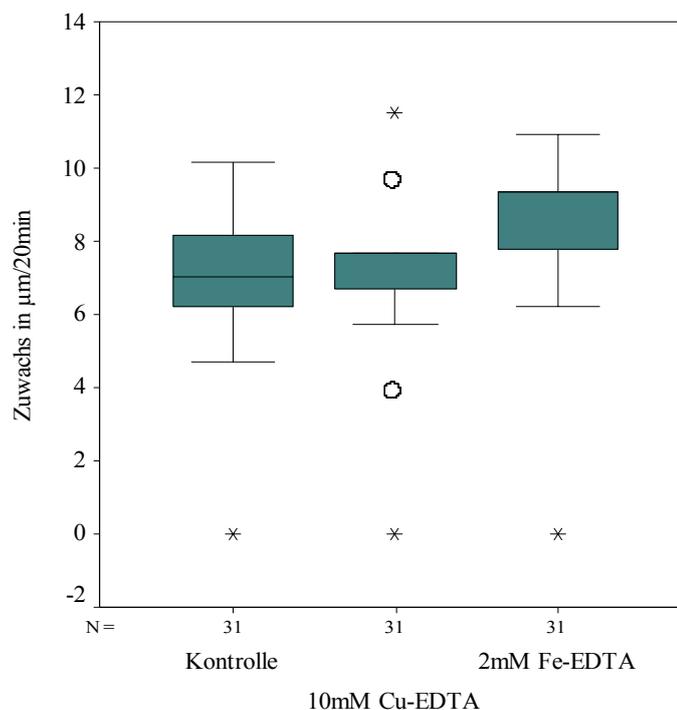


Abb. 46 Box-Plot des Zuwachses in Kontrolle, 10 mM Cu-EDTA und 2 mM Fe-EDTA

Die folgende Tabelle (Tab. 20) zeigt den durchschnittlichen Zuwachs pro Stunde. Diese wurde erstellt, um die ermittelten Daten mit jenen aus der Literatur besser vergleichen zu können.

Medium	Zuwachs (µm/h)	n
Kontrolle	22,186 ± 1,19409	10
10mMCu	22,308 ± 0,95929	10
2mMFe	26,25 ± 2,9046	10

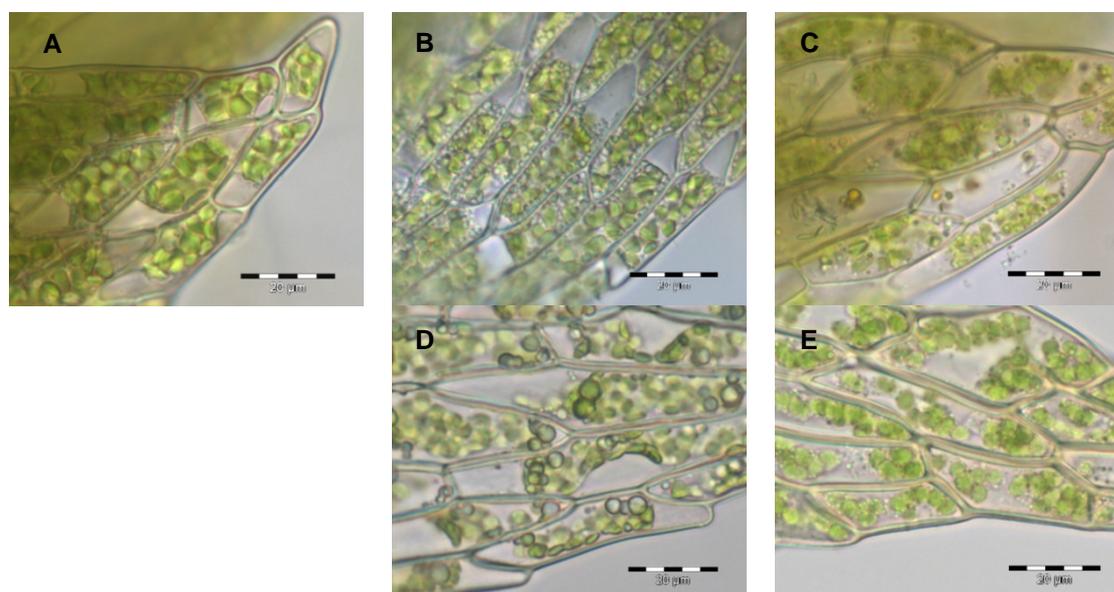
Tab. 20 Mittelwert und Standardabweichung des Zuwachses pro Stunde in Kontrolle, 10 mM Cu-EDTA und 2 mM Fe-EDTA

5.7.4 Resistenzversuche

Die Resistenzversuche zeigten unter Betrachtung der unterschiedlichen Kulturbedingungen (Kontrolle, 10 mM Cu) keine deutlichen Veränderungen hinsichtlich der Resistenz. Die ermittelten Ergebnisse können der Tabelle 21 entnommen werden. *P. drummondii* zeigt ab einer Konzentration von 10^{-3} M Cu-EDTA Plasmolyse und zu einem großen Teil lassen sich die Zellen bei dieser Konzentration auch wieder deplasmolysieren. Das gilt für die Präparate der Kontrollplatten. Bei den Moosen von den Cu-EDTA-Platten konnten Plasmolyse und Deplasmolyse bei mind. 50% der Zellen ab einer Konzentration von 10^{-4} M festgestellt werden. Für *M. elongata* eine gering höhere Resistenz. Eine deutliche Plasmolyse ist ab einer Konzentration von 10^{-2} M Cu-EDTA zu erkennen, sowohl in der Kontrolle als auch beim Cu-EDTA-Ansatz.

Art	Ansatz	1M	10^{-1} M	10^{-2} M	10^{-3} M	10^{-4} M	10^{-5} M	10^{-6} M	10^{-7} M	10^{-8} M	10^{-9} M	Kontr.
<i>P. drummondii</i>	Kontr.	+	+	+	+/l	+/l	l	l	l	l	l	l
<i>P. drummondii</i>	Cu	+	+	+	+	+/l	+/l	l	l	l	l	l
<i>M. elongata</i>	Kontr.	+	+	+/l	+/l	l	l	l	l	l	l	l
<i>M. elongata</i>	Cu	+	+	+/l	+/l	l	l	l	l	l	l	l

Tab. 21 Ergebnisse der Resistenzversuche für Cu; l: alle Zellen leben; +/-: 50% der Zellen lebend; + alle Zellen tot



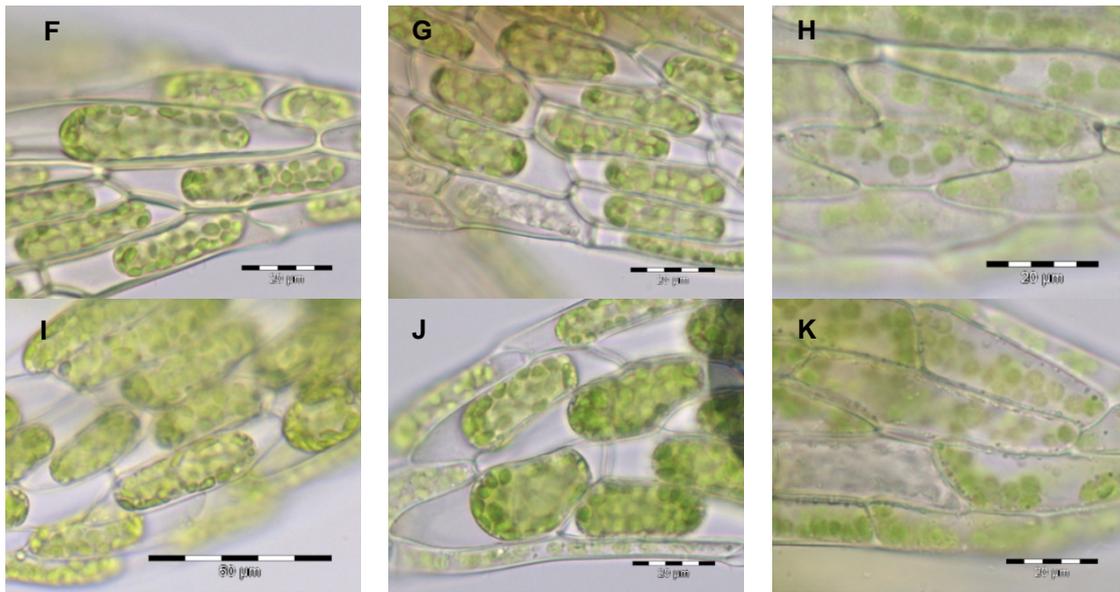


Abb. 47 *P. drummondii* A-E; A-C auf Kontrolle gewachsen; E-F auf 10 mM Cu-EDTA gewachsen; A Kontrolle; B 10^{-3} M Cu-EDTA; C 1 M Cu-EDTA; D 10^{-4} M Cu-EDTA; E 1 M Cu-EDTA; *M. elongata* F-K; F-H auf Kontrolle gewachsen; I-K auf 10 mM Cu-EDTA gewachsen; F Kontrolle; G 10^{-2} M Cu-EDTA; H 10^{-1} M Cu-EDTA; I 10^{-3} M Cu-EDTA; J 10^{-2} M Cu-EDTA; K 10^{-1} M Cu-EDTA

Die Resistenzversuche mit Fe-EDTA zeigten sowohl für *P. drummondii* als auch für *M. elongata* die gleichen Grenzen. Diese liegen zwischen 10^{-2} und 10^{-3} M (siehe Tab 22). Es ist dabei anzumerken, dass der Zustand von *M. elongata* nicht so gut war (Abb. 48 D) und daher ein gewisser Unsicherheitsfaktor vorhanden ist.

Art	Ansatz	1M	10^{-1} M	10^{-2} M	10^{-3} M	10^{-4} M	10^{-5} M	10^{-6} M	10^{-7} M	10^{-8} M	10^{-9} M	Kontr.
<i>P. drummondii</i>	Fe	+	+	+/1	+/1	1	1	1	1	1	1	1
<i>M. elongata</i>	Fe	+	+	+/1	+/1	1	1	1	1	1	1	1

Tab. 22 Ergebnisse der Resistenzversuche für Fe

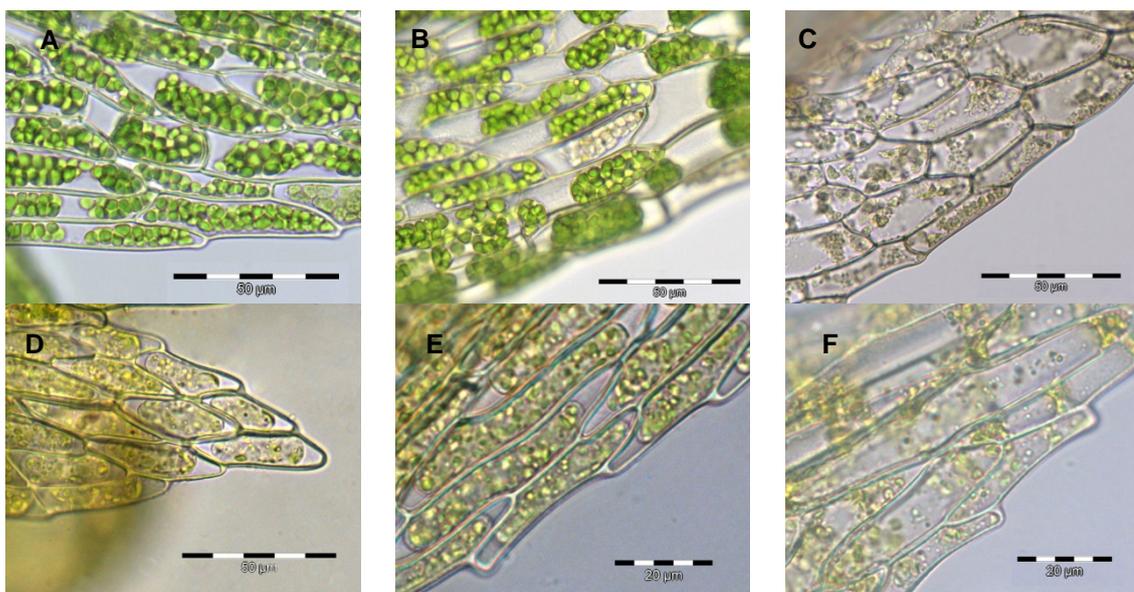


Abb. 48 *P. drummondii* A-C; A Kontrolle; B 10^{-2} M Fe-EDTA; C 1 M Fe-EDTA; *M. elongata* D-F; D Kontrolle; E 10^{-4} M Fe-EDTA; F 10^{-1} M Fe-EDTA

5.8 Präparation für REM Bilder

Um den Habitus der Moose im REM möglichst naturgetreu zu dokumentieren, wurde anstelle der Lufttrocknung die spezielle Methode des Schockgefrierens und anschließenden Gefriertrocknens ausprobiert. Die Proben wurden anschließend mit Gold bedampft.

Das Ergebnis dieser Präparationsmethode ist sehr gut. Die Zellen sind turgeszent und es können die Moose (Abb. 49-51; 53-54) naturgetreu abgebildet werden. Wie an dem Schnitt und auch an den Bruchstellen zu erkennen ist, werden durch das schockartige Einfrieren im flüssigen Stickstoff auch das Plasma und die Organellen, zumindest die großen, wie Chloroplasten, sehr gut konserviert (Abb.52; 55-56).

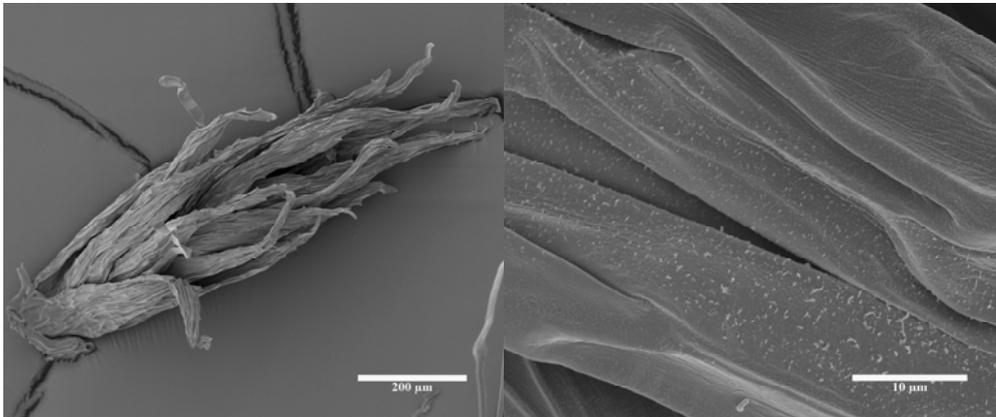


Abb. 49 *M. elongata* Cu, Habitus

Abb. 50 *M. elongata* Cu, Blatt Oberfläche

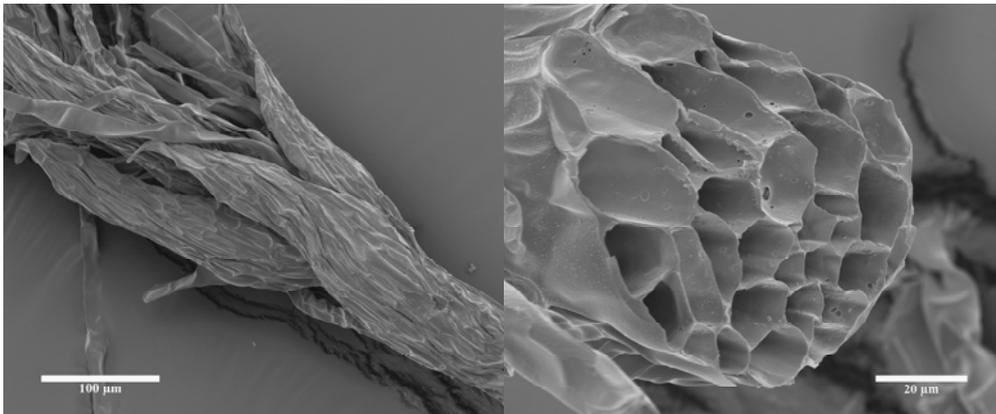


Abb. 51 *M. elongata* Kontrolle, Habitus

Abb. 52 *M. elongata* Kontr., Stämmchen
Querschnitt

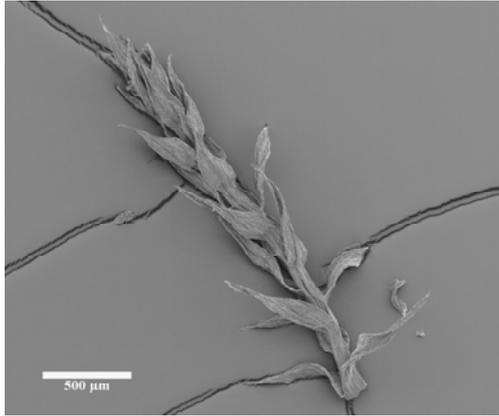


Abb. 53 *P. drummondii* Kontrolle, Habitus

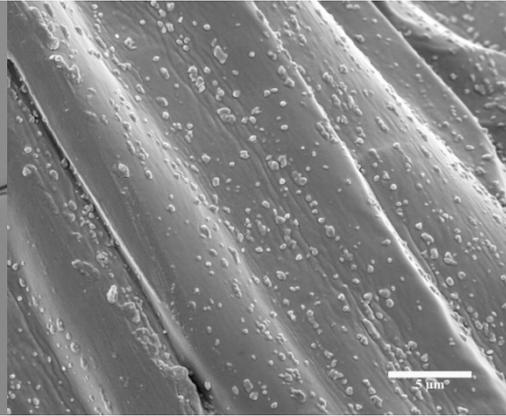


Abb. 54 *P. drummondii* Kontr., Stämmchen
Oberfläche, Balken = 5 μm

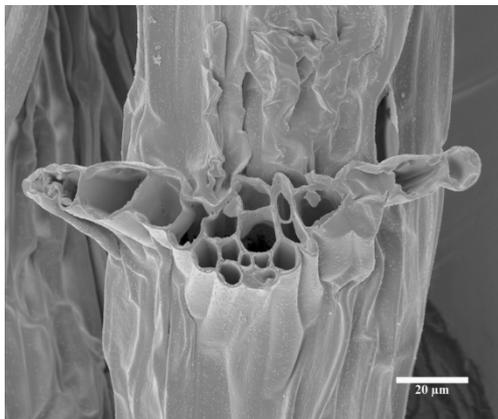


Abb. 55 *P. drummondii* Kontr.,
Blattquerschnitt

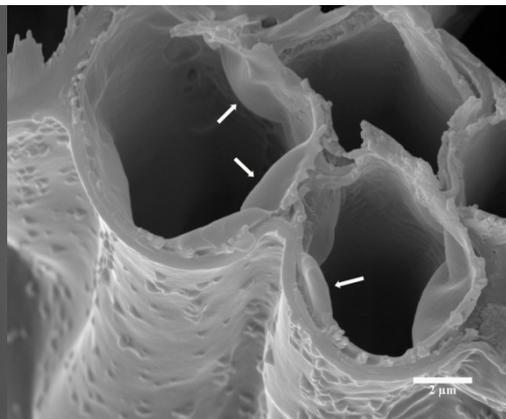


Abb. 56 *P. drummondii* Kontr.,
Detail Bl.-Querschnitt; Pfeile = Chloroplasten

5.9 Anatomische Präparate

Die Querschnitte von *P. drummondii* (Abb. 58 A-F) zeigen nach einer äußersten Zellschicht (=Epidermis) aus kleineren Zellen (Abb. 58 D) ein Gewebe von größeren Zellen (= Parenchym) (Abb. 57). Dieses schließt in der Mitte einen Strang von kleineren, dünnwandigeren Zellen ein (Abb. 58 F). Nach (Frahm, 2001) könnte es sich dabei um das sog. Hadrom handeln. Bei der Epidermis sind Ansätze einer Verdickung der Zellwände zu erkennen, in diesem Fall wäre von einem Stereom zu sprechen.

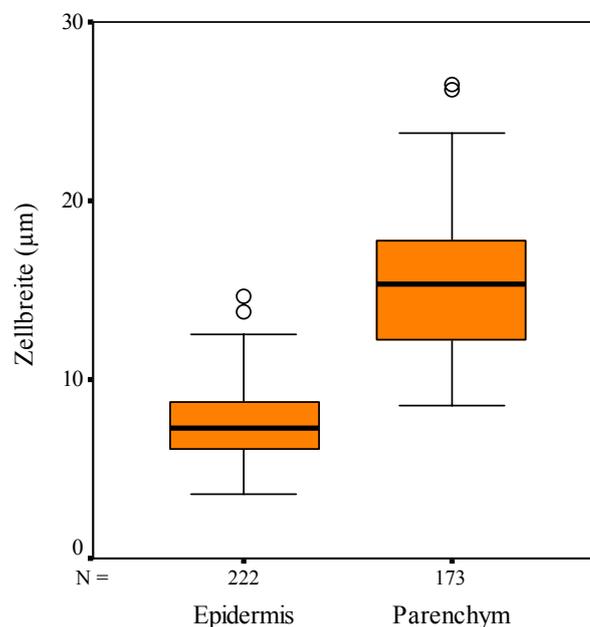


Abb. 57 Box-Plot der Zellbreite von Epidermiszellen und Parenchymzellen von *P. drummondii*

Bei *Mielichhoferia elongata* sind die geschnittenen Pflanzen in einem jungen Stadium. Leider war die Orientierung der Moose im Paraffin nicht ganz klar zu erkennen und daher sind die Anschnitte zum Teil in keiner geraden Ebene. Zu erkennen ist die Vegetationsspitze mit ihrer dreischneidigen Scheitelzelle (Abb. 58 G).

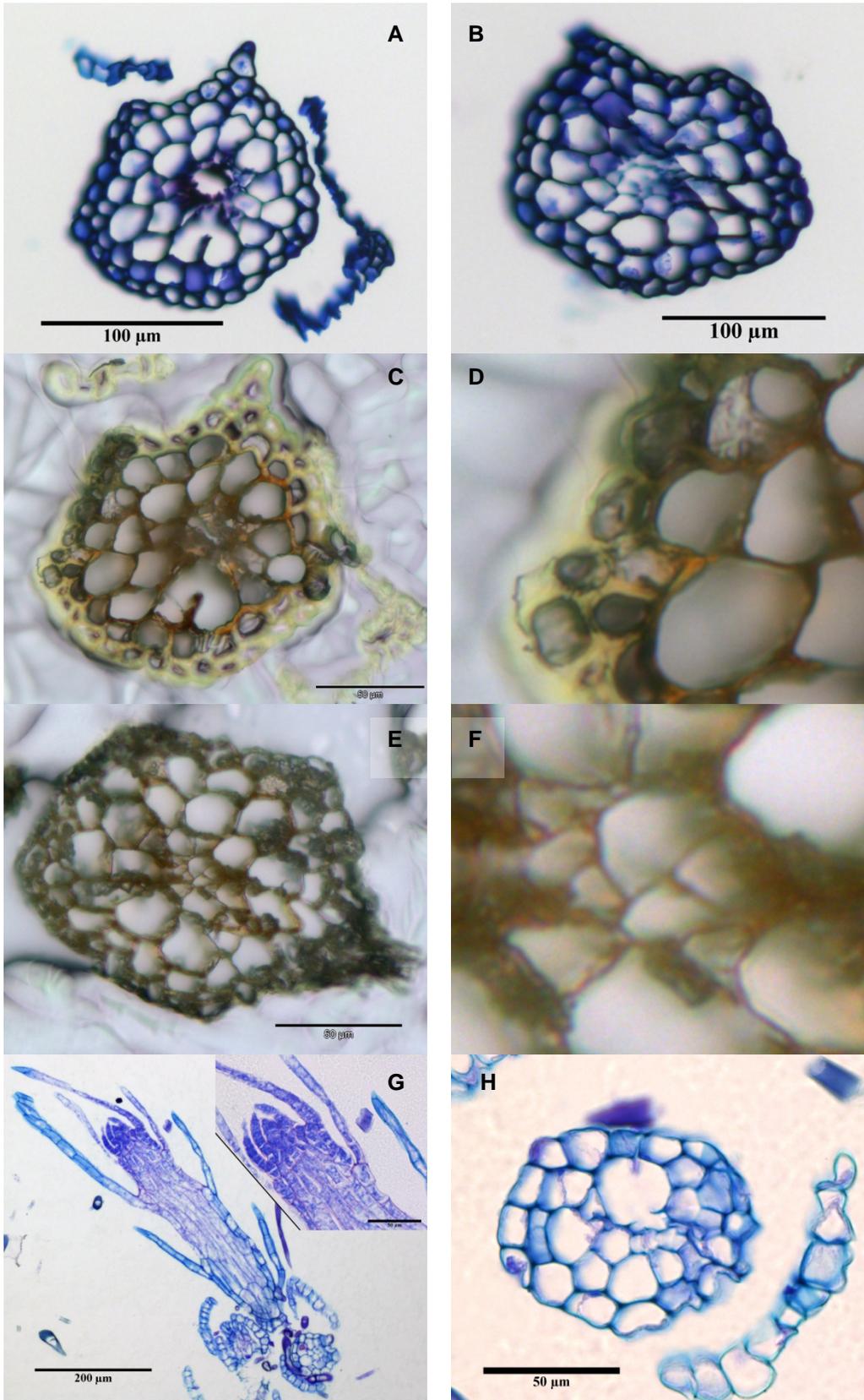


Abb. 58 A, B *P. drummondii* Querschnitte Toluidinblaufärbung; C, D *P. drummondii* ungefärbt (noch im Paraffin); E, F Details; G *M. elongata* junge Pflanze, Längsschnitt, Toluidinblaufärbung; Detail – Vegetationsspitze Balken = 50 µm; H *M. elongata* Querschnitt, Toluidinblaufärbung

6 Diskussion

6.1 Kultivierung

Für die geplanten Resistenz- und Stressversuche war es zunächst notwendig, die Moose als sterile *in-vitro* Kulturen zu etablieren. Dazu wurden verschiedene Ansätze getestet. Dabei zeigte sich, dass die Sterilisierung der Gametophyten von großer Wichtigkeit ist: Wie in den Ergebnissen ausgeführt, war dies von unterschiedlich gutem Erfolg. Am effektivsten unter dem Gesichtspunkt der Keimfreiheit ist sicher HgCl_2 , allerdings ist dessen toxische Wirkung auf die Moose ebenfalls sehr stark und es konnten daher nur wenige lebende Moose in den Ansätzen erhalten werden. So kann für *P. drummondii* und *M. elongata* die Sterilisierung mit einer Hypochloritlösung, wegen der guten Oberflächensterilisation und Überlebensrate, als geeignete Methode bei diesen beiden Moosen angesehen werden. Für andere Moose muss die jeweils optimale Lösung jedoch empirisch herausgefunden werden, da es sich immer um eine Gradwanderung zwischen Sterilisation und Überleben der Moose handelt. So dokumentierten Sabovijevic et al. (2003) ebenfalls Schwierigkeiten bei der Oberflächensterilisation von Moos-Gametophyten.

Für *P. drummondii* und *M. elongata* wurden sterile Kulturen angelegt. Beim Umpflanzen kam es aber immer wieder zu Kontaminationen, besonders in den Sommermonaten. Dies ist damit zu erklären, dass in dieser Zeit eine große Zahl von Pilzsporen in der Luft ist, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination steigt. Insbesondere bei *M. elongata* konnten immer wieder Pilzinfektionen beobachtet werden. Da *M. elongata* ein deutlich langsames Wachstum als *P. drummondii* aufweist, waren auch die negativen Auswirkungen einer Pilzinfektion auf deren Wachstum schwerwiegender. Auch das Auftreten von Bakterien in den Kulturen stellte ein gewisses Problem dar. Zwar kam es durch die auftretenden Infektionen nicht zu einer deutlichen Wachstumsminderung des Moooses, wie schon Pringsheim (1921) feststellte, aber aufgrund der Vergleichbarkeit der Versuche und ihrer Ergebnisse sollte auch eine mögliche Beeinflussung durch Infektionen ausgeschlossen werden. Die Interaktionen von Bakterien mit Moosen und ihre Auswirkungen auf das Wachstum der Moose werden bei Spiess et al. (1984) angeführt. So können die Bakterien, welche der

Zellwand anhaften, bewirken, dass die Moose Verbindungen zu erzeugen, welche atypisch sind oder normalerweise nur in geringen Konzentrationen vorkommen und deren Wirkung eine Beschleunigung oder Veränderung des Wachstums ist. Allerdings schlossen Spiess et al. (1982) aus den Versuchen, dass die Bakterien-Moos Assoziationen nicht zufällig sind. Daher ist anzunehmen, dass die zufällig in die *in vitro* Kulturen eingewanderten Bakterien keine oder eher nur negative Auswirkungen auf die Moose haben. Nur zeigten sich solche bakteriellen Infektionen oft erst nach dem Umsetzen wodurch unter Umständen eine ganze Generation verloren gehen kann.

Für eine erfolgreiche Kultivierung der Moose ist die Temperatur zu beachten (Furness and Grime, 1982). Nach den gesammelten Daten zeigt sich für *M. elongata* eine niedrigere Temperatur (Glashaus: 11-22 °C) gegenüber *P. drummondii* (Labor: 22-27 °C) als empfehlenswert. Da *M. elongata* am Naturstandort an schattigen Stellen, wie z.B. am Stolleneingang vorkommt, scheinen diese Bedürfnisse plausibel. *P. drummondii* kommt hingegen an halbschattigen und sonnenexponierteren Stellen vor. Die Lichtverhältnisse ($48 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$) im Labor sind für die Kultivierung als ausreichend anzusehen. Diese liegen zwischen den Literaturwerten $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ (Mallon et al., 2007) und $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ (Hohe et al., 2002).

Bei *Scapania undulata* waren die Sterilisationsversuche weniger erfolgreich. Wie schon bei den beiden Laubmoosen war die Behandlung mit HgCl_2 wirksam gegen Infektionen, allerdings konnten bei diesem Ansatz wie auch bei der Behandlung mit Hypochlorid keine überlebenden Moose erhalten werden. Die Wahl fiel daher auf ein anderes gängiges Sterilisationsmittel, H_2O_2 . Diese Methode brachte insofern Erfolg, als es nach ca. 5 Monaten gelang eine sterile Kultur anzulegen, welche auch Wachstum zeigte. Aufgrund dieses langsamen Wachstums wurden die weiteren Versuche nicht an *S. undulata* durchgeführt. Die schlechten Ergebnisse für *S. undulata* können nun einerseits mit einem schlechten Zustand des verwendeten Pflanzenmaterials erklärt werden, da es oft nicht möglich war, gleich nach dem Sammeln Kulturen anzulegen und die Aufbewahrung und der damit verbundene Stress zu einer Schwächung sowie zum Absterben eines gewissen Prozentsatzes führen könnte. Da die Oberflächensterilisation auch einen hohen Stressfaktor mit sich bringt, kann es leicht zu einem Absterben der Zellen kommen. Es ist dabei auch zu beachten, dass zu der Kultivierung von Lebermoosen auf Agar wenig bekannt ist, und nicht sicher ist, ob dies eine gute

Methode dafür ist. Im speziellen gilt das für *S. undulata*, welches ein aquatisches Moos ist. Eine Kultivierung nach diesem Ansatz ist jedenfalls nicht unmöglich, da es in 2 Fällen gelungen ist. Allerdings war die Zeitspanne vom Einsetzen bis zum ersten sichtbaren Wachstum, mit mehr als 2 Monaten, eine sehr lange, sodass in einem angemessenen Zeitraum kein Kultivierungsprotokoll zu erstellen war. Nach der zweimal geglückten Kultivierung kann zumindest vermutet werden, dass *S. undulata*, ähnlich wie *M. elongata*, eine niedrigere Temperatur bevorzugt. Da sie am Naturstandort im bzw. am Bach vorkommt, ist eine ständige Kühlung gegeben. So kann das Temperaturoptimum um die 10°C betragen. Am Naturstandort kam es in Symbiose mit ercoider Mykorrhiza vor (nach mündl. Mitteilung I.Lichtscheidl). Wegen der durchgeführten Oberflächensterilisierung wird diese vermutlich zerstört und eine Kultivierung daher möglicherweise erschwert. Ein Versuch der Kultivierung ohne Oberflächensterilisierung und geeigneten Antibiotika ist daher ein Ansatz, welcher in Zukunft interessant wäre.

Da die Nährstoffaufnahme bei Moosen - neben der atmosphärische Perzeption - hauptsächlich über das Caulonemata und die Rhizoide erfolgt (Duckett et al., 1998), ist bei geringer Ausbildung dieser Organe auch von einer geringeren Aufnahme auszugehen. Es wurden 5 in der Literatur für Mooskultivierung angeführte Medien verwendet. Die Wahl des Kultivierungsmediums erfolgte darauf hin, dass die Ausbildung des Caulonematas gefördert wird. Soll Caulonemata induziert werden, braucht es bestimmte Nährstoffe, wie z.B. Phosphor, welche auf den Hormonhaushalt einwirken und so das Wachstum steuern (Goode et al., 1992). Ob ein niedriger Nährstoffgehalt alleine genügt um die Ausbildung des Caulonematas positiv zu beeinflussen wird hingegen von Goode et al. (1992) kritisch betrachtet. Diese Ansichten decken sich mit den Ergebnissen der Kultivierung auf modifiziertem Benecke-Medium (Gang et al., 2003), welches einerseits geringe Konzentrationen an Stickstoff, Magnesium und Calcium hat, aber die höchste Konzentration an Phosphor im Vergleich zu den fünf verwendeten Medien (Tab. 23). Die gute Ausbildung des Protonemas und neuer Moospflanzen in einem relativen kurzen Zeitraum (3-6 Wochen) machte das Benecke-Medium bevorzugenswert gegenüber anderen gängigen Mooskultivierungsmedien (Knop, BCD, MS). Die geringen Nährstoffkonzentrationen im modifiziertem Benecke-Medium sind für die Untersuchung des Schwermetallstress auch insofern gut, da wie schon Simola (1976) angenommen hat, diese sog.

Hungermedien zu einer sensitiveren Reaktion gegenüber den Schwermetallen bei Moosen führten.

Nährstoffe	Medien (mg/l)				
	Heller	Knop	BCD	MS	Benecke
NH ₄ NO ₃				1650	200
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250	250	264,47	370	100
KH ₂ PO ₄		250	244,96	170	400
KCl	750	250			
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O		1000			
FeSO ₄ · 7H ₂ O		12,5	12,51		
CaCl ₂ · 2H ₂ O	75			440	100
KNO ₃			1,01	1900	
CuSO ₄ · 5H ₂ O			0,05		
ZnSO ₄ · 7H ₂ O			0,05		
H ₃ BO ₃			0,62		
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O			0,02		
MnCl ₂ · 4H ₂ O			0,4		
KJ			0,03		
NaNO ₃	600				
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	125				
CoSO ₄ · 7H ₂ O			0,06		
FeCl ₃ · 6H ₂ O					0,93

Tab. 23 Medienzusammensetzung (mg/l)

Auf die Verwendung von Phytohormonen wurde bei den Untersuchungen verzichtet. In der Literatur sind mehrere Erkenntnisse zum Einfluss dieser auf das Wachstum, im speziellen auf jenes des Protonemas zu finden. So beschreibt Bopp and Brandes (1964) eine Förderung der Knospenbildung durch Kinetin, welches ab einer Konzentration von 1mg/l in allen Zellen des Protonemas eine Bildung von Knospen bewirkt. Unter dieser Konzentration werden nur wenige Zellen beeinflusst. Iwasa, (1965) führt zum Einfluss des Kinetins allerdings an, dass zwar ein eindeutiger Effekt des Kinetins auf die Morphogenese des Protonemas festgestellt werden kann, jedoch die durch das Phytohormon induzierten Knospen abnorm sind. Diese stellten ihr Wachstum in einer späteren Entwicklungsphase ein und zeigten bis dahin ein anormales Wachstum. In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass andere gängige Phytohormone, wie IAA, NAA, 2,4-D oder Gibberelinsäure keine Induktion einer Knospenbildung im Protonema bewirken. Alle bis auf 2,4-D führten bei geringer Konzentration zu einer Unterdrückung des Protonemawachstums. Diese Unterdrückung sowie die variierende Morphologie

unter dem Einfluss von Phytohormonen würde es schwierig machen, die speziellen Auswirkungen der Schwermetalle auf Morphologie und Wachstum zu erkennen.

Als Alternative zu den Agarkulturen, vor allem für längere Kultivierungen und größere Mengen, können auch Flüssigkulturen hergestellt werden. Diese wurden hier nur im geringen Ausmaß verwendet, aber es konnte zumindest mit *P. drummondii* gezeigt werden, dass diese relativ problemlos und einfach zu erhalten sind. Einzig ein Medien austausch bzw. Erneuerung alle 2 bis 3 Wochen waren nötig. Ein zusätzliches Schütteln zur Anreicherung zur O₂ war hingegen nicht notwendig. Es konnte hier, wie schon Pringsheim (1921) bei seinen Studien gezeigt hat, nicht nur ein Wachstum von Protonema sondern auch Knospenbildung beobachtet werden. Sidhu and Brown (1996) beschreibt noch eine weitere Methode, die Wirkung verschiedener Schwermetalle auf das Wachstum, ihre Toxizität sowie die Aufnahme zu untersuchen. Dabei werden die Gametophyten der Moose auf einem Klebestreifen befestigt und so in eine Box mit dem Medium gegeben. Allerdings wurde diese Methode nur mit größeren Moos-Arten durchgeführt (min. 2 cm groß). Ob diese Methode für kleine Arten wie *M. elongata* auch anwendbar ist müsste erst getestet werden, da die Gefahr besteht, dass sich das flüssige Medium außen am Gametophyten hinauf saugt und dass die Oberfläche des gesamten Moores mit dem Medium benetzt wird. Beide Methoden sind für die Fragestellung dieser Arbeit allerdings nicht anwendbar, da hier die Aufnahme über die gesamte Oberfläche vermieden werden sollte.

Da spezielle Lebensräume wie alte Abbauhalden durch Sanierung im Verschwinden sind (Smith, 1979) besteht für Methallophyten die Gefahr des Aussterbens. Daher ist unter dem Gesichtspunkt der Arterhaltung ein vollständiges Kultivierungsprotokoll für die beiden Moose von großer Wichtigkeit. Insbesondere die Produktion von Sporen, welche über längeren Zeitraum gelagert werden könnten, hätte dabei eine tragende Rolle. Allerdings ist Sporenbildung bei *in vitro* Kulturen nicht einfach und ist besonders bei den untersuchten Arten, welche schon am Naturstandort wenig bis gar keine Sporophyten bilden (Shaw, 1989), eine Herausforderung. Eine große Hilfe können schon bekannte Methoden, wie für *Physcomitrella patens* (Cove and Knight, 2008) oder *Bryum argenteum* (Chopra and Bhatla, 1981) etabliert, sein wobei sich zeigt, dass es je nach Art große Unterschiede bezüglich notwendiger Temperatur und Lichtverhältnisse für die Produktion von Gametangien gibt. Daher wäre es auch notwendig zuvor die

optimalen Verhältnisse für die jeweilige Art auszutesten. So zeigte schon Rincon (1993), dass je nach Art mehr oder weniger Licht ein besseres Wachstum bedingt.

6.2 Einfluss der Schwermetalle

Als Kupfersalz wurde Cu-EDTA gewählt, da im Gegensatz zu anderen Cu-Salzen, wie CuCl_2 oder CuSO_4 nur bei physiologischem pH ausreichende Löslichkeit gegeben war. Darüber hinaus ist EDTA als Gegenion für sich allein rel. wenig giftig, sodass die Auswirkungen des Cu-EDTA auf das Cu bezogen werden können. Über die Verwertbarkeit dieser Verbindung durch die Moose ist allerdings keine Literatur gefunden worden. Durch die von den Kultivierungsversuchen gesammelten Erkenntnisse, welche für *P. drummondii* eine Toxizität bei 0,1 M Cu-EDTA aufweisen, zeigt sich ein Einfluss auf das Wachstum. Bei *M. elongata* wurde bei dieser Konzentration noch Wachstum erzielt, jedoch ist dieses deutlich verlangsamt gegenüber den Ansätzen mit geringeren Konzentrationen an Kupfer, der Phänotyp ist kleiner und eine gestauchte Achse ist zu erkennen. Jedoch ist diese Interpretation mit Vorsicht zu genießen, da die einzige erfolgreiche Kultivierung von *M. elongata* auf einem Medium mit der Konzentration von 0,1 M nur in einer Klimakammer mit deutlich besseren Lichtverhältnissen erfolgreich war. Die phänotypischen Unterschiede auf den jeweiligen Medien zu interpretieren, ist aufgrund der Variabilität der Moose in den Kulturen leider kaum möglich. So sind nach Sabovijevic et al. (2003) klare Aussagen über Wachstumsänderungen auch bei den bekannten Modellmoosen *Physcomitrella patens* und *Funaria hygrometrica* nicht einfach, da Variabilität bezüglich Wachstum und Entwicklung sehr groß ist.

Im Unterschied zu den Versuchen mit Kupfer zeigt sich bei der Kultivierung auf Fe-EDTA für beide Moose die gleiche Toxizitätsgrenze, welche zwischen 1 mM und 10 mM liegt. Auf den Nährmedien mit 1 mM Fe-EDTA zeigte sich bei *P. drummondii* Wachstum, welches im Vergleich zu der Kontrolle und den niedrigeren Konzentrationen nur eine geringe Minderung aufwies. Hingegen ist bei *M. elongata* doch ein größerer negativer Einfluss zu sehen. Die allgemeine niedrigere Toleranz gegenüber Eisen kann damit erklärt werden, dass auch auf den Naturstandorten nur ein geringer Gehalt an mobilen Eisen vorkommt. Daher liegt nur eine geringe Adaption an diese Werte vor.

6.3 Resistenz

Bei der Resistenz ist anzumerken, dass die Ergebnisse (Tab. 24) mit Vorsicht zu genießen sind, da die Lebendbestimmung mittels Plasmolyse und Deplasmolyse nicht immer eindeutige Resultate liefert. So kann der Effekt, welcher in der Literatur (Url, 1956) als Todeszonen beschrieben wird, auftreten. Hier kann zunächst ganz normal ab einer bestimmten Konzentration einer Schwermetalllösung das Absterben der Zellen festgestellt werden. Allerdings wird dann bei einer noch höheren Konzentration der Großteil der Zellen lebend vorgefunden. Url (1956) erklärte diesen Effekt damit, dass sich eine schützende Schicht an der Plasmalemmaoberfläche anlagert, welche das weitere Eindringen des Metalls verhindert. Die Vergleichbarkeit der Versuche aus der Literatur (Url, 1956, Saukel, 1980, Hörmann, 2001 und Hus, 2008) ist nur bedingt gegeben, da bei deren Versuchen als Gegenion Sulfat genommen wurde. Trotzdem kann eine ähnliche Resistenzhöhe festgestellt werden. So liegt die ermittelte Resistenz für Kupfer im Bereich von 10^{-2} bis 10^{-3} M bei *M. elongata*, was sich mit den Ergebnissen von Hus (2008) deckt und ebenfalls mit jenen von Url (1956) übereinstimmt. Hingegen liegen die Resistenzwerte von *P. drummondii* aus den *in vitro* Kulturen mit 10^{-3} bis 10^{-5} M etwas höher als bei Hus (2008), welche eine Schädigung ab 10^{-5} M beobachten konnte.

Dass keine deutliche Verschiebung der Grenzen zwischen Moosen aus der Kontrolle und den Kupferansätzen festgestellt werden konnte, liegt wohl in erster Linie daran, dass hier keine weitere Adaption an höhere Schwermetallkonzentrationen möglich war, da die genetisch festgelegten Grenzen schon ausgereizt wurden. Es kann nach Biebl (1949) von einer ökologischen Resistenz des Plasmas gesprochen werden. Um eine Verschiebung der Toleranzgrenzen zu erzielen, sind voraussichtlich größere Zeiträume notwendig und eine sexuelle Reproduktion. Unter Anbetracht der evolutionären Prozesse, welche zur Ausbildung einer Metall-Toleranz bei untersuchten Populationen von *Ceratodon purpureus* führten und dafür ca. 90 Jahre brauchten (Jules and Shaw, 1994), kann von einem längerem Zeitraum dafür ausgegangen werden.

Ähnlich wie beim Kupfer verhalten sich die Moose beim Eisen. Im Vergleich mit den Ergebnissen von Hus (2008) konnte für *P. drummondii* eine etwas höhere Grenze ermittelt werden (zwischen 10^{-2} und 10^{-3} gegenüber 10^{-4}). Bei *M. elongata* ist sie hingegen gleich hoch (10^{-2} M).

	Kupfer			Eisen		
	Agar	Resistenz	Boden [ppm]	Agar	Resistenz	Boden [ppm]
<i>P. drummondii</i>	31 mM	1 mM	6370/830	1 mM	10 mM	55650/40
<i>M. elongata</i>	0,1 M	10 mM	3870/710	1 mM	10 mM	109800/50

Tab. 24 Gegenüstellung der Wachstumsgrenzen auf Agar, den Resistenzversuchen und Cu bzw. Fe Gehalten am Naturstandort nach (Hus, 2008); Bodenwerte in ppm - Gesamtgehalt/mobile Fraktion

Über die genaueren Mechanismen der Resistenz gegen die Schwermetalle kann hier leider noch keine Aussage getroffen werden. Vorallem ob das in höheren Pflanzen beschriebene System der Phytochelatine dabei eine Rolle spielt, wäre für weitere Untersuchungen eine interessante und wichtige Fragestellung. Rother et al. (2006) haben für *P. patens* unter Cd^{2+} Stress eben dieses nicht gefunden. Es ist daher zu klären, ob es bei den Laubmoosen überhaupt vorhanden ist, und falls nicht, welche Mechanismen statt dessen wirksam werden.

Beim Vergleich zwischen den Grenzen am Agar und der plasmatischen Resistenz ist zu beachten, dass die Schwermetalle im Agar nicht vollkommen verfügbar vorliegen. So geben die Messergebnisse der AAS eine Verfügbarkeit von Kupfer um 50% an. Damit liegen die ermittelten Grenzen zumindest beim Kupfer weniger weit auseinander.

6.4 Elementanalyse

Die Ergebnisse der Elementanalyse geben die in den früheren Arbeiten von Hörmann (2001) und Hus (2008) vermutete Kupfertoleranz sowie Kupferaufnahme der Moose *P. drummondii* und *M. elongata* wieder. Allerdings können bei weitem nicht so hohe Gehalte ermittelt werden wie bei den vom Naturstandort entnommenen Exemplaren. Die Aufnahme von Eisen kann, bis auf eine Ausnahme (siehe *M. elongata*) überhaupt nicht gesichert nachgewiesen werden.

		Agar-Kultur [wt%]	Naturstandort [wt%]
		<i>P. drummondii</i>	Cu
	Fe	0,1200 ± 0,0159	5,8
<i>M. elongata</i>	Cu	0,3367 ± 0,0655	22,8
	Fe	0,1075 ± 0,0092	13,4

Tab. 25 Vergleich der Basisregion von *P. drummondii* und *M. elongata* auf Agar und vom Naturstandort nach (Hus, 2008)

Die Unterschiede (Tab. 25) zwischen den *in vitro* Moosen und jenen vom Naturstandort werden deutlich, wenn die Maximalwerte verglichen werden. Die Arbeit von Hus (2008) beschreibt bei *P. drummondii* Werte von 20,6 wt% bzw. 27.550 ppm (Basis) Kupfer und für Eisen 7,9 wt% bzw. 28.400 ppm (Mitte), und bei *M. elongata* 22,8 wt% bzw. 11.900 ppm (Basis) Kupfer und für Eisen 15,6 wt% bzw. 36.380 ppm (Mitte), hingegen konnten bei den *in vitro* gewachsenen Moosen nur Höchstwerte von 0,88 wt% (bei *P. drummondii*) bzw. 0,33 wt% (bei *M. elongata*) für Kupfer erzielt werden. Die höheren Werte können nicht dadurch erklärt werden, dass die Moose an ihrem Standort vom Wasser, welches aus dem Stollen kommt, umspült werden. Die Untersuchungen von Hus haben nur einen geringen Gehalt für Kupfer und einen praktisch unter der Nachweisgrenze befindlichen Eisenwert ergeben. Stummerer (1970) beschreibt eine passive Aufnahme von Kupfer. Die Kupfer-Ionen werden in den Zellwänden adsorptiv gebunden. In ihren Untersuchungen wurde ein Zusammenhang mit dem Wasser, welches die Moose überspült, festgestellt. Jene Polster von *Mielichhoferia sp.*, die nicht regelmäßig mit Wasser aus dem Stollen in Berührung kamen, wiesen einen deutlich geringeren Gehalt an Kupfer (190 ppm gegenüber 2.640 ppm) auf. In der Arbeit von Vázquez et al. (1999) werden ebenso die hohen Gehalte von Schwermetallen, welche in der Zellwand präsent sind, beschrieben. Als Grund dafür wird das Vorhandensein einer großen Anzahl an Kationen-Austausch Stellen angegeben und eine Adaption um das Überleben in Gewässern mit hohen Schwermetallbelastungen zu erleichtern angeführt. Die nun vorliegenden unterschiedlichen Werte können auf verschiedene Weise zustande gekommen sein. Da am Naturstandort andere Licht- und Temperaturverhältnisse (gemessen für *M. mielichhoferia*, Moosrasen 7 mm tief, max. ~18°C (Saukel, 1980)) herrschen sind kann von einem langsameren Wachstum und somit einer längeren Aussetzung sowie Akkumulation des Schwermetalls ausgegangen werden.

Neben abiotischen Faktoren, welche hier ins Spiel kommen, sind auch noch mögliche äußere Verunreinigungen, welche nicht ganz entfernt werden konnten und daher die Messungen verfälschten, in Betracht zu ziehen. Diese Schwierigkeit beschreiben auch Aikawa et al. (1999) auch in ihrer Arbeit und verweisen darauf, dass Satake et al. (1988), um dieses Problem zu minimieren, riet, mehrere Methoden, wie EDX-Fluoreszenz-Spektroskopie und EDX-Mikroanalyse in Verbindung mit REM und TEM durchzuführen.

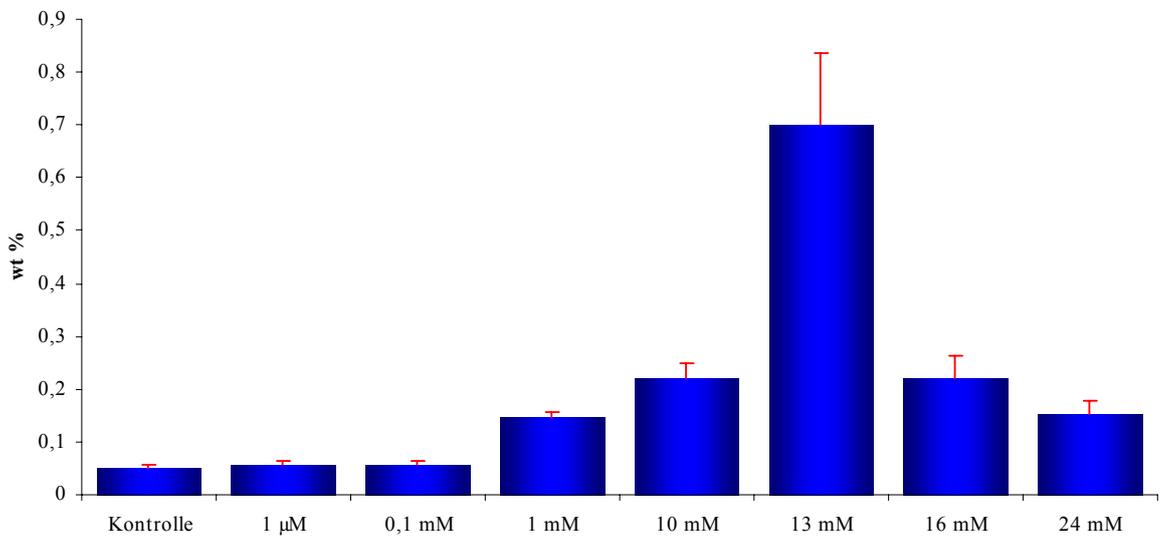


Abb. 59 *P. drummondii*, Cu Mittelwerte, rote Balken = Standardabweichung

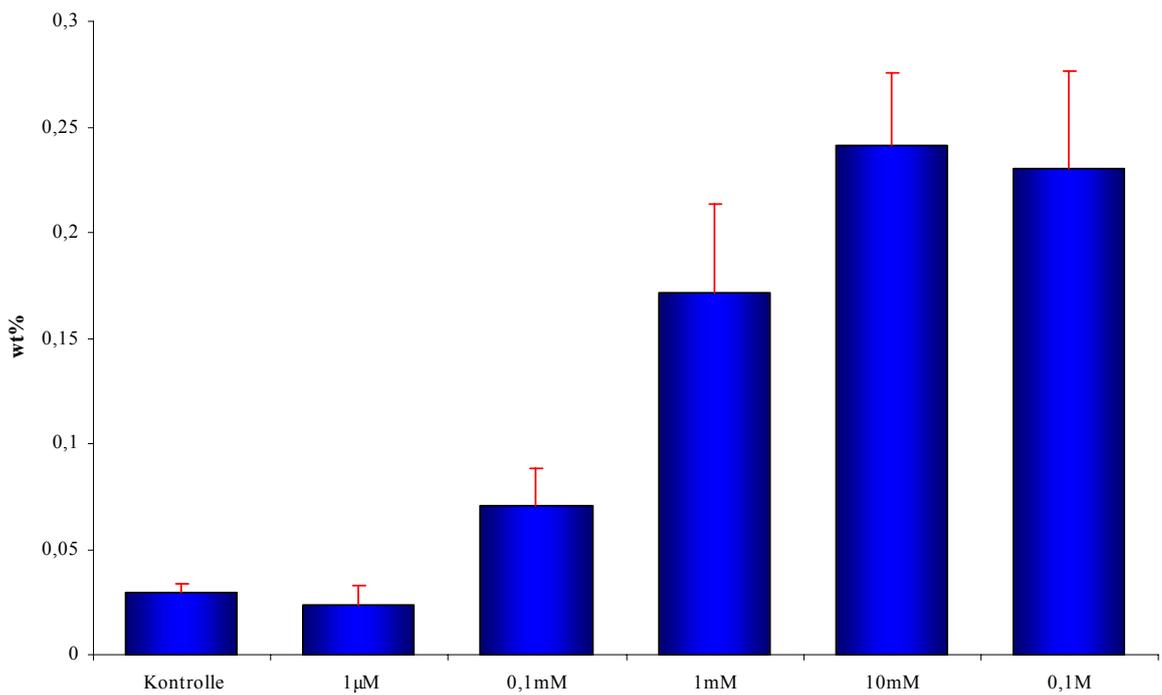


Abb. 60 *M. elongata*, Cu Mittelwerte, rote Balken = Standardabweichung

Bezüglich der Kupfermessungen bei *P. drummondii* kann von einer Aufnahme gesprochen werden, welche nicht linear ist, sondern eine Sättigung (bei 13 mM) erreicht (Abb. 59). D.h. ab diesem Zeitpunkt nimmt die Pflanze trotz höherem Angebot kein Kupfer mehr auf. Im Vergleich zur Maximalaufnahme kommt es sogar zu einer

Abnahme. Ein möglicher Grund dafür kann eine negative Beeinflussung der Aufnahmemechanismen durch das vorhandene Kupfer sein.

Die von Hus (2008) und Hörmann (2001) gemessenen höheren Kupfer-Werte in der Basis können hier nur bei den niedrigeren Konzentrationen festgestellt werden. Bei der höchsten Kupferkonzentration wurde hingegen ein signifikant höherer Kupferwert in den jungen Teilen, also in der Spitze, festgestellt (Abb. 61).

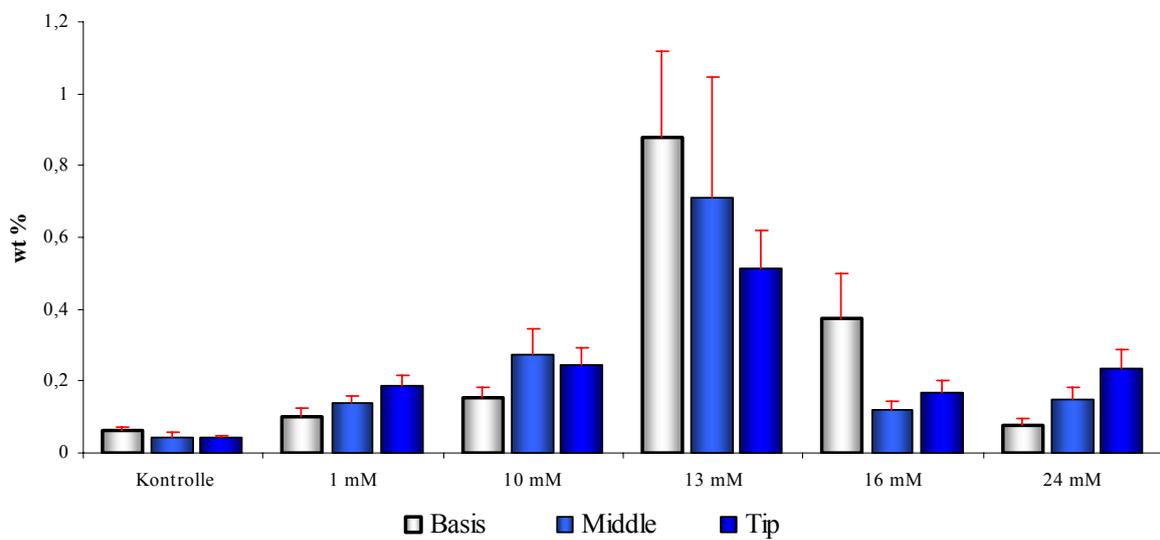


Abb. 61 *P. drummondii* Kupferaufnahme nach Regionen aufgeteilt, rote Balken = Standardabweichung

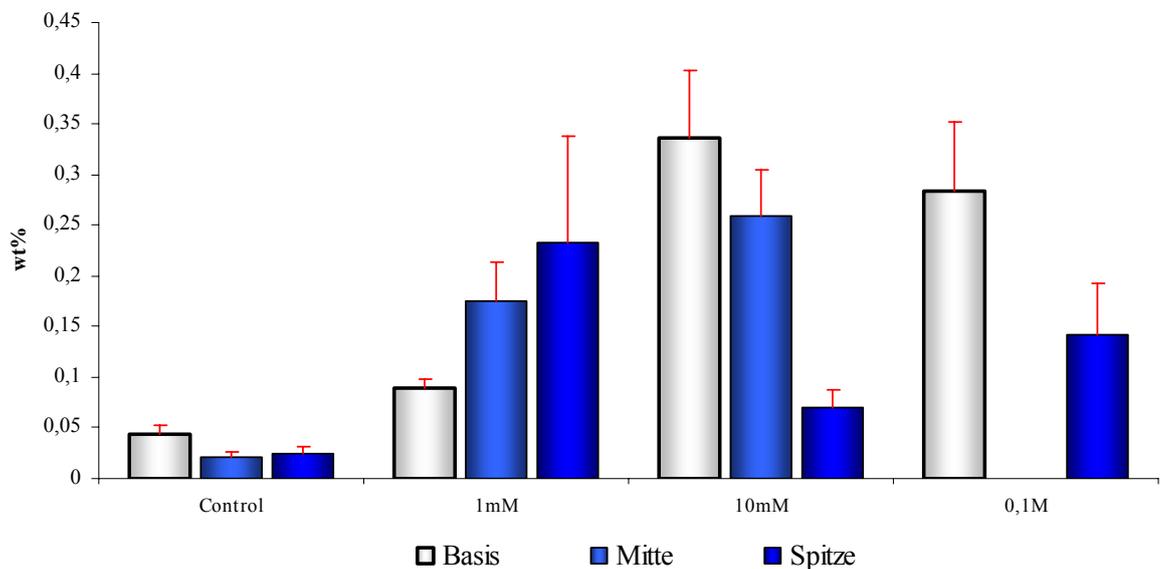


Abb. 62 *M. elongata* Kupferaufnahme nach Regionen aufgeteilt, rote Balken = Standardabweichung

Im Vergleich zu *P. drummondii* kann bei *M. elongata* keine „Spitze“ in der Aufnahme von Kupfer festgestellt werden, sondern zeichnet sich eher eine Sättigung in Form eines Plateaus ab (Abb. 62). Da allerdings die kleinen Zwischenschritte, welche bei *P. drummondii* angesetzt wurden, nicht vorhanden sind, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass ein Spitzenaufnahmewert auch bei *M. elongata* vorhanden ist.

Hinsichtlich der Verteilung des Kupfers innerhalb des Moores zeigt sich ein vergleichbares Ergebnis bei Hus und Hörmann. Es kann, wenn auch nicht immer statistisch signifikant, so zumindest ein Trend zu höheren Gehalten an Kupfer in der Basis festgestellt werden.

Da eine Eisenaufnahme bei beiden Moosen (Abb. 63-64) nicht ausgemacht werden konnte (Ausnahme *M. elongata* bei 1 mM), muss in beiden Fällen von einem Ausschluss dieses Metalls ausgegangen werden bzw. von einer stark kontrollierten Aufnahme, welche die für die Aufrechterhaltung physiologischer Vorgänge wichtige Konzentration gewährleistet (siehe Einleitung).

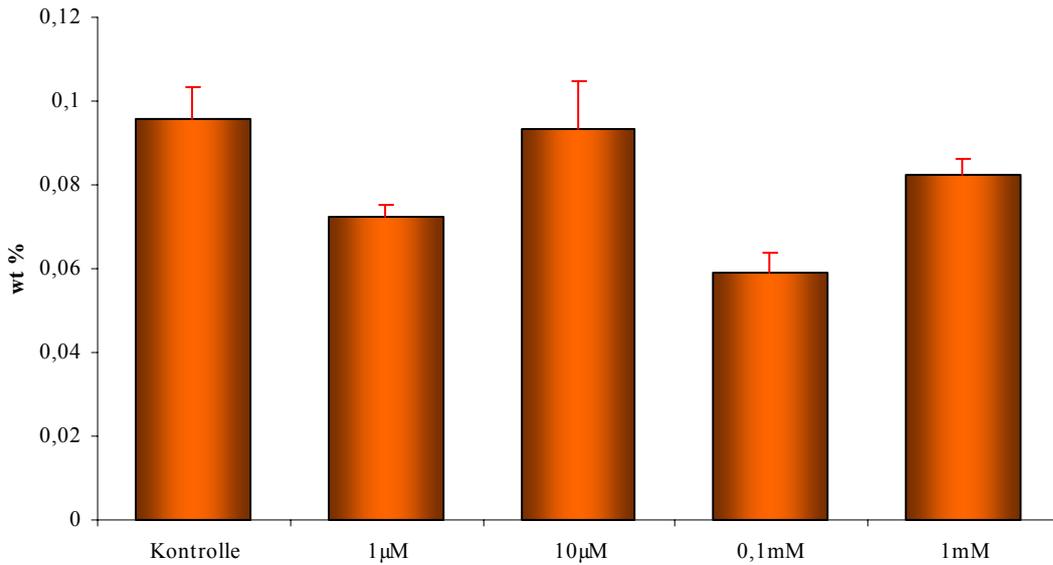


Abb. 63 *P. drummondii*, Fe Mittelwerte, rote Balken = Standardabweichung

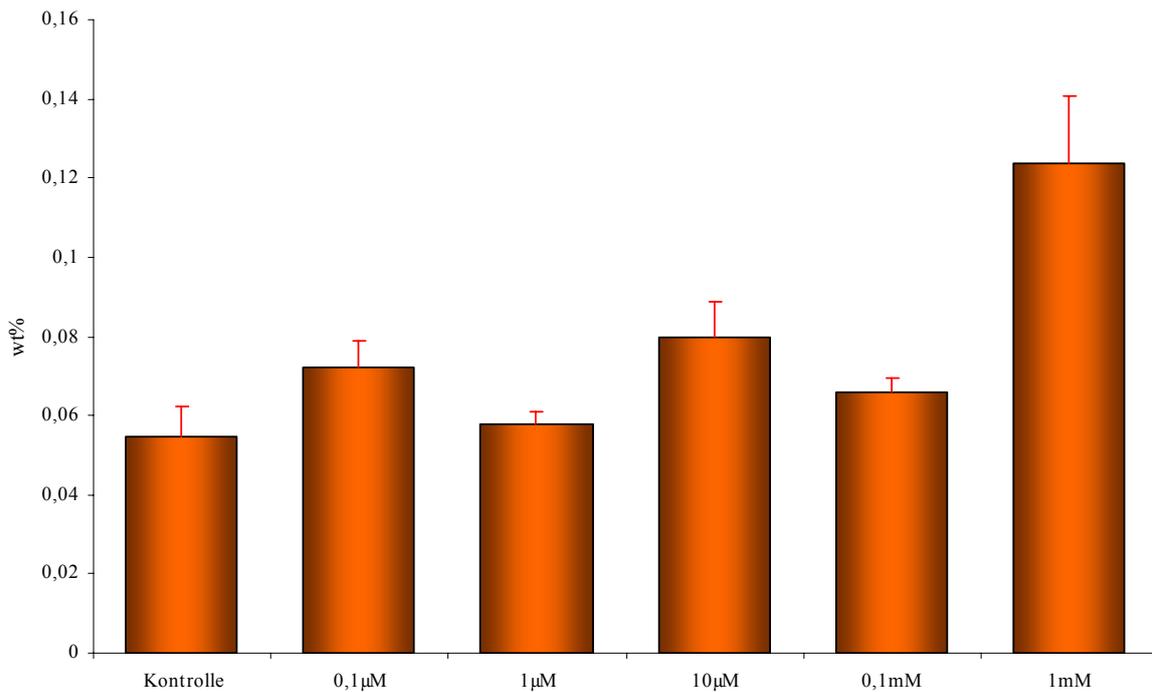


Abb. 64 *M. elongata*, Fe Mittelwerte, rote Balken = Standardabweichung

Interessant ist die erhöhte Aufnahme von Kupfer, wenn *P. drummondii* auf einem 1 mM Fe-Cu-EDTA Mischmedium gewachsen ist. Hingegen blieb der Eisengehalt in den Pflanzen konstant. Es kann also von einer einseitigen positiven Beeinflussung gesprochen werden. Ein Zusammenhang zwischen Kupfer und Eisen ist bei höheren Pflanzen bekannt. So kann bei *Triticum turgidum durum*, welcher auf

kupferkontaminiertem Boden wächst, eine signifikante Abnahme des Gehalts an Eisen in der Sprossachse festgestellt werden (Michaud, 2008).

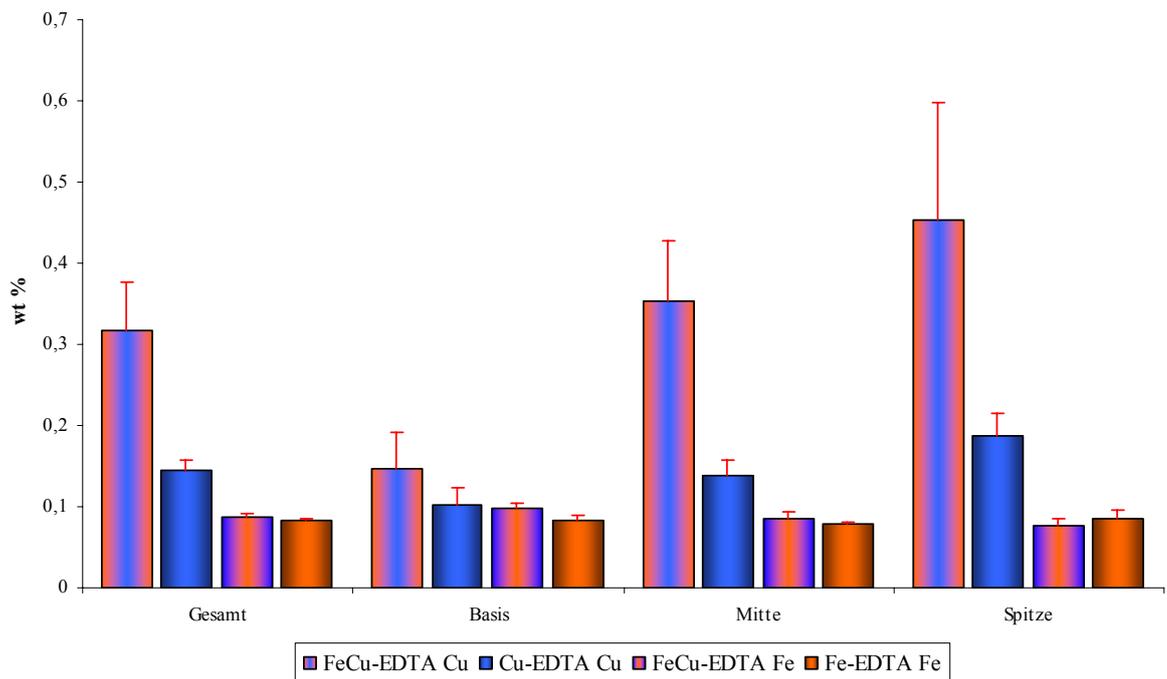


Abb. 65 *P. drummondii*, Vergleich der Aufnahme von Cu und Fe in reinem und Mischmedium, rote Balken = Standardabweichung

Aus den ersten Untersuchungen der Kultivierung auf Cellophan kann geschlossen werden, dass diese Kultivierungsart eine vielversprechende Methode darstellt, um Kontaminationen des Protonematas mit dem Agar zu vermeiden und die Aufnahme der Schwermetalle zu messen.

6.5 Zellbiologische Untersuchungen

6.5.1 Morphologie

Die hier testweise durchgeführte Präparation mittels *slush-freezing* und Gefriertrocknung lieferte sehr befriedigende Ergebnisse. Sie ist daher vorallem für die Darstellung des Habitus im REM für dokumentarische Zwecke sehr zu empfehlen. Nebenbei kann sie auch für weitere Untersuchungen verwendet werden. Da die Zellen in einer Momentaufnahme ihres Zustandes dargestellt werden können, bietet sich die Möglichkeit durch Aufbrechen der Zellen und anschließendes Messen Unterschiede von z.B. Wand und Plasma bezüglich der Schwermetallkonzentrationen durchzuführen. Und damit die in der Literatur (Tyler, 1990, Shaw, 1989) beschriebenen Mechanismen

bezüglich der Schwermetalltoleranz, mit besonderem Augenmerk auf die Eigenheiten der Bryophyten, zu vergleichen.

6.5.2 Fluoreszenz

Die durchgeführten Färbeversuche hatten im vorliegenden Fall nur Vortest Charakter. Es sollte festgestellt werden, welche Methodik für die Protonemazellen am besten geeignet ist. Hier wurden nur Standardfarbstoffe getestet, welche bei späteren Untersuchungen mit Schwermetallfarbstoffen kombiniert werden können. Leider ist kein kupferspezifischer Farbstoff erhältlich und so konnten in diese Richtung keine Versuche durchgeführt werden.

Die Färbung mit DiOC_6 funktioniert sehr gut; mit $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ können die Membransysteme des ER deutlich dargestellt werden. McCauley and Hepler (1990) führte eine Reihe von Untersuchungen bezüglich der Färbung des Endoplasmatischen Reticulums (ER) in *Funaria hygrometrica* durch. Unter $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ $\text{DiOC}_6(3)$ wurde keine Färbung erzielt. Ab $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ konnten sowohl das ER als auch andere Organellen sichtbar gemacht werden. Die beste Darstellung gelang mit einer Konzentration zwischen $2,5$ bis $5 \mu\text{g m}^{-1}$. Allerdings war es nicht möglich nur das ER spezifisch zu färben, sondern nur in Kombination mit den anderen Organellen. Die Qualität dieser Färbemethode für Membransysteme ermöglicht es aber die verschiedenen Typen und Stadien der Protonemazellen zu unterscheiden (Duckett et al., 1998).

Ebenfalls zeigt sich eine gute Anwendbarkeit des Rhodamin123, welches eine spezifische Färbung der Mitochondrien erlaubt. So konnte festgestellt werden, dass die Mitochondrien und Chloroplasten häufig eng beieinander liegen. Da die biochemischen Abläufe von Photosynthese und Atmung in einem direktem Zusammenhang stehen, ist die räumliche Beziehung von Chloroplasten und Mitochondrien eine logische Schlussfolgerung. Die Produkte von der Photosynthese, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ und O_2 , stehen am Anfang der Glykolyse. Das Produkt der Glykolyse, Pyruvat, wird in den Mitochondrien weiter verarbeitet. Über das Zwischenprodukt Acetyl-CoA, welches im Citratzyklus zur Bildung von $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 beiträgt, kommt es schließlich in der Atmungskette zur Elektronenübertragung auf den Sauerstoff. Dabei kommt es zum

Aufbau eines Elektronengradienten, welcher die ATP-Synthase (oxidative Phosphorylierung) antreibt.

Erfreulich ist die Anwendbarkeit von FM1-43. Die Färbung der Membranen funktioniert so gut, dass das Spitzenwachstum anhand der Vesikelströmungen/-bildungen zu untersuchen und auch mögliche Änderungen dieser, verursacht durch die Einwirkung von Schwermetallen, einfach zu zeigen.

6.5.3 Protonemazelllängen

Bei den Messungen der Länge von Protonemazellen von *P. drummondii* bestätigen sich die Ergebnisse der Wachstumsversuche insofern, als kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den Zellen aus dem Kupferansatz zu erkennen ist. So kann keine Beeinflussung, weder negativ noch positiv, bei den Caulonemazellen beobachtet werden. Hingegen kann bei *M. elongata* eine deutliche positive Beeinflussung des Wachstums erkannt werden. Dies trifft nicht nur auf die Caulonema-, sondern auch auf die Chloronemazellen zu. Es kann hier also ein deutlicher Unterschied zwischen diesen beiden Arten festgestellt werden, was die Reaktion auf die Zugabe von Kupfer im umgebenden Medium betrifft.

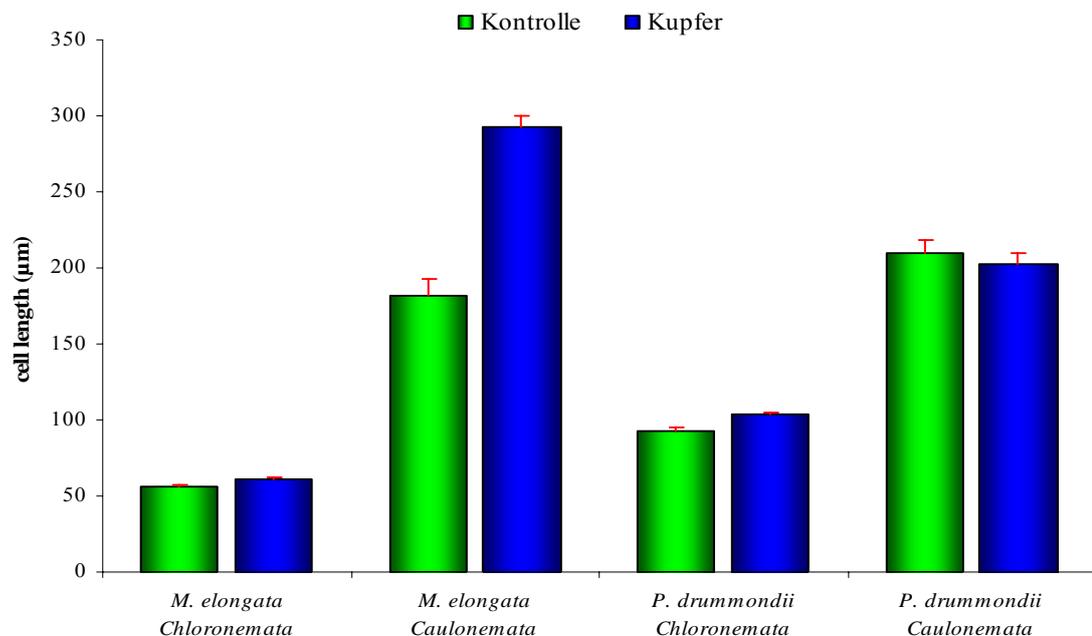


Abb. 66 Vergleich der Zelllängen des Protonemas von *P. drummondii* und *M. elongata* unter Einfluss von 10 mM Kupfer, rote Balken = Standardabweichung

Diese positive und in beiden Fällen nicht auftretende negative Beeinflussung ist doch verwunderlich, da vor allem bei Kupfer von einer solchen auszugehen war. So beschreibt z.B. Wainwright and Woolhouse (1977) für die Zellen der Streckungszone von *Agrotis tenuis* Wurzel einen durch Kupfer bewirkten K^+ Austritt und in Verbindung damit Inhibierung des Streckungswachstums. Sawidis and Reiss (1995) stellten in ihren Untersuchungen zur Wirkung von Schwermetallen auf das Wachstum von Pollenschläuchen fest, dass es zu einer Anschwellung der Spitzen kommt, wenn diese mit Cd^{2+} , Cu^{2+} und Hg^{2+} (konz. 3 μM und 100 μM) behandelt wurden. Heumann (1987) zeigte bei *Chara vulgaris* eine Veränderung der Feinstruktur der Internodialzellen bei Anwesenheit der Metalle Cd^{2+} , Hg^{2+} oder Pb^{2+} .

Als Reaktion gegen Pb stellten Krzeslowska and Wozny (2000) bei *Funaria* Protonemata einen Anstieg an nieder-veresterten Pektinen, Callose und manchmal Cellulose fest. Diese Substanzen formen eine Barriere gegen das Eindringen der Blei-Ionen in den Protoplasten. Zusätzlich treten Suberin (Sudan IV Färbung) oder Sporopollenin auf, welche normalerweise nicht im Protonema vorkommen. Weiters konnten zusätzliche Kompartimente gefunden werden, welche zur Ablagerung des aufgenommenen Bleis dienen (Krzeslowska et al., 2009).

6.5.4 Spitzenwachstum

Das Streckungswachstum einer Zelle ist ein komplexes System, welches sich aus Turgordruck und der Synthese der Wandbestandteile sowie hormonellen Faktoren zusammensetzt. Die Toxizität eines bestimmten Metalls resultiert auf den inhibierenden Effekten auf zumindest einen von diesen Faktoren, oder wirkt indirekt über Stoffwechselaktivitäten (Wainwright and Woolhouse, 1977).

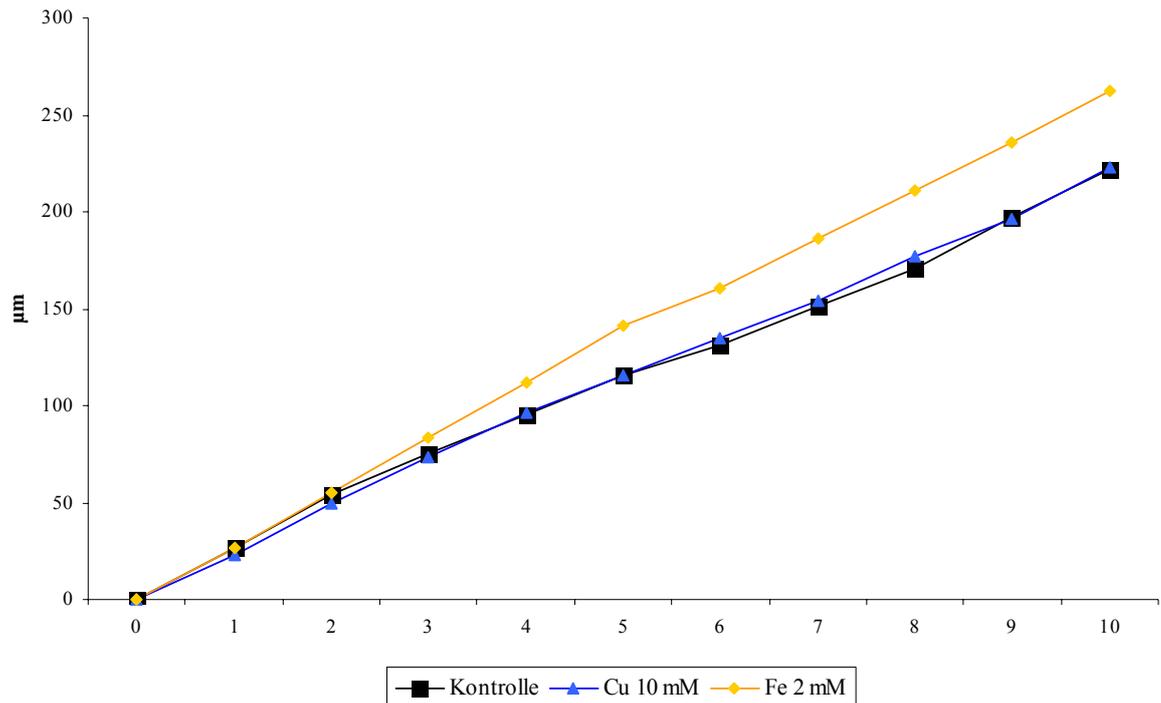


Abb. 67 Vergleich des Wachstums von *P. drummondii* in der Kontrolle, 10 mM Cu-EDTA und 2 mM Fe-EDTA, Zuwachs ist in μm pro Stunde Aufgetragen

Die ermittelte durchschnittliche Zuwachsrate der Caulonemazellen bei *P. drummondii* beträgt $22 \mu\text{m/h}$ in der Kontrolle sowie im 10 mM Cu-EDTA Medium bzw. $26 \mu\text{m/h}$ im 2 mM Fe-EDTA Medium. Die Werte in der Literatur weisen für das Spitzenwachstum von Caulonemazellen Geschwindigkeiten von 20 bis $40 \mu\text{m/h}$ (Duckett et al., 1998) auf. Letzterer Wert gilt für Caulonemazellen von *Physcomitrella*, welche im Dunkeln gewachsen sind. Werte, welche sich auf eine Beeinflussung des Spitzenwachstums durch die im Medium befindlichen Schwermetalle beziehen, konnten für Moose in der Literatur nicht gefunden werden. Beeinflussungen des Spitzenwachstums konnten allerdings bei anderen Zelltypen dokumentiert werden. So wurde bei Pollenschläuchen einerseits bei Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$ Kupfer sowie Eisen eine Stimulation des Wachstums gesehen (Read et al., 1993), andererseits zeigten sich ab $10 \mu\text{M}$ überwiegend toxische Effekte (Sawidis and Reiss, 1995).

Basile et al. (1995) dokumentierten ausführlich die Wirkung von Blei auf die Morphogenese des Protonemas von *Funaria hygrometrica*. Bei 10^{-6} M kommt es nur zu einer Wachstumsverzögerung, hingegen zeigt 10^{-5} M eine Veränderung der Zellgestalt und Organellenposition. Ab 10^{-4} M ist eine Reduktion des Protonema-Systems fest zu

stellen, sowie eine Mehrzahl an Vakuolen und eine Veränderung der Zellkernposition (DAPI-Färbung).

Die Methode nach Jensen (1981) zur Dokumentation des Protonemawachstums hat sich hier als gut geeignet erwiesen. Die dünne Agarschicht beeinträchtigt die Optik kaum und es können die Strukturen noch deutlich abgebildet werden. Zusätzlich ist es möglich das Wachstum über einen längeren Zeitraum zu verfolgen, hier über 10 Stunden, ohne das es zu Austrocknungserscheinungen kommt. Dies ist über so einen langen Zeitraum bei Verwendung von flüssigem Medium fast immer der Fall.

7 Ausblick

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit können verschiedenste Schwerpunkte für nachfolgende Forschungsarbeiten erstellt werden. Bei dem Lebermoos *Scapania undulata* ist immer noch die Erstellung eines Kultivierungsprotokolls erforderlich. Dabei ist die Assoziation mit Bakterien am Naturstandort ein möglicher Faktor, welcher dabei berücksichtigt werden sollte. Weiters ist auch eine Beeinflussung der Bakterien bei der Schwermetalltoleranz ein interessantes Thema, worauf die Aufmerksamkeit gelegt werden sollte.

Für die weitere Forschung mit den beiden Laubmoosen *P. drummondii* und *M. elongata* ergeben sich viele verschiedene Fragen. Eine dabei ist die Lokalisation der aufgenommenen Schwermetalle. Dies ist eine sehr komplexe Angelegenheit und bedarf einer Reihe verschiedener Methoden, wie z.B. EELS. Mit Hilfe dieser Methode können die Metalle in Ultradünnschnitten im TEM lokalisiert werden. Um vorher schon eine gewisse Idee davon zu haben, in welchen Zellen gesucht werden muss, kann mit Hilfe der Konfokalen-Laserscanning-Mikroskopie eine Lokalisation von Schwermetallen erfolgen. Da es aber leider nicht für alle einzelnen Schwermetalle einen spezifischen Farbstoff gibt, kann auf die, wegen der aufwendigeren Präparation, zeitintensivere Elektronen-mikroskopie nicht verzichtet werden.

Neben der Lokalisation ist auch eine genaue Bestimmung der Menge des aufgenommenen Schwermetalls von Interesse. Dazu ist es notwendig eine größere Mengen Moosmaterial mit AAS oder ICP zu messen.

Ebenso ist die weitere Untersuchung der genauen Abläufe und Veränderungen des Spitzenwachstums der Caulonemazellen bei Schwermetallstress ein Thema für weitere Arbeiten.

8 Literaturverzeichnis

- Aikawa, Y., Nagano, I., Sakamoto, S., Nishiyama, M. and Matsumoto, S.** (1999). Contents of heavy metal elements in copper mosses: *Scopelophila ligulata*, *Scopelophila cataractae*, and *Mielichhoferia japonica* and their substrates. *Soil Science And Plant Nutrition* **45**, 835-842.
- Ashton, N. W. and Cove, D. J.** (1977). The Isolation and Preliminary Characterisation of Auxotrophic and Analogue Resistant Mutants of the Moss, *Physcomitrella patens*. *Molec. gen. Genet.* **154**, 87-95.
- Baker, A. J. M.** (1981). Accumulators And Excluders - Strategies In The Response Of Plants To Heavy-Metals. *Journal Of Plant Nutrition* **3**, 643-654.
- Basile, A., Giordano, S., Spagnuolo, V., Alfano, F. and Cobianchi, R. C.** (1995). Effect Of Lead And Colchicine On Morphogenesis In Protonemata Of The Moss *Funaria-Hygrometrica*. *Annals of Botany* **76**, 597-606.
- Bauer, L. and Mohr, H.** (1959). Der Nachweis des Reversiblen Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystems bei Laubmoosen. *Planta* **54**, 68-73.
- Benecke, W.** (1903). Ueber die Keimung der Brutknospen von *Lunularia cruciata*. Mit vergleichenden Ausblick auf andere Pflanzen. *Botanische Zeitung Heft II.*, 4-46.
- Biebl, R.** (1949). Vergleichende chemische Resistenzstudien an pflanzlichen Plasmen. *Protoplasma* **39**, 1-13.
- Bopp, M. and Brandes, H.** (1964). Versuche zur Analyse der Protonemaentwicklung der Laubmoose. II. Über den Zusammenhang zwischen Protonemadifferenzierung und Kinetinwirkung bei der Bildung von Moosknospen. *Planta* **62**, 116-136.
- Borovik, A. S.** (1990). Characteristics of Metal in Biological Systems. In *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*, (ed. A. J. Shaw).
- Brassard, G. R.** (1969). *Mielichhoferia elongata*, a Copper Moss new to North America, found in Arctic Canada. *Nature* **222**, 584-585.
- Brooks, R. R.** (1971). Bryophytes as a Guide to Mineralisation. *New Zealand Journal of Botany* **9**, 674-677.
- Chopra, R. N. and Bhatla, S. C.** (1981). Effect Of Physical Factors On Gametangial Induction, Fertilization And Sporophyte Development In The Moss *Bryum argenteum* Grown *in vitro*. *New Phytologist* **89**, 439-447.
- Cobbett, C.** (2000). Phytochelation biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 211-216.
- Cove, D. J. and Knight, C. D.** (1993). The Moss *Physcomitrella patens*, a Model System with Potential for the Study of Plant Reproduction. *The Plant Cell* **5**, 1483-1488.
- Cove, D. J. and Knight, C. D.** (2008). Essential Moss Methods, pp. 16. Leeds LS2 9Jt, U.K.
- Crist, R. H., Martin, J. R., Chonko, J. and Crist, D. R.** (1996). Uptake of Metals on Peat Moss: An Ion-Exchange Process. *Environmental Science & Technology* **30**, 2456-2461.

- Demidchik, V., Sokolik, A. and Yurin, V.** (1997). The effect of Cu²⁺ on ion transport systems of the plant cell plasmalemma. *Plant Physiology* **114**, 1313-1325.
- Devi, S. R. and Prasad, M. N. V.** (2004). Membrane Lipid Alterations in Heavy Metal Exposed Plants. In *Heavy Metal Stress in Plants*, (ed. M. N. V. Prasad), pp. 127-145.
- Duckett, J. G., Schmid, A. M. and Ligrone, R.** (1998). Protonemal morphogenesis. In *Bryology for the Twenty-first Century*, (eds J. W. Bates N. W. Ashton and J. G. Duckett), pp. 223-246. Leeds: British Bryological Society.
- Dykeman, W. R. and De Sousa, A. S.** (1966). Natural mechanisms of copper tolerance in a copper swamp forest. *Canadian Journal of Botany* **44**, 871-878.
- Folkesson, L. and Anderssonbringmark, E.** (1988). Impoverishment Of Vegetation In A Coniferous Forest Polluted By Copper And Zinc. *Canadian Journal Of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **66**, 417-428.
- Foster, P. L.** (1977). Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in a green alga. *Nature* **269**, 322-323.
- Frahm, J.-P.** (2001). *Biologie der Moose*. Heidelberg: Spektrum.
- Frahm, J.-P. and Frey, W.** (2004). *Moosflora*. Stuttgart: Eugen Ulmer GmbH & Co.
- Furness, S. B. and Grime, J. P.** (1982). Growth rate and temperature responses in Bryophytes. II. A comparative study of species of contrasted ecology. *Journal of Ecology* **70**, 525-536.
- Gang, Y.-Y., Du, G.-S., Shi, D.-J., Wang, M.-Z., Li, X.-D. and Hua, Z.-L.** (2003). Establishment of *In Vitro* Regeneration System of the *Atrichum* Mosses. *Acta Botanica Sinica* **45**, 1475-1480.
- Gerlach, D.** (1984). *Botanische Mikrotechnik - Eine Einführung*: Georg Thome Verlag Stuttgart.
- Goode, J. A., Stead, A. D. and Duckett, J. G.** (1992). Towards an understanding of developmental interrelationship between chloronema, chaulonema, protonemal plates and rhizoids in mosses; a comparative study. *Crypt. Bot.* **3**, 50-59.
- Greger, M.** (2004). Metal Availability, Uptake, Transport and Accumulation in Plants. In *Heavy Metal Stress in Plants*, vol. 1 (ed. M. N. V. Prasad): Springer-Verlag.
- Grill, E., Winnacker, E.-L. and Zenk, M. H.** (1987). Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 439-443.
- Heller, R.** (1953). Recherches sur la nutrition minérale des tissus cultivés in vitro. *Ann. Sci. Nat. Biol. Vég.* **14**, 1-223.
- Heumann, H. G.** (1987). Effects of Heavy Metals on Growth and Ultrastructure of *Chara vulgaris*. *Protoplasma* **136**, 37-48.
- Himmelblau, E. and Amasino, R. M.** (2000). Delivering copper within plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 205-210.

Hohe, A., Rensing, S. A., Mildner, M., Lang, D. and Reski, R. (2002). Day length and temperature strongly influence sexual reproduction and expression of a novel MADS-box gene in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biology* **4**, 595-602.

Hörmann, D. (2001). Schwermetallanalyse bei Kupfermoosen Über die Elementverteilung in Moospflanzen. In *Cell Imaging und Ultrastrukturforschung*, vol. Mag., pp. 136. Vienna: Universität Wien.

Hus, K. (2008). Die Aufnahme und Verteilung von Schwermetallen in Kupfermoosen der Schwarzwand/Salzburg. In *Cell Imaging und Ultrastrukturforschung*, vol. Mag., pp. 142. Vienna: Universität Wien.

Iwasa, K. (1965). Chemical Control of morphogenesis in moss protonema. *Plant Cell Physiol.* **6**, 421-429.

Jahn, H. (1964a). Der Einfluß von Kinetin auf die Anlage der Stämmchen von *Funaria hygrometrica* SIBTH. *Flora* **145**, 568-588.

Jahn, H. (1964b). Die Wirkung von Blaulicht und Kinetin auf die Protonemaentwicklung und Knospenbildung von *Funaria hygrometrica*. *Flora* **155**, 10-29.

Jensen, L. C. W. (1981). Division, Growth, and Branch Formation in Protonema of the Moss *Physcomitrium turbinatum*: Studies of Sequential Cytological Changes in Living Cells. *Protoplasma* **107**, 301-317.

Jules, E. S. and Shaw, A. J. (1994). Adaptation To Metal-Contaminated Soils In Populations Of The Moss, *Ceratodon Purpureus* - Vegetative Growth And Reproductive Expression. *American Journal Of Botany* **81**, 791-797.

Katoh, K., Ishikawa, M., Miyake, K., Ohta, Y., Hirose, Y. and Iwamura, T. (1980). Nutrient utilization and requirement under photoheterotrophic growth of *Marchantia polymorpha*: Improvement of the culture medium. *Physiologia Plantarum* **49**, 241-247.

Krzeslowska, M., Lenartowska, M., Mellerowicz, E. J., Samardakiewicz, S. and Wozny, A. (2009). Pectinous cell wall thickenings formation-A response of moss protonemata cells to lead. *Environmental And Experimental Botany* **65**, 119-131.

Krzeslowska, M. and Wozny, A. (2000). Wall thickenings - moss protonema apical cell reaction to lead. *Biologia Plantarum* **43**, 93-98.

Küpper, H., Küpper, F. and Spiller, M. (1996). Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany* **47**, 259-266.

Küpper, H., Küpper, F. and Spiller, M. (1998). *In situ* detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynthesis Research* **58**, 123-133.

LeBlanc, F., Robitaille, G. and Rao, D. N. (1974). Biological response of lichens and bryophytes to environmental pollution in the Murdochville copper mine area, Quebec. *Journ. Hattori Bot. Lab.* **38**, 405-433.

Limpricht, K. G. (1895). Die Laubmoose Deutschlands, Oesterreichs und der Schweiz. In *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Oesterreich und der Schweiz*, vol. 4. Leipzig: Dr. L. Rabenhorst.

- Mallon, R., Barros, P., Luzardo, A. and Gonzalez, M. L.** (2007). Encapsulation of moss buds: an efficient method for the in vitro conservation and regeneration of the endangered moss *Splachnum ampullaceum*. *Plant Cell Tissue And Organ Culture* **88**, 41-49.
- Marschner, H.** (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants. London: Academic Press.
- McCaughey, M. M. and Hepler, P. K.** (1990). Visualization of the endoplasmic reticulum in living buds and branches of the moss *Funaria hygrometrica* by confocal laser scanning microscopy. *Development* **109**, 753-764.
- Mehra, P. N. and Pahwa, M. S.** (1976). Phenotypic variations in *Fossombronina himalayensis* KASH. in vitro - effect of sugar, auxins, growth substances and growth inhibitors. *Journ. Hattori Bot. Lab.* **40**, 371-395.
- Mole Bajer, J. and Bajer, A.** (1968). Studies of selected endosperm cells with the light and electron microscope; the technique. *Cellule* **117**, 257-265.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962). A Revised Medium For Rapid Growth And Bio Assays With Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Myśliwa-Kurdziel, B., Prasad, M. N. V. and Strzalka, K.** (2004). Photosynthesis in Heavy Metal Stressed Plants. In *Heavy Metal Stress in Plants*, vol. 1 (ed. M. N. V. Prasad): Springer-Verlag.
- Nebel, B. J. and Naylor, A. W.** (1968). Initiation and development of shoot-buds from protonemata in the *Physcomitrium turbinatum*. *American Journal Of Botany* **55**, 33-37.
- Nieboer, E. and Richardson, D. H. S.** (1980). The Replacement of the Nondescript Term "heavy Metals" by a Biologically and Chemically Significant Classification of Metal Ions. *Environmental Pollution (Series B)* **1**, 3-26.
- Onianwa, P. C.** (2001). Monitoring atmospheric metal pollution: A review of the use of mosses as indicators. *Environmental Monitoring And Assessment* **71**, 13-50.
- Pringsheim, E. G.** (1921). Physiologische Studien an Moosen. 1. Die Reinkultur von *Leptobryum piriforme* (L.) Schpr. *Jahrbuch zur wissenschaftlichen Botanik* **60**, 499-530.
- Rejment-Grochowska.** (1976). Concentration of heavy metals, lead, iron, manganese, zinc and copper, in mosses. *Journ. Hattori Bot. Lab.* **41**, 225-230.
- Reski, R.** (1999). Molecular genetics of *Physcomitrella*. *Planta* **208**, 301-309.
- Reski, R. and Abel, W. O.** (1985). Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* **165**, 354-358.
- Rincon, E.** (1993). Growth response of six bryophyte species to different light intensities. *Canadian Journal of Botany* **71**, 661-665.
- Rother, M., Krauss, G. J., Grass, G. and Wesenberg, D.** (2006). Sulphate assimilation under Cd²⁺ stress in *Physcomitrella patens* - combined transcript, enzyme and metabolite profiling. *Plant Cell And Environment* **29**, 1801-1811.
- Sabovijevic, M., Bijelovic, A. and Dragicevic, I.** (2003). In vitro Culture of Mosses: *Aloina aloides* (K.F.Schultz) Kindb., *Brachythecium velutinum* (Hedw.) B.S. & G., *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid.; *Eurhynchium praelongum* (Hedw.) B.S. & G. and *Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm. *Turk J. Bot.* **27**, 441-446.

- Saradhi, A. and Saradhi, P. P.** (1991). Proline Accumulation Under Heavy Metal Stress. *J. Plant Physiol.* **138**, 554-558.
- Satake, K., Shibata, K., Nishikawa, M. and Fuwa, K.** (1988). Copper Accumulation And Location In The Moss *Scopelophila-Cataractae*. *Journal Of Bryology* **15**, 353-376.
- Saukel, J.** (1980). Ökologische - soziologische, systematische und physiologische Untersuchungen an Pflanzen der Grube "Schwarzwand" im Grossarlal (Salzburg). In *Pflanzenphysiologisches Institut*, vol. PhD, pp. 388. Vienna: University of Vienna.
- Sawidis, T. and Reiss, H.-D.** (1995). Effects of heavy metals on pollen tube growth and ultrastructure. *Protoplasma* **185**, 113-122.
- Shaw, A. J.** (1989). Metal tolerance in bryophytes. In *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*, (ed. A. J. Shaw). Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.
- Shaw, B. P., Sahu, S. K. and Mishar, R. K.** (2004). Heavy Metal Induced Oxidative Damage in Terrestrial Plants. In *Heavy Metal Stress in Plants*, (ed. M. N. V. Prasad), pp. 84-126. Berlin Heidelberg: Springer.
- Shaw, J. and Crum, H.** (1984). Peristome homology in *Mielichhoferia* and a taxonomic account of north america species. *Journ. Hattori Bot. Lab.* **57**, 363-381.
- Sidhu, M. and Brown, D. H.** (1996). A New Laboratory Technique for Studying the Effects of Heavy Metals on Bryophyte Growth. *Annals of Botany* **78**, 711-717.
- Simola, L. K.** (1976). The effect of lead, cadmium, arsenate, and fluoride ions on the growth and fine structure of *Spagnum nemoreum* in aseptic culture. *Canadian Journal of Botany* **55**, 426-435.
- Sissolak, M.** (1984). Ökophysiologische Untersuchung von Pflanzen an kuperbelasteten und unbelasteten Standorten im Gebiet von Hüttschlag (Salzburg). In *Institut für Pflanzenphysiologie*, vol. Dissertation, pp. 146: Universität Wien.
- Smith, R. F.** (1979). The Occurrence and Need for Conservation of Metallophytes on Mine Waste in Europe. *Minerals and the Environment* **1**, 131.
- Spieß, L. D., Lippincott, B. B. and Lippincott, J. A.** (1982). Bacteria - moss interaction in the regulation of protonemal growth and development. *Journ. Hattori Bot. Lab.* **53**, 215-220.
- Spieß, L. D., Lippincott, B. B. and Lippincott, J. A.** (1984). Facilitation of moss growth and development by bacteria. *Journ. Hattori Bot. Lab.* **55**, 67-77.
- Steffens, J. C.** (1990). The heavy metal-binding peptides of plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 553-575.
- Stummerer, H.** (1970). Kupfer-Analysen an Pflanzen Cu-reicher Standorte. *Österreichische Botanische Zeitung* **118**, 189-193.
- Taylor, G. J. and Foy, C. D.** (1985). Differential Uptake And Toxicity Of Ionic And Chelated Copper In *Triticum-Aestivum*. *Canadian Journal Of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **63**, 1271-1275.
- Tyler, G.** (1990). Bryophytes And Heavy-Metals - A Literature-Review. *Botanical Journal of the Linnean Society* **104**, 231-253.

Url, W. (1956). Über Schwermetall-, zumal Kupferresistenz einiger Moose. *Protoplasma* **46**, 758-793.

Vázquez, M. D., López, J. and Carballeira, A. (1999). Uptake of Heavy Metals to the Extracellular and Intracellular Compartments in Three Species of Aquatic Bryophyte. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **44**, 12-24.

Vincent, C. D., Lawlor, A. J. and Tipping, E. (2001). Accumulation of Al, Mn, Fe, Cu, Zn, Cd and Pb by the bryophyte *Scapania undulata* in three upland waters of different pH. *Environmental Pollution* **114**, 93-100.

Wainwright, S. J. and Woolhouse, H. W. (1977). Some Physiological Aspects of Copper and Zinc Tolerance in *Agrostis tenuis* Sibth.: Cell Elongation and Membrane Damage. *Journal of Experimental Botany* **28**, 1029-1036.

Williams, L. E., Pittman, J. K. and Hall, J. L. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**, 104-126.

Lebenslauf

Stefan Wernitznig

Persönliche Informationen

Geburtstag	14.12 1983
Geburtsort	Wien, Österreich
Nationalität	Österreich
Eltern	Mag. Gerlinde Wernitznig; AHS-Lehrerin Dr. Franz Wernitznig; Biologe

Ausbildung

Seit 2008	Diplomarbeit “Die kupfertoleranten Moose <i>Pohlia drummondii</i> und <i>Mielichhoferia elongata</i> und ihre Reaktion gegen Schwermetalle“
Oktober 2003	Start des Biologiestudiums an der Universität Wien
2002-2003	Zivildienst beim Arbeiter-Samariterbund Donaustadt-Floridsdorf
2002	AHS-Matura, Realgymnasium BRG 22 - Bernoullistrasse

Publikationen

Posterpräsentation am FESPB 2008 Tampere, Finnland “Uptake and distribution of heavy metals in copper mosses from the Schwarzwand (Salzburg/Austria)” Autoren: Katharina Hus, Stefan Wernitznig, Ingeborg Lang, Marieluisse Weidinger, Othmar Horak, Irene Lichtscheidl

Posterpräsentation am MC 2009 Graz, Österreich “The heavy metal distribution in two copper tolerant bryophytes *Pohlia drummondii* and *Mielichhoferia elongata*” Autoren: Stefan Wernitznig, Ingeborg Lang, Marieluisse Weidinger, Stefan Sassmann and Irene Lichtscheidl

Beschäftigungen

Seit August 2009	Hochschuljubiläumsstiftung der Stadt Wien, project H-1939/2008, to Ingeborg Lang
Seit WS 2008	Tutor im Department Cell Imaging und Ultrastrukturforschung (UE Zellphysiologie 2008; PP Schwermetalle 2009; UE Konfokalmikroskopie 2009)