



MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

Kupferstress in Moosen: Aufnahme und Auswirkungen auf Morphologie, Chlorophyllverhältnis und Sauerstoffradikale

verfasst von

Sebastian Antreich BSc

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 833

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Ökologie

Betreut von:

ao. Univ.-Prof. Dr. Irene Lichtscheidl-Schultz

Danksagung

Meine Arbeit widme ich meiner geliebten Familie. Ohne sie wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin. Sie haben mir immer die Zeit gelassen, die ich brauchte und egal wie lang es dauerte, sie haben mich immer bestärkt das zu machen, was ich möchte. Dafür möchte ich ihnen herzlich danken.

Ein großer Dank geht an meine beiden Betreuer Mag. Dr. Ingeborg Lang und Stefan Sassmann, MSc, die sehr viel Geduld mir gegenüber hatten. Auch für ihre hingebungsvolle Mühe beim Erklären der Methoden und bei der Verbesserung der Arbeit möchte ich mich bedanken. Oft zeigten sie mir die richtigen Alternativen, wenn meine überlegten Ansätze falsch waren.

Ebenfalls bedanke ich mich herzlich bei Dr. Irene Lichtscheidl-Schultz für ihre Geduld und grenzenlose Unterstützung, sei es für die Arbeit und drüber hinaus.

Bedanken möchte ich mich auch bei den übrigen Kollegen der Core Facility CIUS für ihre Unterstützung und Freundlichkeit mir gegenüber.

Auch meinen Freunden danke ich für die Diskussionen und Motivationen während meines Studiums. Ohne sie wäre diese Zeit um einiges langweiliger gewesen.

Die Arbeit wurde unterstützt durch das Projekt BIOREM von appear/ÖAD an I. Lichtscheidl und ein Förderstipendium nach dem StudFG (WS12/13).

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	7
Abstract	9
1. Einleitung.....	11
1.1 Pflanzen und Schwermetall-Stress	11
1.1.1 Moose.....	12
1.2 Stresskonzept in Pflanzen	14
1.3 Schwermetalle.....	15
1.3.1 Kupfer	16
1.4 Ziel der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Versuchspflanzen	20
2.2 Kultivierung	21
2.3 Fotodokumentation	22
2.4 Größenvermessung Makrofotographie.....	23
2.5 Zellvermessung Lichtmikroskopie	23
2.6 Chl <i>a/b</i> -Verhältnis	24
2.7 Färbung von Sauerstoffradikalen	25
2.8 Elementanalyse	25
2.9 Statistik.....	26
3 Ergebnisse - Morphologie	27
3.1 Wachstumsunterschiede zwischen Cl ₂ /SO ₄ und EDTA Verbindungen.....	27
3.1.1 <i>Aphanorhegma patens</i>	28
3.1.2 <i>Mielichhoferia elongata</i>	29
3.1.3 <i>Pohlia drummondii</i>	30
3.2 Kupfer fördert die Wuchshöhe in angepassten Moosarten	31
3.2.1 <i>Aphanorhegma patens</i>	32
3.2.2 <i>Mielichhoferia elongata</i>	33
3.2.3 <i>Pohlia drummondii</i>	34
3.3 Stark vergrößerte Zellen nach Regeneration in allen CuEDTA-Behandlungen	35
3.3.1 <i>Aphanorhegma patens</i>	37
3.3.2 <i>Mielichhoferia elongata</i>	39
3.3.3 <i>Pohlia drummondii</i>	41
4 Ergebnisse - Physiologie	43

4.1	Zunahme von Chl <i>a</i> nach Regeneration in CuEDTA.....	43
4.1.1	<i>Aphanorhegma patens</i>	44
4.1.2	<i>Mielichhoferia elongata</i>	45
4.1.3	<i>Pohlia drummondii</i>	46
4.2	Erhöhte Superoxid-Bildung im nicht angepassten Moos <i>A. patens</i>	47
4.2.1	<i>Aphanorhegma patens</i>	48
4.2.2	<i>Mielichhoferia elongata</i>	49
4.2.3	<i>Pohlia drummondii</i>	50
4.3	Starke Bildung von H ₂ O ₂ in der CuSO ₄ Behandlung von <i>A. patens</i>	51
4.3.1	<i>Aphanorhegma patens</i>	52
4.3.2	<i>Mielichhoferia elongata</i>	53
4.3.3	<i>Pohlia drummondii</i>	54
5	Ergebnisse - Aufnahmefähigkeit.....	55
5.1	Hohe Kupferanreicherung im Spitzenbereich von <i>A. patens</i>	55
5.1.1	<i>Aphanorhegma patens</i>	57
5.1.2	<i>Mielichhoferia elongata</i>	58
5.1.3	<i>Pohlia drummondii</i>	59
5.2	Schnelle Abnahme des Kupfergehalts entlang des Stämmchens von <i>M. elongata</i>	60
5.2.1	<i>Aphanorhegma patens</i>	60
5.2.2	<i>Mielichhoferia elongata</i>	63
5.2.3	<i>Pohlia drummondii</i>	66
6	Diskussion	70
6.1	Zusammenfassende Betrachtung	83
6.2	Weiterführende Forschungsthemen	85
7	Literatur	87
7.1	Abkürzungen.....	94
8	Publikationen.....	95
8.1	Austrian Society of Plant Biology, Lunz am See.....	95
8.2	Focus on Microscopy, Sydney.....	97
8.3	International Microscopy Congress, Prag.....	99
8.4	4 th Biorem Meeting, Krakau.....	102
9	<i>Curriculum vitae</i>	104

Zusammenfassung

Kupfer, obwohl ein essentieller Mikronährstoff, ist in großen Mengen toxisch für Pflanzen. Ausschlussmechanismen, wie sie von höheren Pflanzen bekannt sind, können bei Moosen aufgrund der unterschiedlichen Anatomie nicht zur Wirkung kommen. Dennoch gibt es auch bei den Moosen Gattungen, die sich gegen den Kupferstress angepasst haben und auf kupferhaltigem Substrat - z.B. ehemalige Bergbauhalden - wachsen.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung des Kupfers auf Morphologie, Chlorophyll *a/b*-Verhältnis und oxidativen Stresslevel in der kupfersensitiven Art *Aphanoreghma patens* und in den zwei kupfertoleranten Arten *Mielichhoferia elongata* und *Pohlia drummondii* untersucht. Die Moose wuchsen auf Medien, angereichert mit 0,1 mM CuCl₂, 0,1 mM CuSO₄, 0,1 mM oder 10 mM CuEDTA. Wuchshöhe, Kupferaufnahme und oxidativer Stress wurden nach sechs Wochen Kupferbehandlung untersucht. Zellgröße und Chlorophyll wurden zusätzlich in der ersten Woche Kupferbehandlung und nach sechs Wochen Regeneration auf kupferfreiem Medium gemessen.

A. patens zeigte bei der Zugabe von CuCl₂ und CuSO₄ ein reduziertes Wachstum und eine stärkere Färbung durch Sauerstoffradikale; auch war viel mehr Kupfer entlang des Stämmchens angereichert. Bei den beiden angepassten Moosen *M. elongata* und *P. drummondii* zeigte das Kupfer einen fördernden Effekt in der Wuchshöhe. Außerdem waren die Kupferanreicherungen nur in der Basis des Stämmchens vorzufinden, wobei bei *M. elongata* die Kupfermenge entlang des Stämmchens viel schneller abnahm als bei *P. drummondii*.

In den Versuchsansätzen mit CuEDTA hatte *A. patens* größere Pflanzen als auf kupferfreiem Medium. Außerdem war trotz der - in allen Moosarten gefundenen - hohen Anreicherung weniger oxidativer Stress vorhanden. *M. elongata* zeigte viel mehr Stress und auch verhältnismäßig mehr Chlorophyll *b* als in der Kontrolle. Allen Arten gemein war aber eine starke Vergrößerung der Zellen und eine Verschiebung zum Chlorophyll *a* in der Regeneration der CuEDTA-Ansätze.

Es konnte gezeigt werden, dass die kupfertoleranten Arten *M. elongata* und *P. drummondii* gegenüber der kupfersensitiven Art *A. patens* besser an CuCl₂ und CuSO₄ angepasst sind. Bei den CuEDTA-Verbindungen reagiert *M. elongata* deutlich schlechter auf diese Kupferverbindung als *A. patens*.

Abstract

Copper, although an essential micronutrient, is generally toxic in large quantities. In mosses, the exclusion mechanisms known from higher plants can not be applied analogously due to the different morphology. Nevertheless, there are some genres that are apparently equipped to tolerate this heavy metal stress and naturally occur on copper-containing substrate - eg. Former mining heaps.

In this work, the effects of copper on morphology, Chlorophyll *a/b* ratio and oxidative stress levels were examined in the copper-sensitive species *Aphanoreghma patens* and the two copper-tolerant species *Mielichhoferia elongata* and *Pohlia drummondii*. The mosses were growing on medium supplemented with 0.1 mM CuCl₂, 0.1 mM CuSO₄, 0.1 mM or 10 mM CuEDTA. Growth height, copper uptake and oxidative stress were examined after six weeks treatment with copper. Cell size and Chlorophyll *a/b* ratio were additionally measured in the first week of copper treatment and after six weeks of regeneration on copper-free medium.

A. patens showed reduced growth as well as increased staining by oxygen radicals in the CuCl₂ and CuSO₄ treatments; there was also highly enriched copper found along the stems. In the two adapted mosses *M. elongata* and *P. drummondii* the copper showed, however, a beneficial effect for plant height. In addition, the copper enrichments were found only in the base of the stems. In *M. elongata* a much faster decrease in the amount of copper along the stems was measured than in *P. drummondii*.

In treatments with CuEDTA, *A. patens* had larger plants than in the copper-free medium. Despite the high enrichment of copper, which was found in all moss-species, there was less oxidative stress observeable. *M. elongata* also showed large plants, but it had much more stress and also relatively more chlorophyll *b* than in the control. Common in all species was a strong increase in cellsize and a strong shift to more chlorophyll *a* in the regeneration after CuEDTA treatments.

It could be shown that the copper-tolerant species *M. elongata* and *P. drummondii* were better adapted to the CuCl₂ and CuSO₄ than the copper-sensitive species *A. patens*. In CuEDTA treatments, *M. elongata* responded more negatively to CuEDTA than *A. patens*.

1. Einleitung

1.1 Pflanzen und Schwermetall-Stress

Pflanzen sind in ihrer Umwelt unzähligen verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt. Diese können natürliche abiotische Faktoren wie Wasserversorgung und Sonneneinstrahlung sein oder biotische wie Herbivorie oder Pilz- und Bakterienpathogene (Lichtenthaler, 1996). Seit einigen Jahrzehnten erhöhen sich aber zunehmend die anthropogenen Stressfaktoren. Zu diesen zählen der anthropogen mitbeeinflusste allgemeine Anstieg der Temperatur und der Ausstoß von Schadstoffen durch die Verbrennung fossiler Brennstoffe. Auch der immer weiter steigende Bedarf an Rohstoffen für die Industrie führt zu großen landschaftlichen Veränderungen aufgrund der Kontaminierung von großen Gebieten mit Schwermetallen durch die Erzgewinnung und -verarbeitung. So erstreckt sich z.B. die weltweit größte Kupfermine (Chuquibambilla, Chile) über eine Fläche von 13 km². Aber auch in Österreich gibt es Orte, wo durch die ehemalige Gewinnung und Verarbeitung von Erzen Flächen kontaminiert wurden; wie zum Beispiel in Hüttschlag (Salzburg) oder Hirschwang (Niederösterreich). In der folgenden Arbeit soll daher der Einfluss von Kupfer auf Morphologie, Physiologie und Aufnahmefähigkeit in Moosen untersucht werden.

Denn trotz der hohen Belastung mit Schwermetallen kann auch an solchen Plätzen Vegetation gedeihen, obwohl diese Mengen oft toxisch sind. Diese Habitats werden von Pflanzen besiedelt, die sich speziell an die vorherrschenden Bedingungen angepasst haben. Manche Pflanzen wie *Noccaea caerulea* (J. & C. Presl) oder *Arabidopsis halleri* (L.) bevorzugen solche Habitats sogar (Krämer, 2010). Der Vorteil hierbei liegt darin, dass solche Standorte nur dünn besiedelt sind und dadurch nur geringe Konkurrenz herrscht.

Die Pflanzen, die an solchen metallreichen Standorten vorkommen, besitzen spezielle Anpassungen. Entweder wird die Aufnahme der giftigen Schwermetalle verhindert oder die aufgenommenen Schwermetalle werden unschädlich machen, damit sie gespeichert oder über spezielle Pflanzenorgane ausgeschieden werden können. Abhängig von der Differenz zwischen der Konzentration des Schwermetalls im umgebendem Boden und der Konzentration in der Pflanze kann man diese Pflanzen in drei Gruppen einteilen: Exkluder, Akkumulatoren und Hyperakkumulatoren (Baker, 1981).

Bei den Exkludern werden die Schwermetalle durch Barrieren am Eindringen in die Pflanze gehindert. Dies passiert vor allem in der Wurzel, da sich zum einen die Schwermetalle durch chemische Prozesse an den Zellwänden des äußeren Wurzelbereichs anlagern und zum anderen die Aufnahme durch den Casparischen Streifen kontrolliert wird. Somit gelangt oft nur ein Bruchteil des Schwermetalls im Boden in die oberirdischen Bereiche der Pflanze. Dieser Bruchteil wird von speziellen Enzymkomplexen, sogenannten Phytochelatoren und Methallothioneinen, gebunden. Diese Enzymkomplexe besitzen einen großen Anteil an schwefelreichen Aminosäuren (v.a. Cystein), die die Schwermetalle im Komplex einschließen und diese dadurch in der Pflanze immobilisieren (Rauser, 1999).

Bei den Akkumulatoren wirkt die Wurzel nicht als Barriere und die Schwermetalle können meist ungehindert in die oberirdischen Pflanzenteile eindringen. Hier spielen die Phytochelatoren eine weit größere Rolle als bei den Exkludern. Die komplexierten Schwermetalle werden dann z.B. in die Vakuole transferiert und dort gespeichert (De, 2000).

Die extremste Anpassung bilden die Hyperakkumulatoren, die im Gegensatz zu den normalen Akkumulatoren die Schwermetalle aktiv in den oberirdischen Teilen der Pflanze anreichern. Bei manchen Pflanzen kann die Konzentration in der Pflanze das 100-fache der umgebenden Bodenkonzentration erreichen. Als Beispiel sei hier *N. caerulea* erwähnt, welche unter Laborbedingungen Zinkkonzentrationen von über 25000 mg kg⁻¹ erreichte ohne Wachstumseinbußen zu zeigen (Brown *et al.*, 1995). Im Gegenteil, diese Hyperakkumulatoren zeigen sogar Wachstumseinbußen, wenn ihnen kein Schwermetall im Substrat zu Verfügung steht (Gerstmann, 2010).

1.1.1 Moose

In dieser Arbeit wird mit Moosen gearbeitet, die sich in vielen Eigenschaften stark von den höheren Pflanzen unterscheiden. Allgemein zeigen Moose ein weit größeres ökologisches Potential als höhere Pflanzen und sind daher auch häufiger auf Extremstandorten zu finden. Der große Vorteil solcher Extremstandorte liegt vor allem darin, dass hier ein viel geringerer Konkurrenzdruck herrscht. Begünstigt wird dies zusätzlich durch die kleine Wuchsform, die es Moosen erlaubt geeignete Mikrohabitate an solchen Standorten zu nutzen. So zum Beispiel werden kleine Ritzen besiedelt in denen sich das Wasser länger hält oder die Sonneneinstrahlung geringer ist. Außerdem besitzen Moose gegenüber höheren Pflanzen

eine Reihe von Anpassungen, wie z.B. eine hohe Austrocknungstoleranz, die das Überleben in extremeren Umweltbedingungen ermöglichen (Glime, 2007).

Besonders markant ist, dass Moose keine echten Wurzeln haben. Sie besitzen zwar wurzelähnliche Strukturen (Rhizoide), doch dienen diese hauptsächlich als Haftorgane oder Wassertransporter via Adhäsion. Das erlaubt den Moosen auf substratfreien Flächen wie Mauern, Steinen oder sogar Rinden zu wachsen.

Des Weiteren fehlt den meisten Moosen eine wasserundurchlässige Kutikula, wodurch Moose ihren Wasserhaushalt nur schwer regulieren können; somit sind sie stark von der Umgebungsfeuchtigkeit abhängig (poikilohyd). Doch haben sie hierfür entsprechende physiologische Mechanismen entwickelt, wodurch sie ein fast vollständiges Austrocknen und Wiederbefeuchten unbeschadet überstehen (Proctor, 2008).

Durch das Fehlen der Kutikula könne aber Nährstoffe, die als feuchte oder nasse Deposition auf die Pflanze gelangen, über die ganze Oberfläche aufgenommen werden. Deswegen gibt es auch viele Moose, die epiphytisch auf anderen Pflanzen oder auf blanken Steinen leben können, da sie alle Nährstoffe aus der Luft beziehen. Die Aufnahme von Nährstoffen erfolgt über Kationenaustauschstellen entlang der Moosoberfläche. Diese Ionentauscher binden die mit dem Wasser oder der Luft herantransportierten Kationen (Rühling & Tyler, 1970; Breuer & Melzer 1990). Der Prozess erfolgt passiv und ist vorallem von der Kationenaustauschkapazität (*cation exchange capacity*, CEC) abhängig, welche bei verschiedenen Moosarten verschieden stark ausgeprägt ist (Büscher *et al.*, 1990). Die aktive Aufnahme in die Zelle erfolgt anschließend wie bei höheren Pflanzen unter anderem mit Hilfe einer Protonenpumpe. Dabei werden Protonen in die Zellumgebung abgegeben, wodurch das Zellinnere negativer ist als die Zellumgebung. Die gebundenen Kationen werden anschließend durch den entstandenen Protonengradienten über Ionenkanäle und Transportproteine in die Zelle aufgenommen (Klein *et al.*, 2003; Raven *et al.*, 1998).

Im Vergleich zu den höheren Pflanzen wachsen Moose näher am Substrat und haben somit eine große Kontaktfläche zwischen diesem und den energieproduzierenden Teilen der Pflanze. Durch Wind aufgewirbeltes oder durch Regen weggespültes Substrat kann auf die Moosblätter gelangen und dann in das Moos aufgenommen werden. Daher können Moose vom umgebenden Substrat stark beeinflusst werden. Nur wenige Spezialisten kommen auf beziehungsweise ausschließlich auf toxischen Schwermetallböden vor (Shaw, 1987). Zu

diesen zählen unter anderem neben den in dieser Arbeit verwendeten Moosen *Mielichhoferia elongata* (Hornsch.) und *Pohlia drummondii* (Müll. & Hal.) auch Arten wie *Scopelophila cataractae* (Mitt.) oder *Crumia latifolia* (Kindb.).

1.2 Stresskonzept in Pflanzen

Pflanzen sind nicht mobil (können einem Stressor nicht ausweichen) und sind daher vielen verschiedenen natürlichen und anthropogenen Stressoren in der Umwelt ausgesetzt. Deswegen haben sich entsprechende Anpassungen im Laufe der Evolution entwickelt, welche von neuen Stoffwechselwegen bis hin zur Bildung neuer morphologischer Strukturen reichen. Dabei spielt sowohl die Stärke als auch die Dauer des Stresses eine große Rolle. Denn eine kurze starke Stressbelastung kann die gleichen Auswirkungen auf die Pflanze haben wie eine langandauernde leichte Stressbelastung (Lichtenthaler, 1996). Solange nun die pflanzeigenen Gegenmaßnahmen ausreichen, um die Belastung zu tolerieren, geht es der Pflanze gut. Sobald dies nicht mehr der Fall ist, beginnt die Pflanze Schäden zu erleiden, was bis zum Absterben führen kann.

Lichtenthaler (1996) fasst die Reaktionen der Pflanzen auf einen Stressor anschaulich zusammen und unterteilt diesen Verlauf in die folgenden vier Phasen:

In der ersten Phase (*response phase*) reagiert die Pflanze auf einen plötzlich einwirkenden Stressor mit der Reduktion der primären Stoffwechselaktivität und mit der Etablierung von Gegenmaßnahmen, wie z.B. der vermehrten Bildung von Reparaturenzymen.

Sind diese Maßnahmen erfolgreich, beginnt die zweite Phase, in der die Pflanze sich trotz anhaltendem Stress wieder erholen und zum ursprünglichen physiologischen Zustand zurückkehren kann (*restitution phase*). Unter Umständen kann die Pflanze sogar von den neuen Bedingungen profitieren, wenn sich ein besserer physiologischer Zustand einstellt als zuvor.

Wenn der Stressor länger anhält und die pflanzeigenen Anpassungen diesem Stress auf Dauer nicht gewachsen sind, beginnt die Erschöpfungsphase (*exhaustion phase*), in der die Pflanze nun kontinuierlich Schaden nimmt, was auf lange Sicht den Tod der Pflanze verursacht.

Wird der Stressor aber rechtzeitig entfernt, kann sich die Pflanze wieder erholen und einen neuen physiologischen Zustand etablieren (*regeneration phase*).

Chronische Schäden beginnen meist auf zellulärer Ebene und sind daher vorerst nicht augenscheinlich zu erkennen. Chlorosen oder reduziertes Wachstum sind hingegen Symptome, die am Ende der Erschöpfungsphase auftreten, bevor die Pflanze stirbt. Um primäre Reaktionen in der Pflanze durch Schwermetallstress zu erkennen, eignet sich der Photosyntheseapparat. Hierbei werden Pigment- oder Fluoreszenzmessungen als Stressindikation verwendet. Bei erhöhtem Stress nimmt das Chlorophyll *a/b* (Chl *a/b*) Verhältnis (Knudson *et al.*, 1977; Viljevac *et al.*, 2013) oder die Fluoreszenzintensität ab (Lichtenthaler, 1988; MacFarlane, 2003;). Gründe dafür sind unter anderen Änderungen in der Ultrastruktur der Chloroplasten, Inaktivierung des Photosystem II (PSII) oder Hemmung des Elektronentransports zwischen den Photosystemen (Übersicht in Mishra & Dubey, 2005). Bei Moosen zeigt sich, dass das Chl *a/b*-Verhältnis bei erhöhtem Schwermetallstress abnimmt (Lopez & Carballeira, 1989; Gecheva & Yurukova, 2008; Shakya *et al.*, 2008).

1.3 Schwermetalle

Zu den Schwermetallen zählt eine größere Gruppe von Metallen und Halbmetallen im Periodensystem. Es gibt jedoch keine einheitliche Definition der Schwermetalle, sodass viele unterschiedliche Verwendungen des Begriffes in der Literatur zu finden sind (Duffus, 2002). Meist gemein haben die Definitionen, dass die Elemente relativ dicht, von hohem Atomgewicht ($>5\text{g/cm}^3$) und in großen Mengen toxisch sind. Nach Nieboer und Richardson (1980) können die Schwermetalle durch ihre verschiedenen Bindungseigenschaften in die drei folgenden Kategorien eingeteilt werden: Klasse A-, Übergangs- und Klasse B-Metalle.

Zu den am häufigsten untersuchten, pflanzenverfügbaren Schwermetallen zählen die Elemente Zink, Eisen, Kupfer, Molybdän, Blei, Quecksilber und Cadmium. Einige davon, wie Zink, Eisen, Kupfer oder Molybdän, sind in kleinen Mengen essentiell für den Stoffwechsel, weil sie eine wichtige Rolle in Enzymen, Stoffwechselprodukten und Kofaktoren spielen oder für die Übertragung von Elektronen benötigt werden. Vor allem in den Chloroplasten sind verschiedene Metalle (u.a. Kupfer, Eisen, Mangan) an der Photosynthese beteiligt, und

daher führen Mangelsituationen hier besonders schnell zu strukturellen und energetischen Veränderungen (Droppa *et al.*, 1984; Terry, 1980; Shenker *et al.* 2004).

Generell gilt, in hohen Mengen sind all diese Schwermetalle toxisch für alle Organismen, wobei es je nach Metall und Pflanze eigene Grenzwerte gibt (Übersicht in Prasad & Strzałka, 2002). Mit erhöhter Konzentration im Boden steigt auch die toxische Wirkung für die Pflanze und führt, ähnlich wie bei Mangelercheinungen, zu Wachstumseinbußen und schließlich zum Tod der Pflanze. Hohe Metallkonzentrationen können die Funktionen von Enzymen stoppen indem sie das ursprüngliche Metall im katalytische Bereiche des Enzyms ersetzen. Des Weiteren entsteht oxidativer Stress durch das vermehrte Auftreten von reaktiven Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*; ROS), die besonders die Zellmembranen beschädigen, was zum Verlust von Membranpotenzialen und zum Zusammenbruch des Metabolismus führt (Sharma & Dietz, 2008).

ROS entstehen dadurch, dass Elektronen mit freiem Sauerstoff reagieren und Superoxid-Anionen (O_2^-) bilden (Scandalios, 1993). Diese sind sehr reaktiv und führen unter anderem zur Zerstörung von Membranproteinen. Zum Schutz gegen diese Radikale haben Pflanzen spezielle Enzyme, sog. Antioxidantien, entwickelt. Die Superoxid-Dismutase (SOD) wandelt z.B. zwei Superoxide in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) um. Das zwar ebenfalls reaktive Peroxid wird in der Zelle auch als Signalübermittler verwendet und z.B. bei pathogenem Stress in großer Menge produziert, was wiederum zur Aktivierung von Verteidigungsmechanismen bishin zum kontrollierten Zelltod führen kann (Apel & Hirt, 2004). Das H_2O_2 wird dann von speziellen Katalasen und Peroxidasen zu Wasser reduziert.

Besonders in den Photosyntheseprozessen, wo generell immer ROS entstehen, können erhöhte Metallkonzentrationen zu höherem oxidativen Stress und in Folge zu Energieverlust für die Pflanze führen. Deshalb eignen sich neben den Chlorophyllmessungen auch die Messungen von ROS zur Analyse von Schwermetallstress in Moosen, da Veränderungen auch hier sehr rasch auf zellulärer Ebene sichtbar werden.

1.3.1 Kupfer

In dieser Arbeit wird von den eingangs erwähnten Schwermetallen der Fokus auf Kupfer gelegt. Es kommt in normalen Böden in geringen Mengen ($15-25 \mu g g^{-1}$; De Temmerman, 1984) meist als Chalkopyrit (Kupferkies, $CuFeS_2$) und Chalkosin (Kupferglanz, Cu_2S) vor. Da

Kupfer ein vielseitig einsetzbares Element ist, sowohl in der Elektroindustrie als auch in Legierungen, wurde es vor allem durch Erzgewinnung und -verarbeitung in großen Mengen in die Umwelt eingetragen. Außerdem wurde es lange Zeit häufig als Fungizid im Wein- und Hopfenanbau verwendet, wodurch größere Mengen in den Boden gelangten.

Morphologisch zeigt sich sowohl Kupferüberschuss als auch -mangel bei Pflanzen primär durch reduziertes Wurzelwachstum (Zhang *et al.*, 2008) und Chlorosen der Blätter (Panou-Filotheou *et al.*, 2001).

Für den Metabolismus der Pflanzen ist Kupfer ein essentieller Mikronährstoff, da es in vielen Enzymen, die an Redoxreaktionen beteiligt sind, vorkommt und als Kofaktor verwendet wird. Vor allem in den Chloroplasten kommen über 50% des Kupfers im Enzym Plastocyanin (PC) vor, welches für den Transport von Elektronen während der Photosynthese benötigt wird (Kieselbach *et al.*, 1998). Somit ist bei Kupfermangel die Aktivität des Photosystems besonders stark betroffen. Baszyński (1988) zeigt bei *Spinacia oleracea* (L.), dass die Photosyntheseleistung bei Kupfermangel im PSII um 30% und im Photosystem I (PSI) um über 75% abnimmt. Des Weiteren kommt Kupfer unter anderem in den wichtigen Enzymen Cu/Zn-Superoxid-Dismutase und Cytochrom c Oxidase (Protonenpumpe in den Mitochondrien) vor.

In hohen Konzentrationen ist Kupfer stark toxisch für Pflanzen. Besonders in den Chloroplasten zeigt das Kupfer die größten Schäden und reduziert bei Überschuss die Photosyntheseleistung stark. Hierbei reagiert das PSII am sensibelsten auf Kupferüberschuss. Das Kupfer bindet dabei an unterschiedliche Enzyme, die an der Photosynthese beteiligt sind, und blockiert dadurch den Elektronentransport sowohl auf der Akzeptor- als auch auf der Donorseite des PSII (Barón *et al.*, 1995; Yurela, 2005). Neben der Reduzierung der Energiegewinnung durch das nicht funktionierende Photosystem führt dies außerdem zur Bildung von ROS, die wiederum die Integrität der Chloroplastenmembranen zerstören. Des Weiteren reduziert eine hohe Kupferkonzentration deutlich die Aktivität der Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (Lidon & Henriques, 1991).

1.4 Ziel der Arbeit

Kupfer-Ionen sind für die Pflanze meist nicht frei verfügbar, sondern kommen im Substrat mit unterschiedlichen anionischen Verbindungen vor. Es kommt dadurch zu Unterschieden in der Kupferverfügbarkeit, welche somit die Toxizität beeinflusst, was schon in anderen Arbeiten gezeigt wurde (Kaho, 1934; Sassmann, 2015). Deshalb untersuchten wir in dieser Arbeit den Einfluss mehrerer Kupferverbindungen auf Morphologie, Chlorophyllverhältnis und Sauerstoffradikale in verschiedenen Moosarten. Diese waren einerseits das Modellmoos *Aphanorhegma patens* (Hedw.) [Syn. *Physcomitrella patens* (Hedw. & Lindb.)] und andererseits die kupfertoleranten Moose *Mielichhoferia elongata* und *Pohlia drummondii*. Für die unterschiedlichen Kupferverbindungen wurden folgende Anionen gewählt: CuCl_2 , CuSO_4 , Cu-Ethylendiamintetraessigsäure (Cu-EDTA). Die Konzentrationen wurden aufgrund einer vorangegangenen Arbeit (Wernitznig, 2009) bei allen Verbindungen auf 0,1 mM festgelegt. Bei dieser Konzentration zeigen sich schon erste Wachstumseinbußen bei den Moosen. Bei CuEDTA wurde zusätzlich eine zweite Behandlung mit 10 mM verwendet, da der EDTA-Komplex viel größer als bei CuCl_2 und CuSO_4 und daher weniger für die Pflanze verfügbar ist.

In der Literatur werden Moose als stresstolerante Ruderalpflanzen klassifiziert (During, 1992). Besonders auf Extremstandorten müssen Moose auf rasch wechselnde Bedingungen reagieren, woraus sich die hohe physiologische Plastizität erklären lässt. Zusätzlich besitzen sie eine enorme Regenerationsfähigkeit, was zum Beispiel Proctor (2001) mit auf Felsen wachsenden Moosen zeigt, die nach völliger Austrocknung innerhalb von Stunden regenerieren. Daher wurde in dieser Arbeit überprüft, ob diese schnelle Anpassungs- und Regenerationsfähigkeit auch bei Kupferstress zu erkennen ist. Anlehnend an das Stresskonzept von Lichtenthaler (1996) wurden daher Chlorophyll- und Größenmessungen nach kurzem Einwirken (eine Woche) und nach langem Einwirken (sechs Wochen) des Kupfers sowie nach einer Regenerationsphase von sechs Wochen vorgenommen.

Moose besitzen im Gegensatz zu höheren Pflanzen keine Wurzeln, die ihnen bei Kupferüberschuss als Aufnahmebarriere dienen könnten. Trotzdem haben manche Moose eine höhere Toleranz gegenüber Schwermetallen entwickelt als andere Moose (Shaw, 1994). Somit stellt sich die Frage, ob die toleranteren Moose trotz des Fehlens von echten Wurzeln zu einer Art „Exkludierung“ des Kupfers fähig sind. Dafür wurden die Moose nach sechs

Wochen Kupferbehandlung auf die Elementzusammensetzung zwischen den alten bodennahen und den jungen bodenfernen Teilen der Moospflanze hin untersucht. Auf diesen Verteilungen aufbauend wurde auch der damit zusammenhängende oxidative Stress veranschaulicht und mit den Kupferkonzentrationen im Moos verglichen.

Von diesen Untersuchungsschwerpunkten ausgehend wurden folgende Hypothesen getestet:

1. Die Moose, die dem Kupfer ausgesetzt sind, werden kleiner Zellen haben, da nicht die ganze Energie für Zellwachstum verwendet werden kann.
2. Das kupfertolerante Moos *M. elongata* und das fakultative Schwermetallmoos *P. drummondii* zeigen weniger Stresssymptome in Form einer Verschiebung des Chl *a/b* Verhältnisse zu mehr Chl *a* als das unangepasste Moos *A. patens*.
3. Nach der Regenerationsphase von sechs Wochen kehren alle Moose zu ihren ursprünglichen durchschnittlichen Zellgrößen und Chl *a/b*-Verhältnissen zurück.
4. Die Bereiche, in denen mehr Kupfer zu finden ist, weisen auch mehr oxidativen Stress in Form von Sauerstoffradikalen auf.
5. Die Unterschiede in den Kupfermengen zwischen Basis- und Spitzenbereich sind bei *A. patens* kleiner als bei *M. elongata* und *P. drummondii*, da dieses keine Strategie zur Kupferexkludierung besitzt.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchspflanzen

Aphanorhegma patens (Hedw), Funariaceae, das Ausgebreitete Kleinblasenmützenmoos (Abb. 1A), ist eine relative kurzlebige Art, welche in kleinen Gruppen auf offenen, lichtreichen und feuchten Standorten vorkommt (Nebel & Philippi, 2001). Es ist eine konkurrenzschwache Pionierart, die vor allem durch die Trockenlegung von Feuchtstandorten immer weniger geeignete Habitate findet. In der Wissenschaft besitzt das Moos große Bedeutung als Modellorganismus (Schäfer & Zrýd, 2001) und daher gibt es bereits viele Arbeiten über die Toleranz des Mooses gegenüber verschiedensten Stressoren (Ruibal *et al.*, 2012; Sassmann *et al.*, 2015). Das für die Untersuchungen verwendete Moos ist ursprünglich eine Schenkung von R. Reski von der Universität Freiburg, Deutschland.

Mielichhoferia elongata (Hornsch.), das Verlängerte Mielichhofermoos, gehört zur Familie der Bryaceae (Abb. 1B). Es bildet lockere bis dichte Rasen auf schwermetallreichen Standorten (z.B. ehemaligen Erzhalde). Besonders häufig wurde es auf Kupferstandorten gefunden, weshalb es in der Literatur als „Kupfermoos“ gilt (Shaw, 1994). In Österreich kommt dieses Moos nur sehr selten vor.

Pohlia drummondii (Müll. & Hal.), das Veränderliche Pohlmoos, gehört wie *M. elongata* zur Familie der Bryaceae (Abb. 1C). Es bildet ebenfalls lockere bis dichte Rasen auf kalkarmen, humosen, nährstoffreichen und feuchten Standorten in höheren Lagen, wie z.B. unbefestigte, wenig benutzte Fußwege (Nebel & Philippi, 2001). Sowohl *M. elongata* als auch *P. drummondii* stammten von der Schwarzwand, einer ehemaligen Kupfermine nahe Hüttschlag, Salzburg.

Abgesehen von Schwermetallstandorten in Österreich (Schwarzwand, Hirschwang) wurden im Zuge einer Exkursion auch Standorte in Nicaragua (Chontales) aufgesucht. Bei der Untersuchung der nicaraguanischen Halde wurde auch eine Moosart gefunden und für weitere Versuche in Österreich herangezogen. Die systematische Einordnung ergab *Dicranella hilariana* (Mont.). Untersuchungen auf eventuelle Schwermetallaufnahme zeigten aber keine wesentliche Kontaminierung des Mooses. Außerdem fand sich in der Literatur kein Verweis, dass dieses Moos auf schwermetallhaltigen Böden vorkommt. Da die

Kultivierung der Proben leider nicht gelang, wurde dieses Moos nicht für weitere Versuche verwendet.

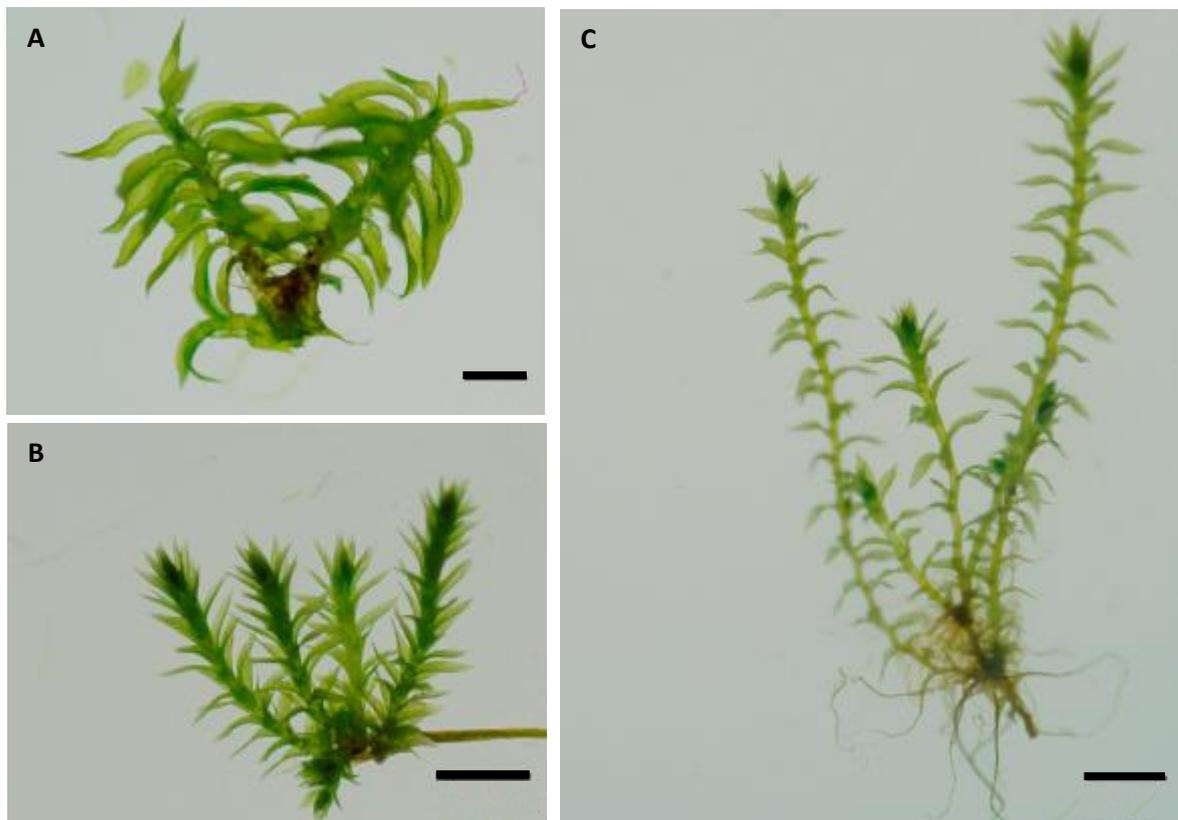


Abb. 1: Die Aufnahmen zeigen den Habitus einzelner Pflänzchen im Hellfeld von A) *A. patens*, einer nicht auf Metallstandorten zu findenden Moosart, das in dieser Arbeit mit den beiden auf Metallstandorten vorkommenden Arten B) *M. elongata* und C) *P. drummondii* verglichen wird.; Messbalken = 1 mm

2.2 Kultivierung

Alle drei Moosarten wurden in Sterilkultur gezogen. Als Nährmedium wurde Benecke-Medium verwendet (Benecke, 1903), abgeändert nach Gang *et al.* (2003), mit folgender Zusammensetzung: 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 , und 100 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Versuche aus vorangegangenen Arbeiten (Wernitznig, 2009) zeigten für *M. elongata* und *P. drummondii* sehr gute Wachstumsbedingungen.

Die einzelnen Nährstoffe und die unterschiedlichen Kupferkonzentrationen wurden in Erlenmeyerkolben überführt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 5,8 durch die Zugabe von HCl bzw. NaOH angepasst. Danach wurde pro 100 ml 0,8 g Agarpulver (VWR) hinzugefügt und die Mischung bei ständigem Rühren erhitzt bis der Agar

vollständig in Lösung gegangen war. Mit Watte und Aluminiumfolie wurde der Erlenmeyerkolben verschlossen, um den Wasserverlust durch Dampf so gering wie möglich zu halten. Danach wurde das Medium in einem Dampfsterilisator für 20 Minuten bei 121°C sterilisiert. Anschließend wurde das Medium wieder verflüssigt und in 5,5 cm große Petrischalen gegossen.

Für die Kultivierung wurden kleine Moosstücke in 3x3 Reihen in das verfestigte Nährmedium verpflanzt. Um möglichst gleichbleibende Bedingungen zu schaffen und andere Umwelteinflüsse neben der Kupferbelastung auszuschließen, wurde ein Klimaschrank verwendet. In diesem Schrank herrschte eine durchschnittliche Temperatur von 21°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) und ein Tag/Nachtzyklus von 14/10 Stunden.

Die Überimpfung der Moose erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank (AURA-V, EHRET). Die Moosstücke wurden mit Pinzetten in die mit Medium gefüllten Petrischalen überführt. Zwischen jeder neuen Petrischale wurden die Pinzetten abgeflammt, um eventuelle Verunreinigungen nicht auf mehrere Schalen zu verbreiten. Danach wurden die Schalen mit Parafilmstreifen verschlossen.

Die Kulturen wuchsen sechs Wochen in je 15 parallelen Ansätzen im Klimaschrank. Nach einer Woche wurden zufällig fünf Petrischalen für die Kurzzeitmessung gewählt. Aus zwei Schalen wurden für die Zellgrößenbestimmung zufällig mehrere Blätter von verschiedenen Pflänzchen genommen. Anschließend wurden alle fünf Schalen zur Bestimmung des Chl *a/b*-Verhältnisses verwendet. Am Ende der Kultivierungszeit von sechs Wochen wurde der Vorgang mit fünf Schalen wiederholt. Die restlichen fünf Schalen wurden zur Überimpfung auf das Kontrollmedium verwendet, um zu beobachten, ob sich die gestressten Pflänzchen regenerieren lassen und zur Morphologie und Physiologie der Kontrolle zurückkehren. Nach der weiteren Kultivierung von sechs Wochen auf dem Kontrollmedium wurden wiederum Zellgröße und Chl *a/b*-Verhältnisse gemessen.

2.3 Fotodokumentation

Um den Fortgang des Wachstums und sichtbare Veränderungen der Moose in den verschiedenen Ansätzen zu dokumentieren, wurden von jedem Ansatz drei Petrischalen kurz nach dem Überimpfen zufällig ausgesucht und wöchentlich bis zur sechsten Woche

fotografiert [Nikon J1 mit Objektivadapter FT1 und einem Makroobjektiv (AF Micro NIKKOR 60mm f/2,8 D)]. Jedes Foto wurde mit ISO 200 bei Blende 5,6 und einer Belichtung von 1/100 bei höchster Auflösung gemacht. Die Kamera wurde auf einem Stativ in 60 cm Höhe über dem Objekt fixiert. Belichtet wurden die Petrischalen mit einer Idlon Leuchtplatte (Photonic F3000, 70%) von unten und mit einem Toplicht (Photonic LED F1, Stufe 4) schräg von oben.

2.4 Größenvermessung Makrofotographie

Vor der Chlorophyllextraktion der Moose nach sechswöchiger Behandlung wurde noch die Wachstumshöhe der Moospflänzchen bestimmt. Dafür wurden alle Pflänzchen je Ansatz aufgelegt und fotografiert. Anschließend wurden die Pflänzchen auf den Fotos mit Hilfe der Software Photoshop CS4 (Adobe) von der Basis bis zur Knospe vermessen. Zur endgültigen Berechnung der durchschnittlichen Wuchshöhe nach sechs Wochen wurden nur die neun höchsten Pflänzchen pro Schale herangezogen, da während der Behandlung ständig neue Pflänzchen gebildet wurden, die natürlich deutlich kleiner sind als die ursprünglich gepflanzten. Somit konnten die verschiedenen Ansätze besser miteinander verglichen werden.

2.5 Zellvermessung Lichtmikroskopie

Die Blätter zufällig gewählter Pflänzchen wurden im Lichtmikroskop (Olympus BX41) betrachtet. Mit einer Mikroskopkamera und dem Programm Cell-D (Olympus) wurden Teilbereiche der Blätter fotografiert. Bei der Auswahl des abzulichtenden Bereiches wurde darauf geachtet nicht zu nah an der Spitze (relativ kleine Zellen) oder an der Basis (relativ langgestreckte Zellen) zu sein. In dem fotografierten Bereich wurden dann die Länge und die Breite aller Zellen gemessen, die deutlich erkennbar waren (ausgenommen Saumzellen und Zellen der Rippe). Diese Werte wurden zusammen mit den Werten der anderen Blätter des gleichen Ansatzes zur Berechnung des Mittelwertes herangezogen. Pro Ansatz wurden mindestens neun Blätter (von vier unterschiedlichen Pflänzchen) verwendet und mindestens 220 Zellvermessungen gemacht.

2.6 Chl *a/b*-Verhältnis

Die Stressintensität kann in Moosen durch die Verschiebung des Chl *a/b* Verhältnisses zu mehr Chl *b* gezeigt werden. Um das Chlorophyll messen zu können, musste es davor aus der Zelle extrahiert werden. Dafür wurde das Moosmaterial mit Aceton (100%) in einem Mörser zerrieben. Damit die Zellen noch besser aufgebrochen werden, wurde etwas Quarzsand zugegeben. Der Aceton-Chlorophyll-Extrakt wurde durch einen Zellulosefilter (der Sand und Pflanzenreste zurückhält) in eine Eprovette gefiltert. Zu diesem Gemisch wurde 1,5 ml Benzin (Siedepunkt 100-140°C) hinzugegeben und gut vermischt. Danach wurde destilliertes Wasser im Überschuss zugegeben. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften lagert sich das Chlorophyll nun in der Benzinschicht an. Diese Benzinfraction wurde mit einer Glaspipette aufgezogen und in ein Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf) transferiert. Diese Prozedur wurde je Ansatz für alle fünf Petrischalen einzeln durchgeführt.

Die Absorption der Benzinfraction wurde in Glasküvetten im Spektrophotometer (SHIMADZU, UV-2101PC) gemessen. Es wurde das Spektrum im Wellenlängenbereich von 730 - 400 nm aufgezeichnet (Messung: langsam, Schrittweite: 0,5 nm). Um das Rauschen der Messung im Spektrometer zu reduzieren, wurde jede Messung dreimal wiederholt und dann der Mittelwert berechnet. Die Werte von 662 nm (Chl *a* Maxima) und 646,5 nm (Chl *b* Maxima) wurden zur Berechnung des Chl *a/b*-Verhältnisses herangezogen.

Die Berechnung der einzelnen Chlorophyllgehalte erfolgte mit selbsterstellten Formeln für Benzin, basierend auf den Formeln von Lichtenthaler (1987) für Aceton. Dafür wurde zuerst die Absorption eines Acetonextrakts gemessen und die Chlorophyllkonzentration berechnet. Danach wurde das Chl aus diesem Acetongemisch mit Benzin extrahiert und die Absorption gemessen. Durch den Vergleich der Chlorophyllkonzentration des Acetongemisches und den Absorptionshöhen des Benzingemisches konnten die jeweiligen Konstanten berechnet werden:

$$\text{Chl } a = 10,9 * A_{662} - 0,94 * A_{646,5}$$

$$\text{Chl } b = 19,99 * A_{646,5} - 4,37 * A_{662}$$

A_{662} und $A_{646,5}$ stehen für die jeweilige Absorption an der entsprechenden Wellenlänge, welche mit den errechneten Konstanten multipliziert werden. Aus den so gewonnen Werten für Chl *a* und *b* konnte anschließend das Verhältnis berechnet werden.

2.7 Färbung von Sauerstoffradikalen

Zu den reaktiven Sauerstoffarten zählen unter anderem Superoxid-Anionen (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Zur Färbung von O_2^- -Radikalen wird Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) verwendet, welches mit dem Sauerstoffradikal einen blauen Farbkomplex bildet. Zum Nachweis des Superoxids wurde eine modifizierte Methode nach Jabs *et al.* (1996) angewendet. Einzelne Pflänzchen wurden in eine 10 mM Kaliumphosphat-Pufferlösung (K_3PO_4 , pH 6,4) mit 10 mM Natriumazid (NaN_3) und 0,1% NBT eingelegt und im Exsikkator für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben für sechs Stunden bei Zimmertemperatur gelagert. Die Pflänzchen wurden danach in einem Gemisch aus Ethanol, Glycerin und Essigsäure (Volumenverhältnis 1:1:3) gekocht bis das Chlorophyll und andere Farbstoffe herausgelöst waren. Anschließend wurden die einzelnen Pflänzchen unter der Stereolupe im Hellfeld fotografiert und mit Hilfe der Software GSA Image Analysis (GSA, Rostock) der Anteil der gefärbten Fläche in Prozent des gesamten Moosstämmchen analysiert. Dabei wurde das Stämmchen in Basis und Spitze unterteilt.

Zur Färbung des H_2O_2 wurde 3,3-Diaminobenzidin (DAB) verwendet. DAB bildet einen braunen Farbkomplex mit den endogenen Peroxidasen, welche mit dem Peroxid assoziiert sind. Zum Nachweis des Peroxids wurde eine modifizierte Methode nach Thordar-Christensen *et al.* (1997) angewendet. Einzelne Pflänzchen wurden in eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid und 12 mM Gesamt-Phosphat) mit 0,1% DAB eingelegt und ebenfalls im Exsikkator für 10 Minuten inkubiert. Danach wurde diese für 12 Stunden bei Zimmertemperatur dunkel gestellt und anschließend das Chlorophyll und andere Farbstoffe wie beim NBT herausgekocht. Hier wurde ebenfalls der gefärbte Anteil der Basis und der Spitze anhand von Bildern berechnet.

2.8 Elementanalyse

Der Kupfergehalt in den Moospflanzen wurde in einem Rasterelektronenmikroskop (REM; Philipps XL 20) mit energiedispersivem Röntgenspektrometer (EDX; EDAX mit Genesis-Software) untersucht. Dafür wurden die Moospflanzen oberhalb des Nährmediums abgeschnitten und in Papiertüten im Trockenschrank bei 70 °C für 48 h getrocknet. Danach

wurden sie auf einen Probenhalter aus Aluminium (Stub) auf selbstklebenden Kohlenstoff-Leittaps aufgebracht. Für jeden Ansatz wurde ein eigener Stub verwendet. Die Stubs wurden mit Kohle bedampft (Leica EM MED 020) und bis zur Analyse trocken gelagert.

Alle Analysen des Kupfergehalts wurden mit dem REM-EDX bei gleichen Einstellungen [Arbeitsabstand 12; 30 kV; Tilt 15; Take off Angle 27,21°; Death Time ~30%; Aufnahmedauer (Lsec) 100 Sekunden] durchgeführt. Dabei wurden für jeden Ansatz mindestens acht Messungen jeweils an der Basis und an der Spitze der Moospflanzen gemacht. Pro Ansatz wurden mindestens drei unterschiedlichen Moospflanzen verwendet. Neben den Kupferwerten wurden auch noch die Elemente C, O, Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca und Fe gemessen.

Zusätzlich wurden auch Linienscans entlang des gesamten Moosstämmchens aufgezeichnet. Hierfür wurden die gleichen Einstellungen wie oben verwendet, ausgenommen von Lsec (Dauer der Scans); diese hing von der Länge der zu vermessenden Line ab und wurde vom Genesis Programm selbst gewählt.

2.9 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm STATISTICA 7.1 (StatSoft) verwendet. Die zu analysierenden Daten wurden zuerst auf Normalverteilung und Varianzhomogenität überprüft (Shapiro-Wilk-Test und Levene-Test). Bei Vorhandensein dieser Kriterien wurde zur Analyse der Daten eine mehrfaktorielle ANOVA mit anschließendem Tukey HSD Test als *Post-hoc* Test durchgeführt. Bei Nicht-Vorhandensein von Normalität und Homogenität wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet und anschließend einem *Post-hoc* Vergleich der mittleren Ränge für alle Gruppenpaare unterzogen. Als signifikante Werte wurden solche definiert, die verglichen mit der Kontrolle, kleinere p-Werte als 0,05 besaßen; sie sind in den Grafiken mit „*“ markiert. Alle Grafiken zeigen den Mittelwert mit den dazugehörigen doppelten Standardfehlern (2x SE) als Fehlerbalken.

3 Ergebnisse - Morphologie

3.1 Wachstumsunterschiede zwischen Cl_2/SO_4 und EDTA Verbindungen

Um den Wachstumsfortschritt der drei Moosarten (*A. patens*, *M. elongata* und *P. drummondii*) in den sechs Wochen auf kupferbehandelten und den anschließenden sechs Wochen auf kupferfreiem Medium zu dokumentieren, wurden jede Woche Aufnahmen von den Petrischalen gemacht.

Anhand der Fotodokumentation war anfangs zwischen den einzelnen Behandlungen in allen drei Versuchsarten kein Unterschied festzustellen (Abb. 2-4: 1 W). Nach sechs Wochen waren hingegen bei allen drei Arten Unterschiede zu finden, vorallem zwischen den Pflänzchen, die auf $\text{CuCl}_2/\text{CuSO}_4$ Medien und die auf CuEDTA wuchsen. Bei *A. patens* zeigten die CuCl_2 und CuSO_4 Behandlungen kaum mehr gesunde Pflänzchen, wo hingegen bei *M. elongata* und *P. drummondii* weitaus gesündere und kräftigere Pflänzchen zu finden waren. Markant war bei *P. drummondii* im CuSO_4 Ansatz die Bildung von Brutknospen zur vegetativen Vermehrung.

Bei den CuEDTAs war in den 0,1 mM Konzentrationen aller Arten der Pflanzenwuchs der Kontrolle am ähnlichsten. Im Gegensatz dazu war die 10 mM Konzentration stark unterschiedlich zwischen den Arten. So zeigte *A. patens* einen sehr starken Biomassezuwachs mit sehr dichten Kolonien, wo hingegen *M. elongata* kaum Protonema und auch kaum weitere Pflänzchen produzierte. *P. drummondii* zeigte zwar auch weniger Pflanzenzuwachs, doch war der Unterschied zur Kontrolle nicht sehr groß.

Nach der Regeneration der Moose auf kupferfreiem Medium wiesen fast alle Versuchsarten wie anfangs kaum noch Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle auf (Abb. 2-4: 6 W Re). Allein die CuCl_2 und die CuSO_4 Behandlung bei *A. patens* hatte noch leicht kleinere Pflanzen als die Kontrolle.

3.1.1 *Aphanorhegma patens*

Bei *A. patens* zeigten die Pflänzchen auf den einzelnen Kupfermedien ein ähnliches Wachstum bis zur dritten Woche (Abb. 2). Die einzelnen Moospflanzen waren gleich grün und produzierten Protonema. Ab der vierten Woche wurde das Protonema beim CuCl_2 und CuSO_4 braun und die Pflänzchen zeigten keinen sichtbaren Biomassezugewinn mehr. Viele Pflänzchen starben sogar bis zum Ende der sechsten Woche. Anders verhielt es sich mit den CuEDTA-Ansätzen, bei denen ein starker Zugewinn der Biomasse gegenüber der Kontrolle bis zur sechsten Woche beobachtbar war. Besonders im 10 mM CuEDTA wuchsen die Moospflänzchen in dichten Gruppen. Der 0,1 mM CuEDTA Ansatz zeigte hingegen große Pflanzen und war somit im Wachstum der Kontrolle am ähnlichsten. Die Regeneration von sechs Wochen brachte hingegen kaum Unterschiede im Wachstum zwischen den einzelnen Behandlungen. Die Pflänzchen der CuCl_2 und CuSO_4 Behandlungen erholten sich wieder; waren aber nicht so kräftig wie die Pflanzen auf kupferfreiem Medium. Die Pflänzchen im 10 mM CuEDTA zeigten hingegen wieder gleiche Ausprägungen wie die Kontrolle.

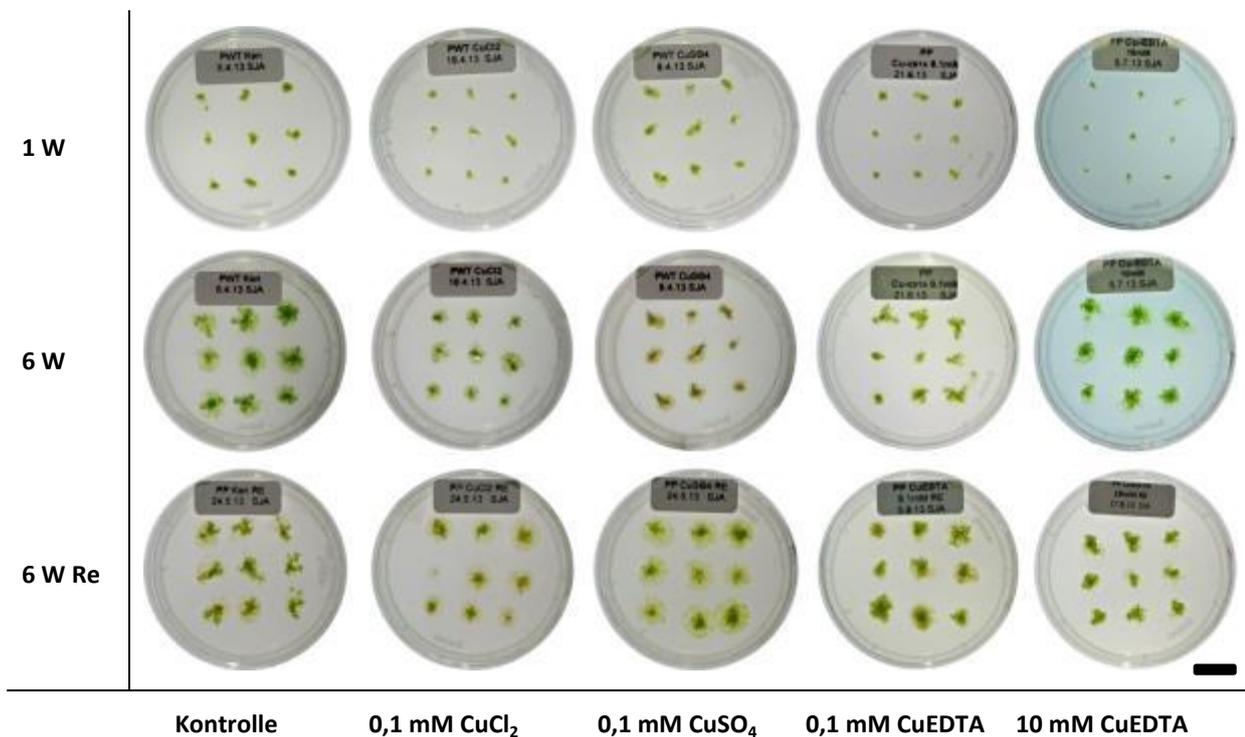


Abb. 2: Makroskopische Aufnahmen des Wachstumsfortschrittes von *A. patens* von der ersten (1 W) und sechsten Woche (6 W), sowie die Aufnahmen der regenerierten Moose nach sechs Wochen (6 W Re); Kontrollmedium ohne Kupfer (Kontrolle), sowie Medien mit CuCl_2 , CuSO_4 und CuEDTA; Messbalken = 1 cm

3.1.2 *Mielichhoferia elongata*

M. elongata verhielt sich anders als *A. patens*. In der ersten Woche war zwischen der Kontrolle und dem 0,1 mM CuEDTA kein optischer Unterschied zu erkennen, da bei beiden große Pflanzen und langes Protonema beobachtbar waren (Abb. 3). Auf CuCl₂ und CuSO₄ fand man im Vergleich zur Kontrolle kräftigere Pflänzchen aber weniger Protonema. Den kleinsten Biomassezuwachs zeigte der 10 mM CuEDTA-Ansatz, bei dem die Moospflänzchen sehr vereinzelt wuchsen und bei dem auch weniger Protonema gefunden wurde. Die Regeneration führte zu ähnlichen Ausprägungen der einzelnen Ansätze gegenüber der Kontrolle.

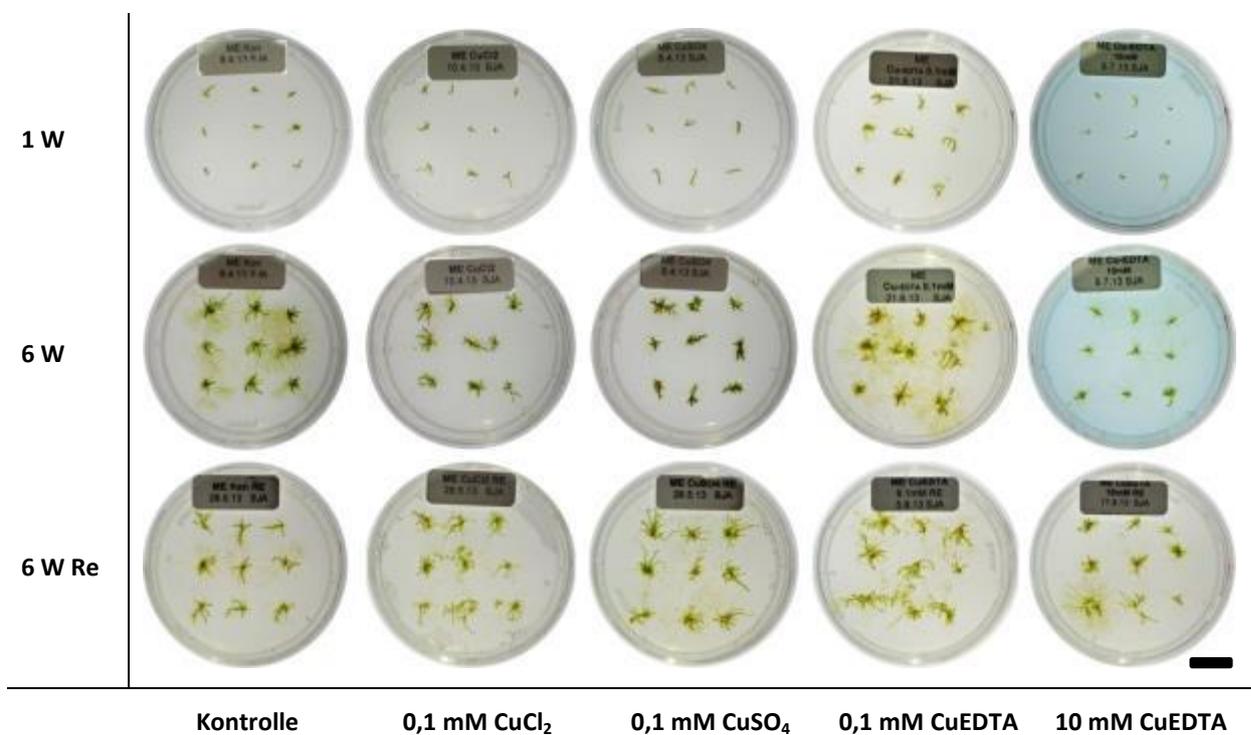


Abb. 3: Makroskopische Aufnahmen des Wachstumsfortschrittes von *M. elongata* von der ersten (1 W) und sechsten Woche (6 W), sowie die Aufnahmen der regenerierten Moose nach sechs Wochen (6 W Re); Kontrollmedium ohne Kupfer (Kontrolle), sowie Medien mit CuCl₂, CuSO₄ und CuEDTA; Messbalken = 1 cm

3.1.3 *Pohlia drummondii*

Die Ansätze bei *P. drummondii* verhielten sich ähnlich wie bei *M. elongata* (Abb. 4). Die Pflanzen in der Kontrolle und dem 0,1 mM CuEDTA waren nach einer Woche gleich gut entwickelt. Nach sechs Wochen zeigten die Pflänzchen des CuCl₂ und CuSO₄ ebenfalls kräftigere Wuchsformen und waren verstärkt in Gruppen vorzufinden. Auch entwickelten die Pflänzchen des CuSO₄-Ansatzes vermehrt Bulben in den Blattachseln. Auf 10 mM CuEDTA zeigten auch hier die Pflänzchen den geringsten Biomassezuwachs bis zur sechsten Woche. Bei der Regeneration war hingegen optisch kaum mehr ein Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungen zu finden.

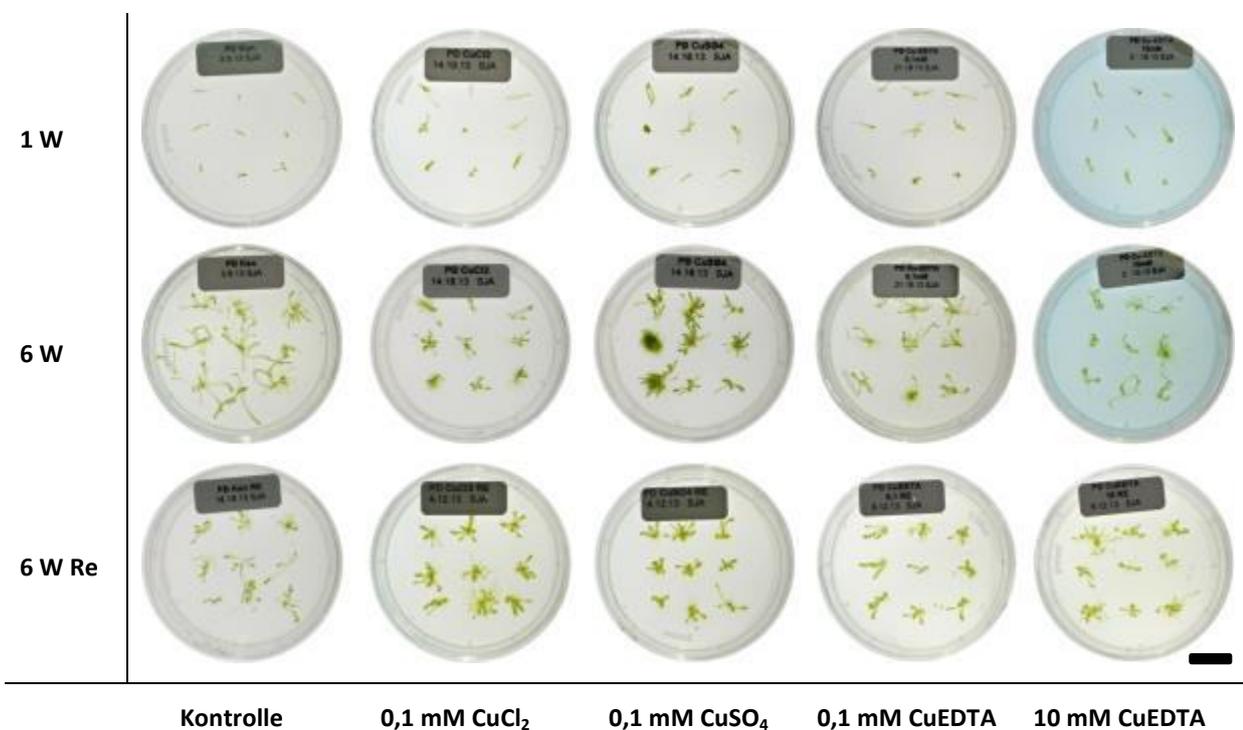


Abb. 4: Makroskopische Aufnahmen des Wachstumsfortschrittes von *P. drummondii* von der ersten (1 W) und sechsten Woche (6 W), sowie die Aufnahmen der regenerierten Moose nach sechs Wochen (6 W Re); Kontrollmedium ohne Kupfer (Kontrolle), sowie Medien mit CuCl₂, CuSO₄ und CuEDTA; Messbalken = 1 cm

3.2 Kupfer fördert die Wuchshöhe in angepassten Moosarten

Die einzelnen Pflänzchen der drei Versuchsarten wurden zur Bestimmung der Wuchshöhe abfotografiert und anschließend von der Basis bis zur Spitze des Stämmchens vermessen.

Bei *A. patens* hatten die Moose im CuCl_2 und CuSO_4 etwas kleinere Pflänzchen als in der Kontrolle. Das Gegenteil ist der Fall bei *M. elongata* und *P. drummondii*, wo die Moose in den gleichen Medien viel größer waren als die jeweiligen Kontrollen. Auch sind bei *M. elongata* und *P. drummondii* die Moose im CuCl_2 jeweils größer als im CuSO_4 .

In den CuEDTA Behandlungen waren die Pflänzchen von *A. patens* am größten. Auch bei *M. elongata* waren die Moose deutlich größer als die Kontrolle. Bei *P. drummondii* bewirkte das CuEDTA nur im 0,1 mM CuEDTA-Ansatz eine Vergrößerung der Pflänzchen. In allen drei Moosarten zeigte sich aber, dass sich im 0,1 mM CuEDTA größere Moose entwickelten als im 10 mM CuEDTA.

3.2.1 *Aphanorhegma patens*

Bei *A. patens* waren die kleinsten Pflanzen auf CuCl_2 (2,1 mm) und auf CuSO_4 (2,1 mm) zu finden (Abb. 5). Die Kontrolle war mit durchschnittlich 3,1 mm um ca. 1 mm größer. Im 10 mM CuEDTA-Ansatz erreichten die Pflanzen eine durchschnittliche Höhe von 3,9 mm und im 0,1 mM eine Höhe von 4,8 mm. Damit war die Wuchshöhe auf 0,1 mM CuEDTA-Medium auch signifikant höher als in der Kontrolle ($p < 0,05$).

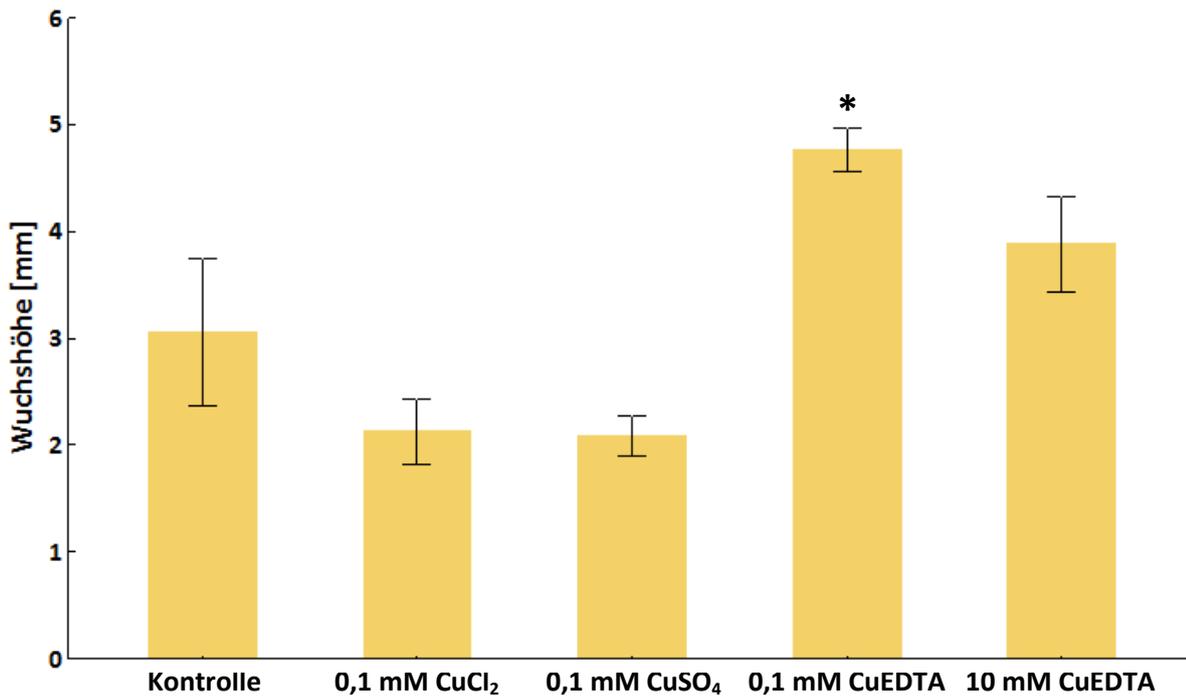


Abb. 5: Die durchschnittliche Wuchshöhe von *A. patens* in den fünf Cu-Ansätzen nach sechs Wochen Wachstum; Fehlerbalken = $2 \times \text{SE}$, * zeigt signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$)

3.2.2 *Mielichhoferia elongata*

In den Ansätzen mit *M. elongata* zeigte die Kontrolle mit 2,2 mm im Durchschnitt die kleinsten Pflanzen (Abb. 6). Auf 10 mM CuEDTA und auf CuSO₄ waren mit 4,3 mm bzw. 4,1 mm deutlich größer Pflänzchen zu finden als in der Kontrolle. Noch stärker wuchs das Moos auf 0,1 mM CuEDTA und auf CuCl₂. Hier erreichten die Pflänzchen eine durchschnittliche Höhe von 6,0 mm bzw. 6,4 mm und somit eine signifikant größere Wuchshöhe als in der Kontrolle ($p < 0,001$).

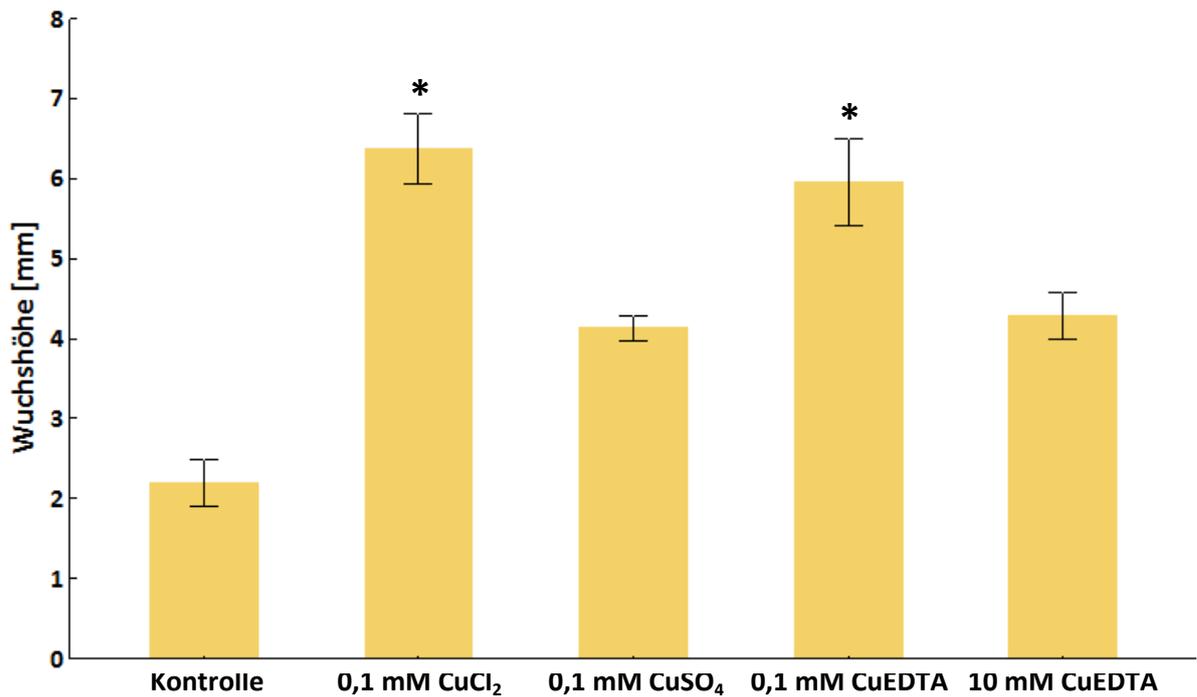


Abb. 6: Die durchschnittliche Wuchshöhe von *M. elongata* in den fünf Cu-Ansätzen nach sechs Wochen Wachstum; Fehlerbalken = 2x SE, * zeigt signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$)

3.2.3 *Pohlia drummondii*

P. drummondii zeigte im Gegensatz zu *M. elongata* und *A. patens* die kleinsten Pflanzen auf 10 mM CuEDTA (6,7 mm; Abb. 7). Etwas größer war die Kontrolle mit 7,4 mm. Im 0,1 mM CuEDTA-Ansatz betrug die durchschnittliche Höhe 10,5 mm und im CuSO₄ 12,9 mm. Bei *P. drummondii* wuchsen, wie bei *M. elongata*, auf CuCl₂ die größten Pflänzchen (15,9 mm), welche ca. doppelt so groß wurden wie die Kontrolle. Sowohl auf CuCl₂ als auch auf CuSO₄ waren die Moose signifikant größer als in der Kontrolle ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,01$).

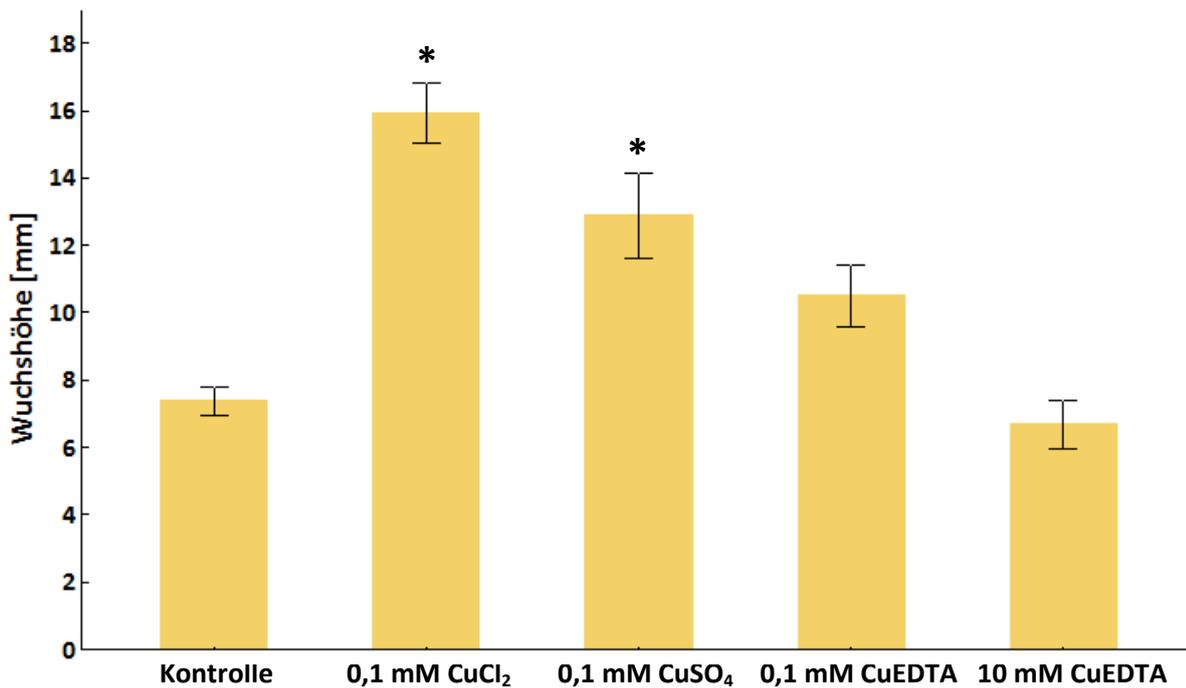


Abb. 7: Die durchschnittliche Wuchshöhe von *P. drummondii* in den fünf Cu-Ansätzen nach sechs Wochen Wachstum; Fehlerbalken = 2x SE, * zeigt signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$)

3.3 Stark vergrößerte Zellen nach Regeneration in allen CuEDTA-Behandlungen

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Zelllängen und -breiten wurden zufällig Blätter unterschiedlicher Pflänzchen derselben Kupferbehandlung fotografiert und danach die Zellen vermessen.

Bei *A. patens* entwickelten sich in der ersten Woche in allen Ansätzen längere Zellen (bei gleicher Zellbreite), die somit auch eine größere Fläche als die Kontrolle bewirkte. Bei *M. elongata* lagen die Zelllängen bei allen Behandlungen knapp um den Wert der Kontrolle. Hingegen waren die Zellen auf CuCl_2 und CuSO_4 nach der ersten Woche breiter, wodurch hier auch größere Zellen gegenüber den anderen Ansätzen entstanden. Bei *P. drummondii* hatten nach einer Woche hingegen die Pflänzchen auf CuCl_2 und 10 mM CuEDTA die kürzesten Zellen und auf CuSO_4 besonders breite Zellen (Abb. 8A & B). Somit waren die Zellen bei diesem Moos im Durchschnitt auf CuSO_4 größer und auf CuCl_2 und 10 mM CuEDTA deutlich kleiner als die Kontrolle.

Nach sechs Wochen zeigte *A. patens* auf CuCl_2 und 10 mM CuEDTA Medium die kürzesten Zellen und somit auch die kleinsten Zellen. Das Verhältnis von der Länge zur Breite änderte sich aber nur im CuEDTA, weil beim CuCl_2 die Zellen auch deutlich schmaler waren (Abb. 8C & D). *M. elongata* zeigte nach sechs Wochen sowohl auf CuSO_4 als auch auf beiden CuEDTA-Medien Blätter mit viel längeren Zellen als die der Kontrolle. Auf CuCl_2 hingegen besaßen die Blätter die breitesten Zellen. Im Durchschnitt waren bei *M. elongata* die Zellen aller Kupferansätze größer als die der Kontrolle. *P. drummondii* hatten nach sechs Wochen nur auf 0,1 mM CuEDTA deutlich längere Zellen als die anderen Behandlungen, doch waren hier die Zellen auch am schmälisten. Am breitesten waren hingegen die Zellen auf CuSO_4 und auf 10 mM CuEDTA.

Nach der Regeneration befanden sich die Zelllängen der mit CuCl_2 und CuSO_4 behandelten Pflänzchen bei *A. patens* leicht unter der Kontrolle und die der CuEDTA-Behandlungen lagen deutlich darüber. *M. elongata* zeigte keine Unterschiede bis auf die 10 mM CuEDTA-Behandlung, wo die Zellen signifikant länger waren (Abb. 8E & F). *P. drummondii* hatte auf CuCl_2 und auf beiden CuEDTA-Konzentrationen deutlich längere Zellen. Besonders auffällig war auch, dass das 10 mM CuEDTA bei allen Moosen die größten Zellen aufwies, sowohl durch die Verlängerung als auch die Verbreiterung der Zellen.

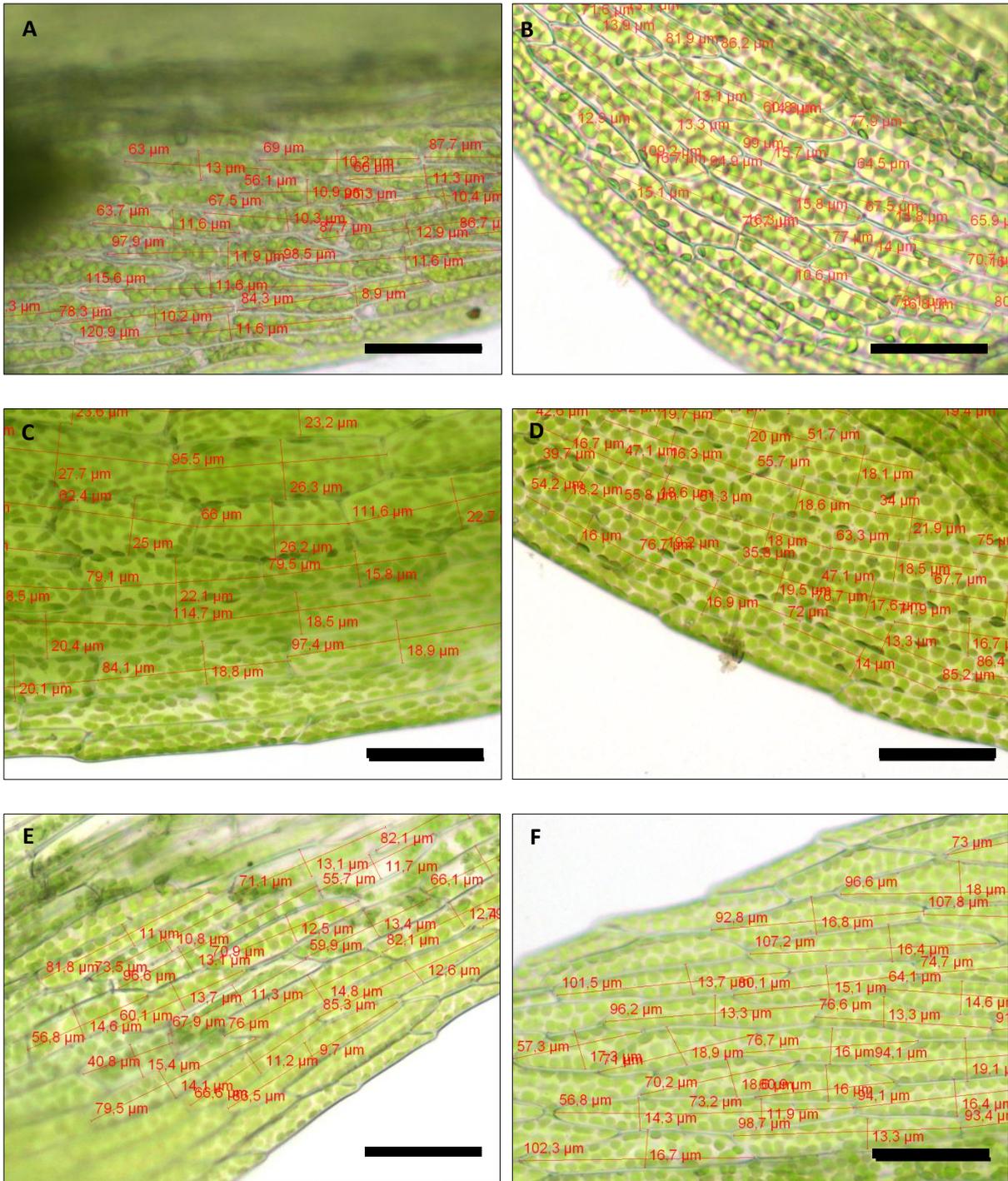


Abb. 8: A & B zeigen Zellen von *P. drummondii* nach einer Woche Wachstum, A) Kontrolle, B) breitere Zellen auf CuSO₄; C & D zeigen Zellen von *A. patens* nach sechs Wochen, C) Kontrolle, D) schmälere Zellen auf CuCl₂; E & F zeigen die Zellen von *M. elongata* nach sechs Wochen Regeneration, E) Kontrolle, F) längere und breitere Zellen auf 10 mM CuEDTA; Messbalken = 50 µm

3.3.1 *Aphanorhegma patens*

Zelllängen: Nach einer Woche mit Kupferbelastung zeigten alle Ansätze bei *A. patens* signifikant längere Zellen (von 58,1 μm beim 10 mM CuEDTA bis 63,1 μm beim CuSO₄) als die Kontrolle (53,6 μm ;). Die Signifikanzniveaus lagen im Vergleich mit der Kontrolle bei der 10 mM CuEDTA Behandlung bei $p < 0,01$ und bei den restlichen Ansätzen bei $p < 0,001$ (Abb. 9). Nach sechs Wochen stieg die Zelllänge in der Kontrolle stark auf 67,0 μm an. Ebenfalls in diesem Längenbereich lag der Ansatz mit CuSO₄ (68,4 μm) und mit 0,1 mM CuEDTA (67,2 μm). Die Zellen auf 10 mM CuEDTA und auf CuCl₂ verlängerten sich nur leicht auf 59,5 μm bzw. 62,3 μm und lagen signifikant ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$) unter der Kontrolle. Nach der Regeneration verkleinerten sich die Zelllängen in der Kontrolle, im CuCl₂ (signifikant; $p < 0,01$) und im CuSO₄ Ansatz auf 61,7 μm , 62,3 μm bzw. 57,1 μm . Die Längen in den CuEDTA-Ansätzen stiegen gegenüber der Kontrolle hingegen signifikant auf 69,3 μm bei 0,1 mM ($p < 0,001$) und auf 72,6 μm bei 10 mM ($p < 0,001$).

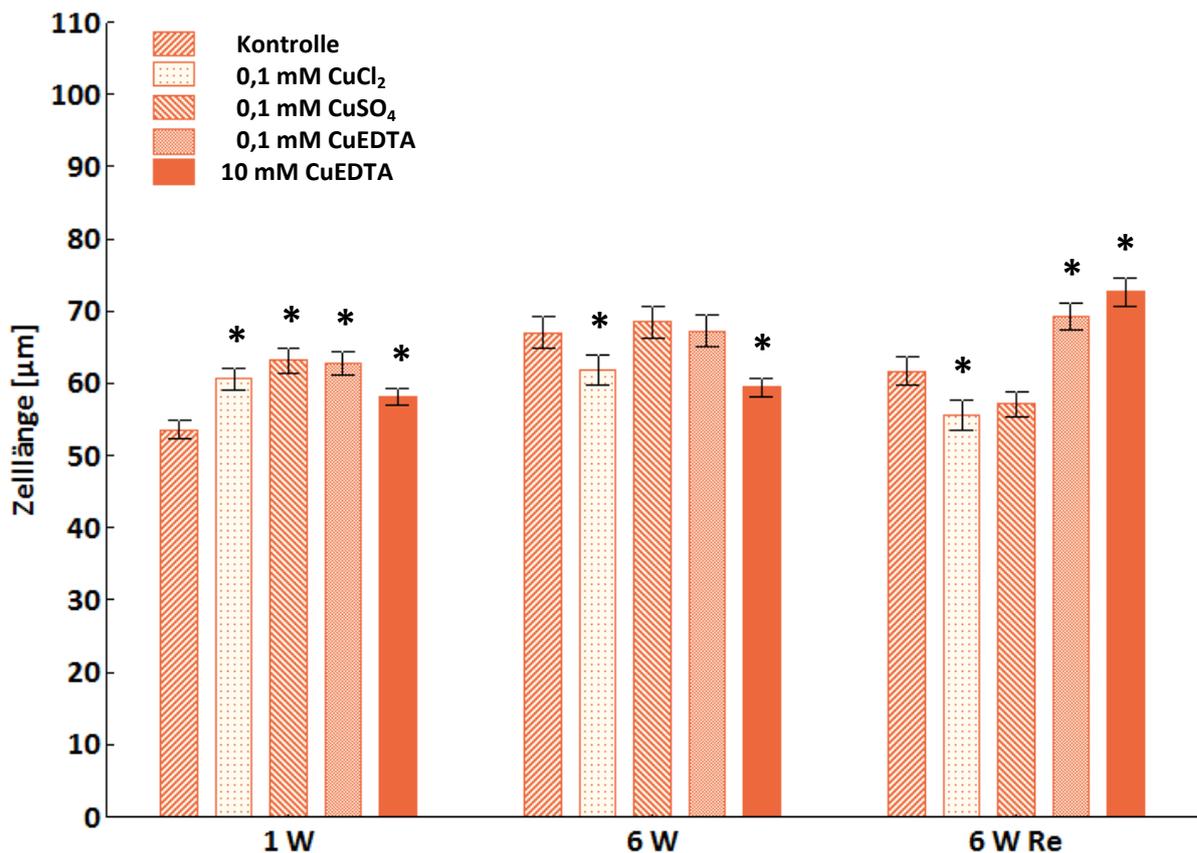


Abb. 9: Die durchschnittlichen Zelllängen von *A. patens* in den fünf Ansätzen nach einer (1 W) und sechs Wochen (6 W) sowie nach sechs Wochen Regeneration (6 W Re); Fehlerbalken = 2x SE, * zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle ($p < 0,05$)

Zellbreiten: Bei der Zellbreite waren in der ersten Woche kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen festzustellen (Abb. 10). Die Werte lagen zwischen 20,8 μm (CuSO_4) und 21,6 μm (10 mM CuEDTA). Nach sechs Wochen erreichten nur die Zellen des CuCl_2 Ansatzes einen signifikant niedrigeren Wert (19,0 μm , $p < 0,001$). Die Zellenbreiten der restlichen Ansätze befanden sich zwischen 20,8 μm (CuSO_4) und 21,3 μm (10 mM CuEDTA). Nach der Regeneration waren die Zellbreiten in der Kontrolle bei 19,6 μm , auf CuCl_2 bei 19,7 μm und auf CuSO_4 18,9 μm . Auf CuEDTA waren die Zellen deutlich breiter und erreichten auf 0,1 mM CuEDTA 21,1 μm ($p < 0,001$) und auf 10 mM CuEDTA 20,6 μm ($p < 0,05$).

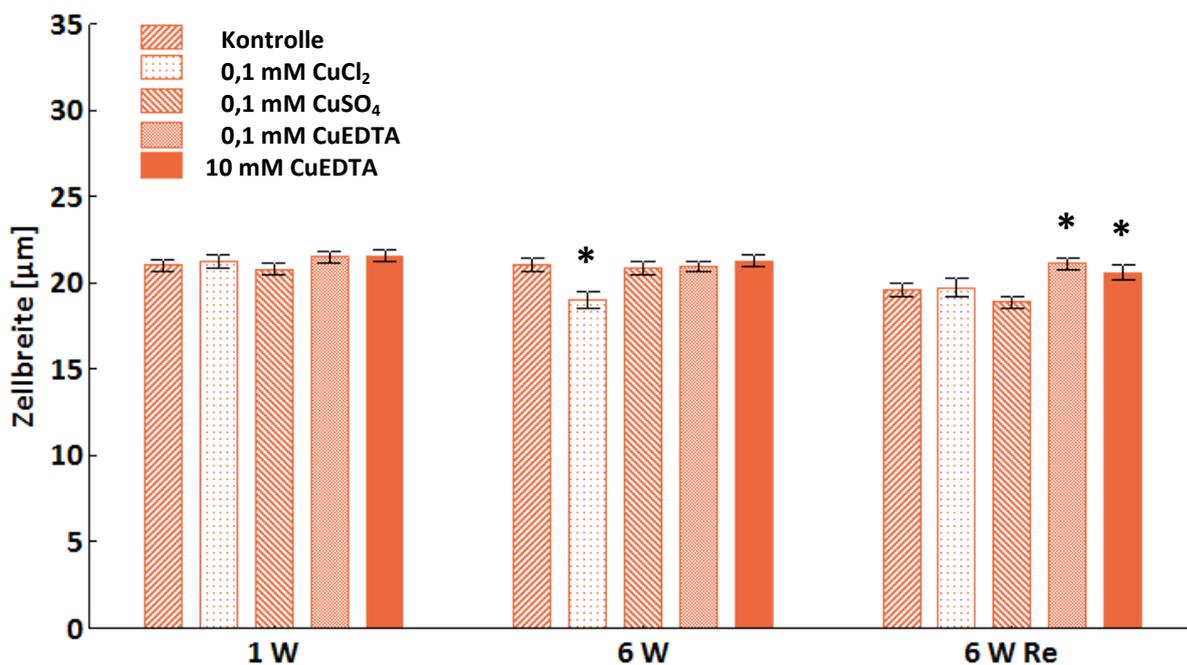


Abb. 10: Die durchschnittlichen Zellbreiten von *A. patens* in den fünf Ansätzen nach einer (1 W) und sechs Wochen (6 W) sowie nach sechs Wochen Regeneration (6W Re); Fehlerbalken = 2x SE, * zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle ($p < 0,05$)

3.3.2 *Mielichhoferia elongata*

Zelllängen: *M. elongata* zeigte nach der ersten Woche bei den Zelllängen kaum Unterschiede (Abb. 11). Die Werte der mittleren Längen waren gleichmäßig um den Kontrollansatz (67,7 μm) verteilt und reichten von 65,0 μm im 0,1 mM CuEDTA Ansatz bis zu 71,7 μm im CuCl_2 Ansatz. Nach sechs Wochen besaßen die Kontrollzellen und die Zellen auf CuCl_2 die niedrigsten Werte mit 68,6 μm bzw. 70,8 μm . Die restlichen Ansätze waren signifikant höher ($p < 0,001$). Sie erreichten Werte von 79,7 μm auf 10 mM CuEDTA bis hin zu 83,5 μm auf CuSO_4 . Nach der Regeneration hatte der 10 mM CuEDTA-Ansatz mit 76,7 μm die signifikant längsten Zellen gegenüber der Kontrolle ($p < 0,001$). Die restlichen Ansätze lagen niedriger und befanden sich im Bereich von 69,8 μm (CuCl_2) bis 72,8 μm (0,1 mM CuEDTA). Bis auf die Kontrolle, die von 68,6 μm auf 70,3 μm stieg, verkürzten sich bei *M. elongata* die Zellen bei allen Kupferansätzen in der Regeneration.

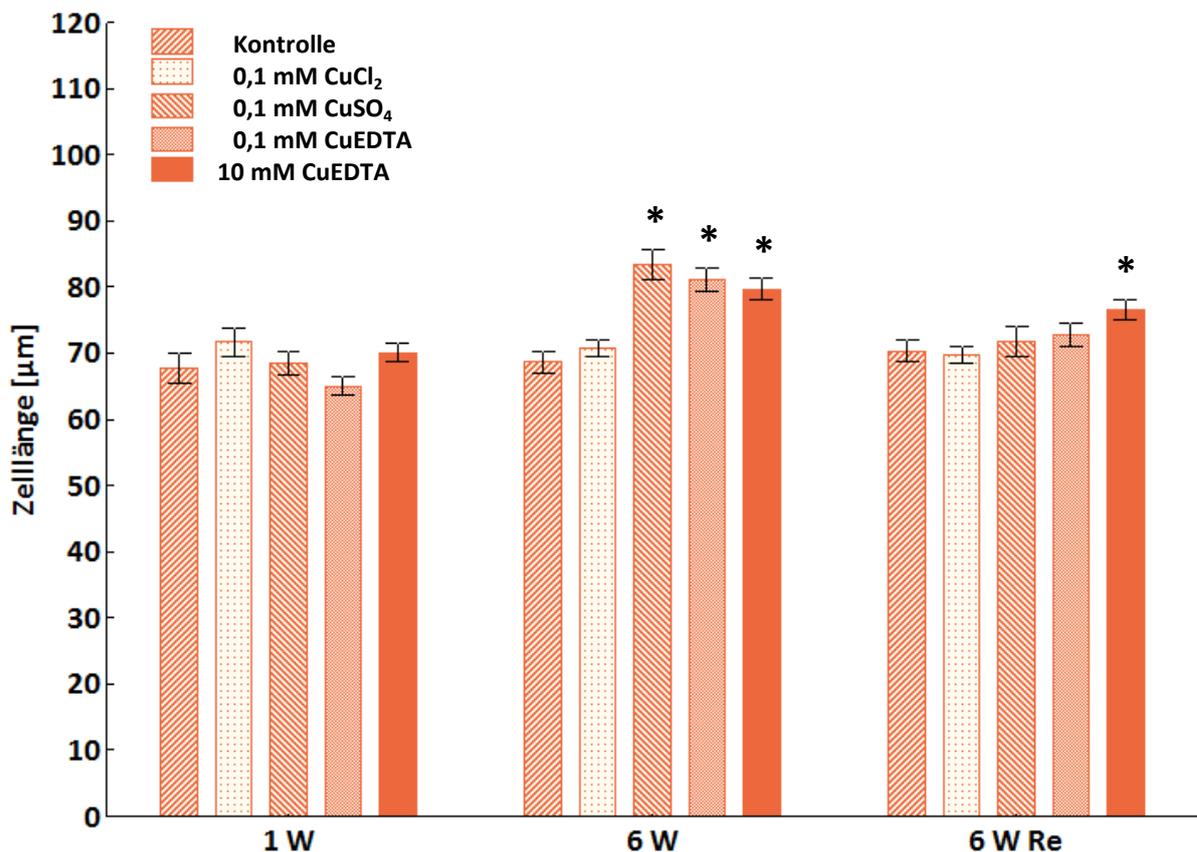


Abb. 11: Die durchschnittlichen Zelllängen von *M. elongata* in den fünf Ansätzen nach einer (1 W) und sechs Wochen (6 W) sowie nach sechs Wochen Regeneration (6W Re); Fehlerbalken = 2x SE, * zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle ($p < 0,05$)

Zellbreiten: In der ersten Woche zeigten sich bei den Zellbreiten von *M. elongata* größere Unterschiede als bei den Zelllängen (Abb. 12). Gegenüber der Kontrolle mit 12,1 μm lagen die Werte auf CuCl_2 und CuSO_4 mit 13,3 bzw. 13,2 μm signifikant höher ($p < 0,001$), jene der CuEDTA Ansätze waren mit 11,4 μm (0,1 mM, $p < 0,05$) und 11,6 μm (10 mM) hingegen deutlich niedriger. Nach sechs Wochen blieben nur die Breiten der auf CuSO_4 gewachsenen Zellen konstant auf 13,2 μm . Die Zellbreiten der restlichen Ansätze stiegen auf Werte zwischen 12,0 μm (0,1 mM CuEDTA) und 13,9 μm (CuCl_2), wobei beide signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zur Kontrolle (13,0 μm) zeigten. Die auf 10 mM CuEDTA Medium gezogenen Zellen (12,9 μm) hatten den stärksten Zuwachs der Zellbreiten zu verzeichnen. Die Regeneration von sechs Wochen führte bei der Kontrolle sowie beim CuCl_2 und CuSO_4 Medium zu einem Rückgang der Zellbreiten. Die Werte lagen bei der Kontrolle bei 12,3 μm bzw. bei 13,0 μm in den mit Kupfer versetzten Medien. Bei den CuEDTA -Ansätzen stiegen die Zellbreiten hingegen stark an und erreichten im Fall der 0,1 mM Konzentration 13,1 μm und bei der 10 mM Konzentration sogar 14,4 μm . Im Vergleich zur Kontrolle waren die Zellbreiten auf allen kupferbehandelten Medien signifikant größer (CuSO_4 , $p < 0,01$; restl. Ansätze, $p < 0,001$).

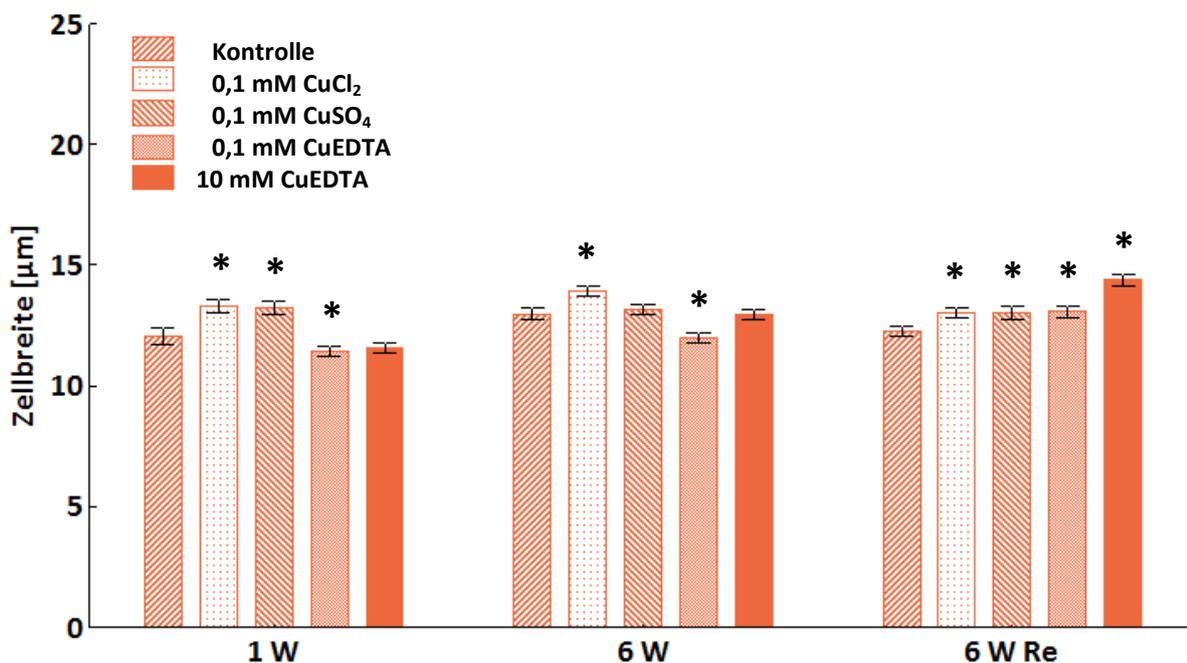


Abb. 12: Die durchschnittlichen Zellbreiten von *M. elongata* in den fünf Ansätzen nach einer (1 W) und sechs Wochen (6 W) sowie nach sechs Wochen Regeneration (6W Re); Fehlerbalken = 2x SE, * zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle ($p < 0,05$)

3.3.3 *Pohlia drummondii*

Zelllängen: Die einwöchigen Blätter von *P. drummondii* zeigten gegenüber der Kontrolle kleinere Zellen (Abb. 13). Auf CuSO_4 und auf 0,1 mM CuEDTA Medium lagen die Werte mit 74,8 μm leicht bzw. 70,8 μm deutlich ($p < 0,01$) unter denen der Kontrolle von 76,3 μm . Dem gegenüber waren die Zellen des CuCl_2 und des 10 mM CuEDTA Ansatzes signifikant kürzer ($p < 0,001$) und lagen bei 57,8 μm bzw. 57,3 μm . Nach sechs Wochen verkürzten sich die Zellen in der Kontrolle und auf CuSO_4 weiter auf 71,6 μm und 69,7 μm . Die Zellen der restlichen Ansätze verlängerten sich hingegen stark. So erhöhten sich diese im CuCl_2 und 10 mM CuEDTA Ansatz auf ein ähnliches Niveau und erreichte in beiden Fällen 69,1 μm . Die Zelllänge der 0,1 mM CuEDTA Konzentration stieg auf den höchsten Wert von 79,8 μm und war damit auch signifikant größer als die Kontrolle ($p < 0,001$). Nach der Regeneration besaß die Kontrolle die kürzesten Zellen mit durchschnittlich 69,9 μm . Alle anderen Ansätze zeigten längere Zellen. Die längsten Zellen waren auf 10 mM CuEDTA mit 86,6 μm zu finden. Die restlichen Ansätze lagen im Bereich von 79,6 μm (CuCl_2) und 73,2 μm (CuSO_4). Die Unterschiede zur Kontrolle waren in der CuCl_2 , 0,1 mM CuEDTA und 10 mM CuEDTA Behandlung signifikant ($p < 0,001$).

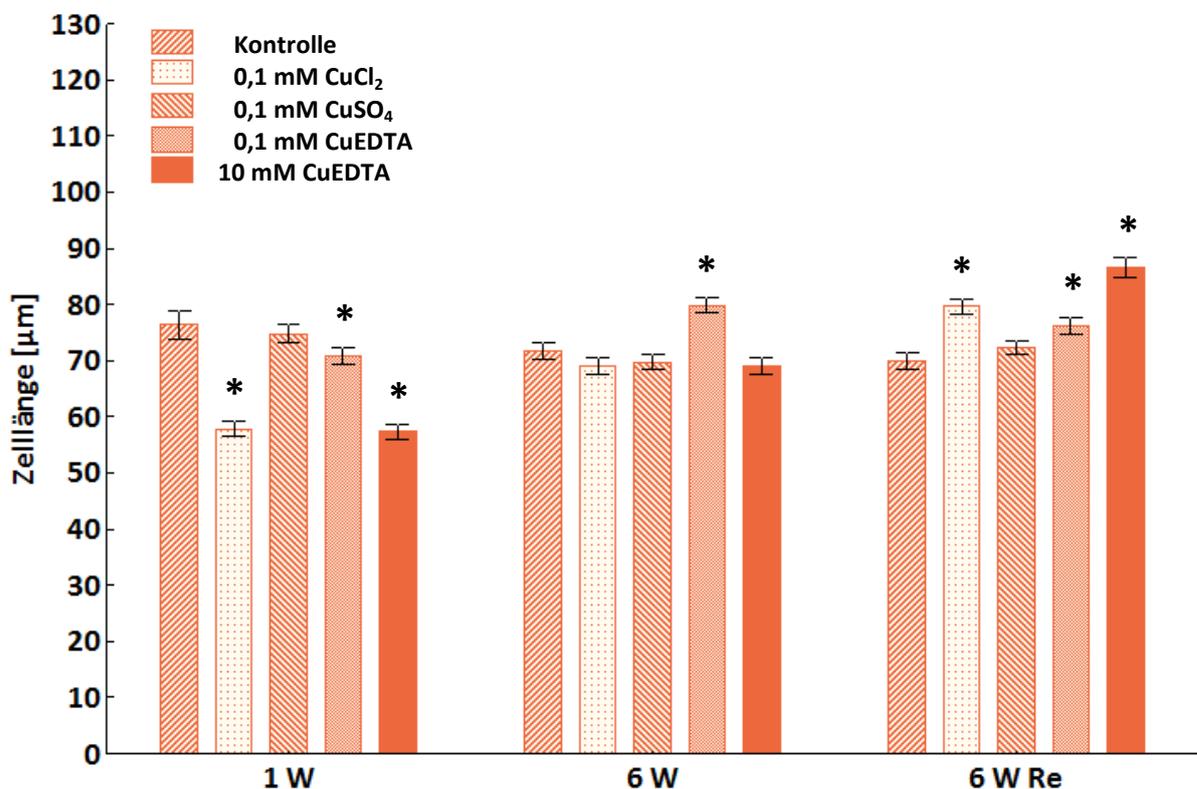


Abb. 13: Die durchschnittlichen Zelllängen von *P. drummondii* in den fünf Ansätzen nach einer (1 W) und sechs Wochen (6 W) sowie nach sechs Wochen Regeneration (6W Re); Fehlerbalken = 2x SE, * zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle ($p < 0,05$)

Zellbreiten: Nach der ersten Woche zeigten die Zellbreiten der Kontrolle und des CuCl₂ Ansatzes die kleinsten Werte mit 9,9 µm bzw. 9,7 µm (Abb. 14). Der höchste Wert war auf CuSO₄ mit 13,5 µm zu finden (p<0,001). Die Zellbreiten der CuEDTA-Ansätze waren leicht höher und lagen bei 10,8 µm in der 0,1 mM Konzentration (p<0,001) und 10,3 µm in der 10 mM Konzentration. Nach sechs Wochen wurden auf CuSO₄ und auf 10 mM CuEDTA signifikant breitere Zellen (p<0,001) mit 12,3 µm bzw. 12,4 µm gemessen. Der 0,1 mM CuEDTA-Ansatz besaß hingegen signifikant schmalere Zellen (p<0,001) deren Breite einen Wert von 10,5 µm erreichte. Auf Kontrollmedium und auf CuCl₂ lagen die Werten mit 11,2 µm bzw. 11,3 µm dazwischen. In der Regeneration änderte sich wenig; auch hier waren die Zellen der Kontrolle und des CuCl₂ Ansatzes 11,8 µm bzw. 12,0 µm breit. Die CuSO₄ Behandlung bewirkte mit 12,6 µm signifikant breitere Zellen und die 0,1 mM CuEDTA Behandlung mit 10,5 µm wieder signifikant schmalere Zellen (p<0,001). Die Zellbreiten der 10 mM Konzentration (11,9 µm) lagen hingegen auf dem Niveau der Kontrolle.

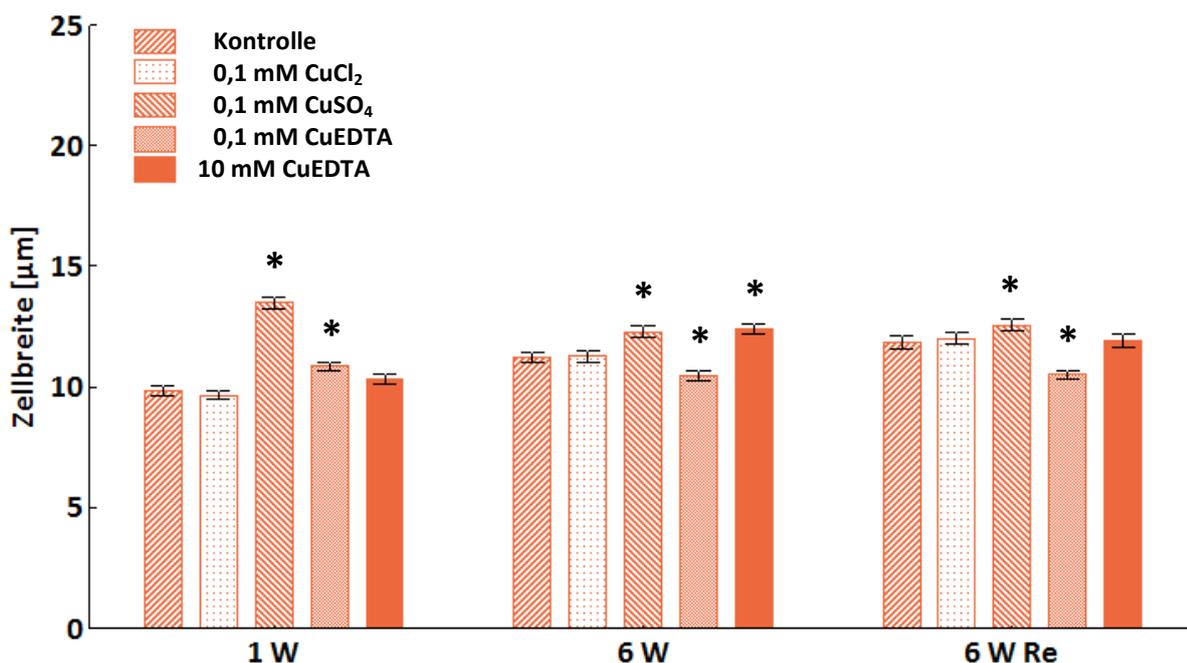


Abb. 14: Die durchschnittlichen Zellbreiten von *P. drummondii* in den fünf Ansätzen nach einer (1 W) und sechs Wochen (6 W) sowie nach sechs Wochen Regeneration (6W Re); Fehlerbalken = 2x SE, * zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle (p<0,05)

4 Ergebnisse - Physiologie

4.1 Zunahme von Chl *a* nach Regeneration in CuEDTA

Die Bestimmung des Chl *a/b*-Verhältnisses erfolgte durch die Extraktion des Chlorophylls mit Hilfe von Aceton und Benzin. Mit dem gewonnenen Verhältnis kann auf den physiologischen Zustand der Pflanze geschlossen werden. Wenn diese mehr Stress zeigt, dann sinkt das Chl *a/b*-Verhältnis, d.h. es wird relativ mehr Chl *b* als Chl *a* gemessen.

Der Vergleich der Chl *a/b*-Verhältnisse bei *A. patens* zeigte in der ersten Woche nach CuCl₂ und CuSO₄ Behandlung eine leichte Verschiebung zu Chl *b*, während bei den CuEDTA Behandlungen das Verhältnis leicht zum Chl *a* tendierte. *M. elongata* wies hingegen auf CuSO₄ einen stärkeren Anstieg des Chl *a/b*-Verhältnisses auf. In beiden CuEDTA Konzentrationen war das Verhältnis ungefähr gleich zur Kontrolle. Bei *P. drummondii* lag das Chl *a/b*-Verhältnis bei allen Kupferbehandlungen auf dem Wert der Kontrolle.

Nach sechs Wochen Kupferbehandlung erreichten die Verhältnisse in den CuCl₂/CuSO₄ Ansätzen sowie in den CuEDTA Behandlungen bei *A. patens* gleich hohe Werte wie die Kontrolle. Bei *M. elongata* waren die Chl *a/b*-Verhältnisse auf CuCl₂ und CuSO₄ ebenfalls gleich wie in der Kontrolle. Hingegen verschoben sich die Verhältnisse nach CuEDTA Behandlung etwas zu mehr Chl *b*. *P. drummondii* wies nur auf CuSO₄ einen etwas niedrigeren Wert des Chl *a/b*-Verhältnisses auf. Die Werte auf CuCl₂ und beiden CuEDTAs waren gleich gegenüber der Kontrolle.

Nach der Regeneration hatten sich die Werte von *A. patens* auf CuCl₂ und CuSO₄ nicht verändert, doch waren die Chl *a/b*-Verhältnisse der CuEDTA-Ansätze stärker gestiegen. Besonders die 10 mM Konzentration war mehr zum Chl *a* verschoben als die Kontrolle. *M. elongata* zeigte bei den Cl₂/SO₄ Verbindungen nur auf CuCl₂ eine leichte Verschiebung zu Chl *b*. Die Chl *a/b*-Verhältnisse in den CuEDTA Ansätzen stiegen dagegen stärker an. Bei *P. drummondii* waren die Werte der CuSO₄ Behandlung leicht zum Chl *b* verschoben. Wie bei den anderen Moosarten tendierte auch hier das Verhältnis der CuEDTA-Ansätze zu mehr Chl *a*.

4.1.1 *Aphanorhegma patens*

In *A. patens* zeigte das Chl *a/b*-Verhältnis einen ähnlichen Verlauf in allen fünf Ansätzen (Abb. 15). In der ersten Woche waren die Verhältnisse in 10 mM und 0,1 mM CuEDTA gegenüber der Kontrolle (2,11:1) höher und erreichten 2,24:1 bzw. 2,15:1. Das Chl *a/b*-Verhältnis in den CuCl₂ und der CuSO₄ Medien sank hingegen mit 1,96:1 bzw. 1,99:1 unter das Verhältnis der Kontrolle. Nach sechs Wochen sanken die Werte der Ansätze auf 1,93:1 (CuSO₄) bis 1,78:1 (CuEDTA 10 mM). Nach der sechswöchigen Regeneration blieben die Verhältnisse weitgehend konstant, wobei die Kontrolle den niedrigsten Wert (1,78:1) und der 10 mM CuEDTA-Ansatz den höchsten Wert (1,95:1) erreichte. Nur nach CuEDTA Behandlung bewirkte die Regeneration einen Anstieg des Chl *a/b*-Verhältnisses gegenüber den sechs Wochen mit Kupfer. Allerdings konnten die Veränderungen nicht signifikant nachgewiesen werden.

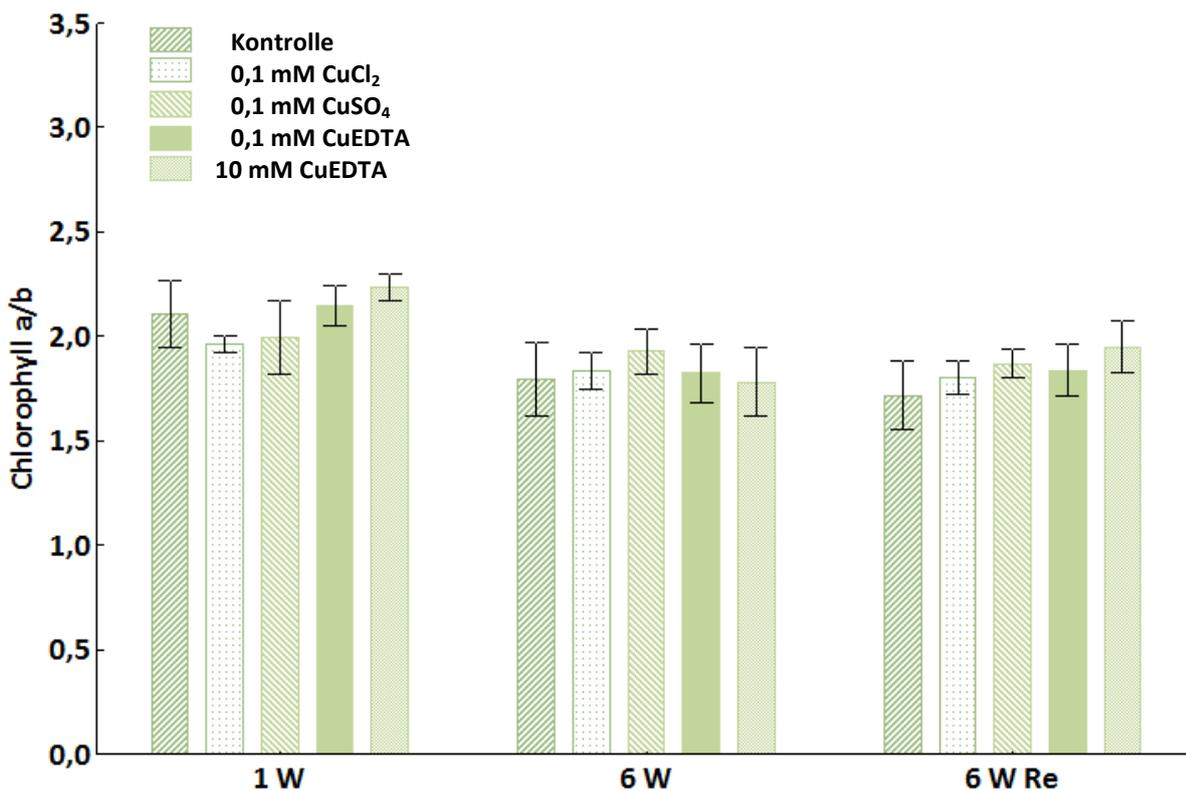


Abb. 15: Die durchschnittlichen Chl *a/b*-Verhältnisse von *A. patens* in den fünf Ansätzen nach einer (1 W) und sechs Wochen (6 W) sowie nach sechs Wochen Regeneration auf Kontrollmedium (6 W Re); Fehlerbalken = 2x SE

4.1.2 *Mielichhoferia elongata*

Bei *M. elongata* waren die Chl *a/b*-Verhältnisse des CuCl_2 Ansatzes (1,94:1) und der Kontrolle (1,97:1) nach einer Woche am niedrigsten (Abb. 16). Auf CuSO_4 erreichte das Verhältnis den höchsten Wert mit 2,27:1 und war damit höher als die auf CuCl_2 gezogenen Pflänzchen. Die Werte der CuEDTA Ansätze befanden sich dazwischen und erreichten ein Verhältnis von 2,09 (0,1 mM) bzw. 2,05 (10 mM). Nach sechs Wochen stiegen die Chl *a/b*-Verhältnisse der CuCl_2 Behandlung und bei der Kontrolle an; auf Werte von 2,25:1 und 2,27:1. Auf CuSO_4 maß das Chl *a/b*-Verhältnis 2,39:1. Die Chl *a/b* Werte der beiden CuEDTA Ansätze stiegen hingegen nur minimal auf 2,13:1 (0,1 mM) bzw. 2,08:1 (10 mM). Nach der Regeneration wurde aus dem 0,1 mM und dem 10 mM CuEDTA Ansatz ein Verhältnis von 2,32:1 bzw. 2,36:1 berechnet. Diese Werte waren deutlich höher als auf CuCl_2 , ($p < 0,05$) bei dem das Verhältnis auf 1,87:1 sank. Die Messungen der Kontrolle und der CuSO_4 -Behandlung ergaben ebenfalls ein gesunkenes Chl *a/b*-Verhältnis von 2,00:1 bzw. 1,98:1.

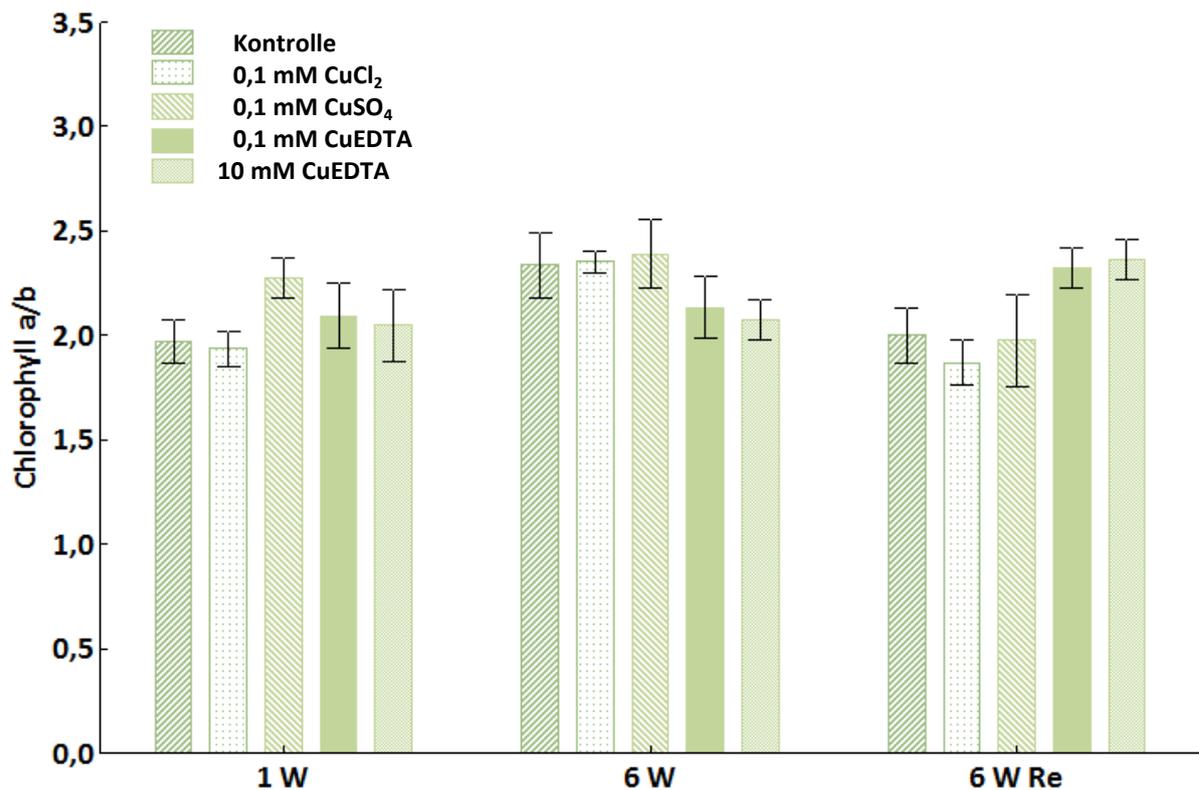


Abb. 16: Die durchschnittlichen Chl *a/b*-Verhältnisse von *M. elongata* in den fünf Ansätzen nach einer (1 W) und sechs Wochen (6 W) sowie nach sechs Wochen Regeneration auf Kontrollmedium (6 W Re); Fehlerbalken = 2x SE

4.1.3 *Pohlia drummondii*

P. drummondii zeigte nach einer Woche starke Schwankungen in den einzelnen Chl *a/b*-Verhältnissen (Abb. 17). Am Höchsten lag der Wert bei der Kontrolle mit 2,02:1. Die restlichen Ansätze lagen darunter zwischen 1,85:1 (10 mM CuEDTA) und 1,94:1 (CuCl₂). Nach sechs Wochen lagen die Werte der Kontrolle, der CuCl₂ und der 10 mM CuEDTA Behandlung fast gleichauf bei 1,99:1, 1,99:1 bzw. 2,00:1. Der CuSO₄ und der 0,1 mM CuEDTA Ansatz erreichten niedrigere Verhältnisse von 1,88:1 und 1,95:1. Nach der Regeneration lagen die Chl *a/b*-Verhältnisse in allen Ansätzen um die Werte während der Kupferbehandlung. Nur die Verhältnisse beider CuEDTA Behandlungen stiegen leicht auf 2,20:1 (0,1 mM) und 2,23:1 (10 mM). Die Messungen aus den anderen beiden Kupferbehandlungen zeigten Verhältnisse von 1,95:1 (CuSO₄) und 2,07:1 (CuCl₂). Somit ergab sich entlang des ganzen Versuchs bei *P. drummondii* keine signifikanten Änderungen in den Chl *a/b*-Verhältnissen.

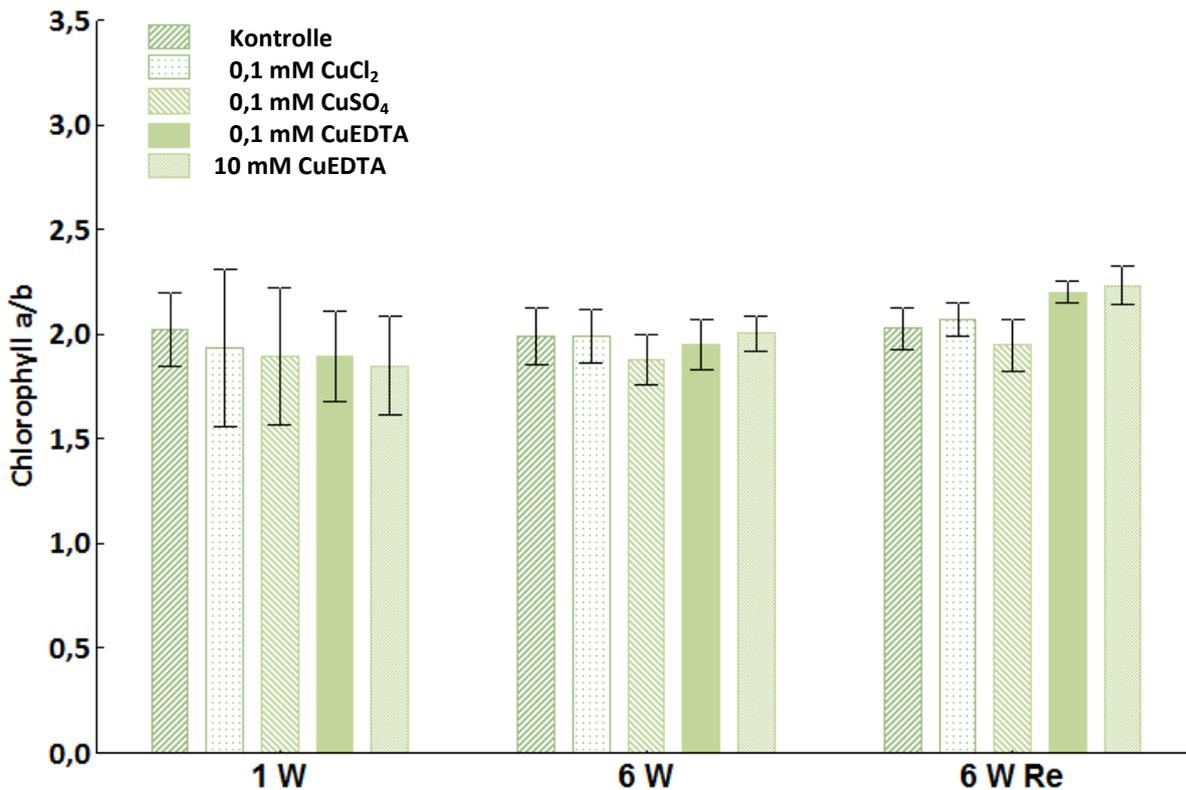


Abb. 17: Die durchschnittlichen Chl *a/b*-Verhältnisse von *P. drummondii* in den fünf Ansätzen nach einer (1 W) und sechs Wochen (6 W) sowie nach sechs Wochen Regeneration auf Kontrollmedium (6 W Re); Fehlerbalken = 2x SE

4.2 Erhöhte Superoxid-Bildung im nicht angepassten Moos *A. patens*

Zum Nachweis von O_2^- -Anionen kann Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) verwendet werden. Sobald das gelbe NBT mit dem Superoxid reagiert, bildet sich eine nicht-wasserlöslicher blaue Verbindung (Formazan).

Bei *A. patens* war generell der Spitzenbereich stärker gefärbt als der Basisbereich (Abb. 18A). Bei *M. elongata* zeigte sich dagegen mehr Färbung an der Basis (Abb. 18: B). *P. drummondii* hatte im Vergleich zu den anderen Moosarten sehr wenig Färbung und zeigte auch keinen einheitlichen Trend.

Gegenüber der Kontrolle war bei allen drei Moosarten die Basis im $CuCl_2$ und im $CuSO_4$ Ansatz weniger gefärbt. Hingegen war der Spitzenbereich bei *A. patens* und *P. drummondii* nach der $CuCl_2$ Behandlung stärker gefärbt als die Kontrolle. *M. elongata* zeigte in der Spitze eine sehr ähnliche Färbung wie die Kontrolle. Die Behandlung mit $CuSO_4$ führte bei *A. patens* im Spitzenbereich zu einer starken Abnahme der NBT-Färbung, während bei den angepassten Moosarten die Färbung gleich der Kontrolle war.

Auf CuEDTA gewachsene Pflänzchen von *A. patens* zeigten fast die gleiche Färbung wie in der Kontrolle (Abb. 18A). Anders war es bei *M. elongata*, wo nach CuEDTA Behandlung die meiste Färbung zu finden war; sowohl an der Basis als auch in der Spitze. *P. drummondii* von CuEDTA-Platten zeigte dagegen kaum eine Färbung mit NBT (Abb. 18C).

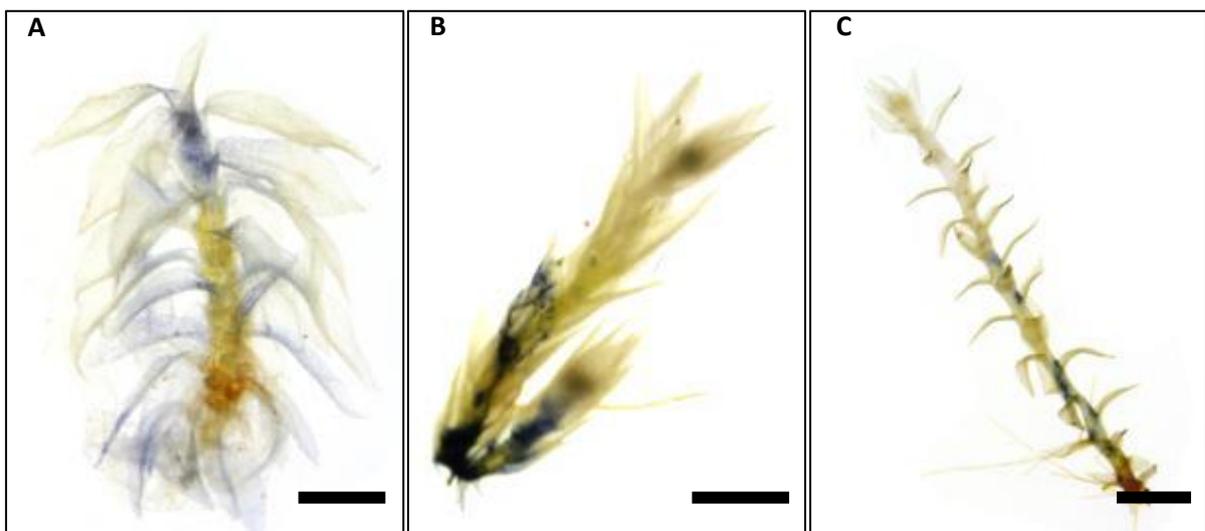


Abb. 18: NBT-Färbung der verschiedenen Moosarten im Hellfeld A) *A. patens*: 10 mM CuEDTA-Ansatz, B) *M. elongata*: $CuCl_2$ -Ansatz, C) *P. drummondii*: 10 mM CuEDTA-Ansatz; Messbalken = 500 μm

4.2.1 *Aphanorhegma patens*

A. patens zeigte nach der NBT-Färbung eine generell stärkere Anfärbung des Spitzenbereichs des Stämmchens (Abb. 19). In der Kontrolle waren in der Basis 32,0% des Pflanzengewebes gefärbt und in der Spitze 58,0%. Beim CuCl_2 und beim CuSO_4 Ansatz waren im Basisbereich jeweils schwache Färbungen sichtbar, welche bei 6,3% bzw. 5,7% lagen. Die Spitzenbereiche waren hingegen sehr unterschiedlich gefärbt und lagen bei der CuCl_2 Behandlung mit 65,6% sogar über der Kontrolle und bei der CuSO_4 Behandlung mit 17,8% stark darunter. Bei Stämmchen aus dem 10 mM CuEDTA Ansatz war gegenüber der Kontrolle der geringste Unterschied in der Färbung festzustellen. Hier erreichte die Basis eine Färbung von 32,1% und die Spitze 49,6%.

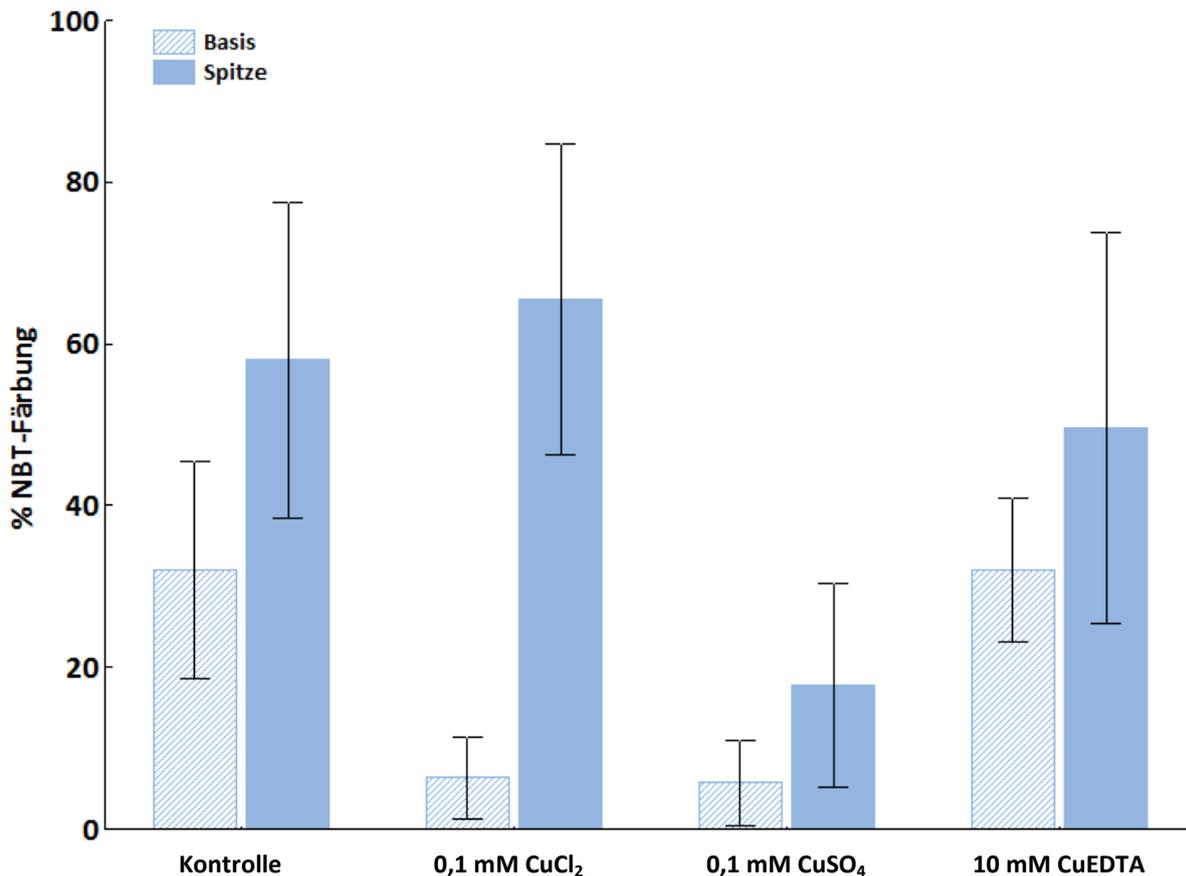


Abb. 19: NBT-Färbung an der Basis und der Spitze des Stämmchens in *A. patens*; Kontrolle und Stämmchen aus 0,1 mM CuCl_2 , 0,1 mM CuSO_4 und 10 mM CuEDTA -Platten; Fehlerbalken = 2x SE

4.2.2 *Mielichhoferia elongata*

Im Gegensatz zu *A. patens* führte die Färbung mit NBT bei *M. elongata* in allen untersuchten Ansätzen zu einer stärkeren Anfärbung der Basis als der Spitze des Stämmchens (Abb. 20). Bei der Kontrolle lag der gefärbte Anteil in der Basis bei 42,5% und in der Spitze nur bei 10,9%. Die Färbungen der Basis nach CuCl_2 und CuSO_4 Behandlung waren geringer als in der Kontrolle und lagen bei 34,1%, bzw. 15,9%. In den Spitzenbereichen waren die Färbungen auf einem ähnlichen Niveau wie in der Kontrolle und lagen beim CuCl_2 Ansatz bei 13,0% und beim CuSO_4 Ansatz bei 9,0%. Auf 10 mM CuEDTA Medien war die Färbung mit NBT deutlich stärker und erreichte in der Basis einen Wert von 77,9% (signifikant gegenüber der Kontrolle; $p < 0,01$) und in der Spitze 67,7%.

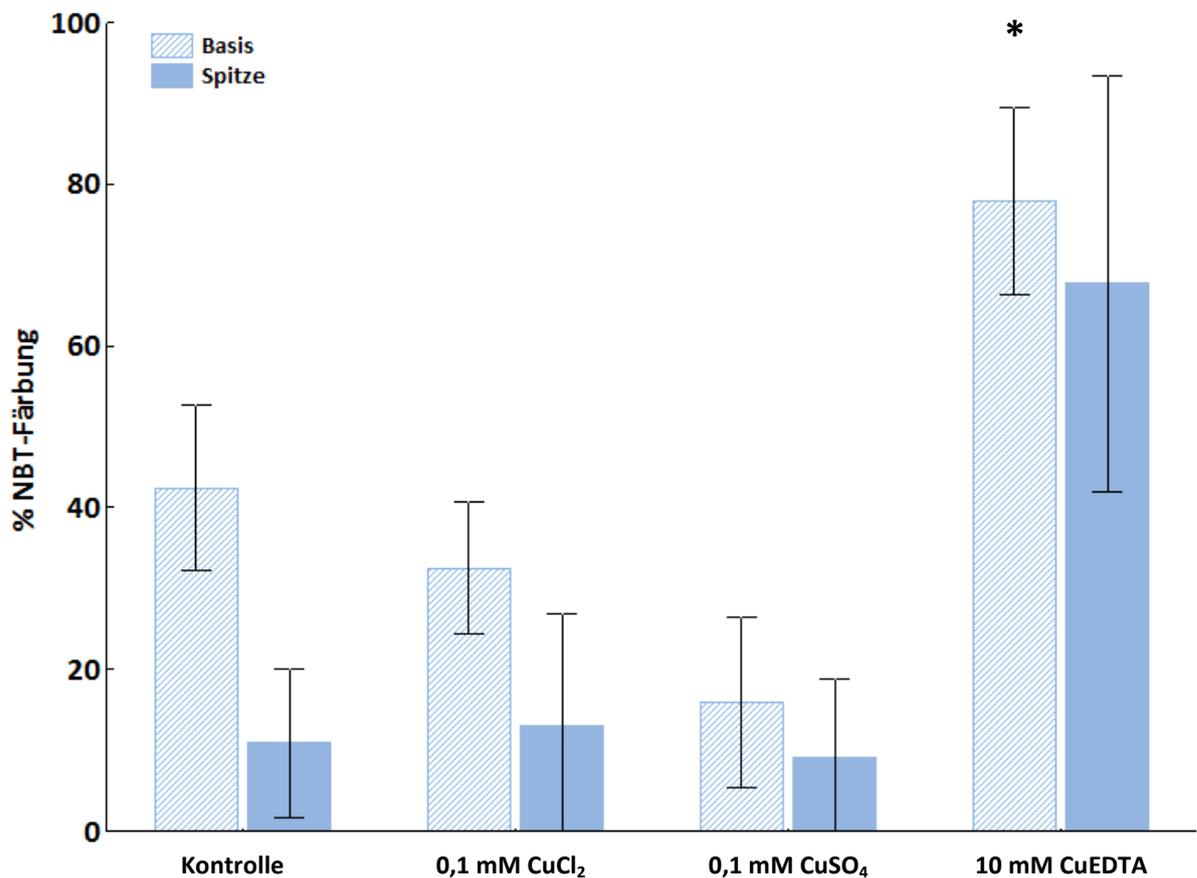


Abb. 20: NBT-Färbung an der Basis und der Spitze des Stämmchens in *M. elongata*; Kontrolle und Stämmchen aus 0,1 mM CuCl_2 , 0,1 mM CuSO_4 und 10 mM CuEDTA-Platten; Fehlerbalken = 2x SE, * zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle ($p < 0,05$)

4.2.3 *Pohlia drummondii*

Bei *P. drummondii* war die Färbung in allen Ansätzen sehr schwach (Abb. 21). Die Kontrolle war an der Basis zu 14,6% und in der Spitze zu 4,3% gefärbt. Beim CuCl_2 Ansatz kehrte sich der Trend um: die Basis erreichte einen Wert von 5,4% und die Spitze 17,6%. Der CuSO_4 Ansatz war in der Basis noch weniger gefärbt und erreichte mit 1,9% einen signifikant kleineren Wert ($p < 0,05$) als die Kontrolle. Die Spitze war mit 4,8% fast gleich gefärbt wie die Kontrolle. Die Stämmchen des 10 mM CuEDTA Ansatzes waren gleichmäßig gering gefärbt mit an der Basis 4,3% und in der Spitze 3,4%.

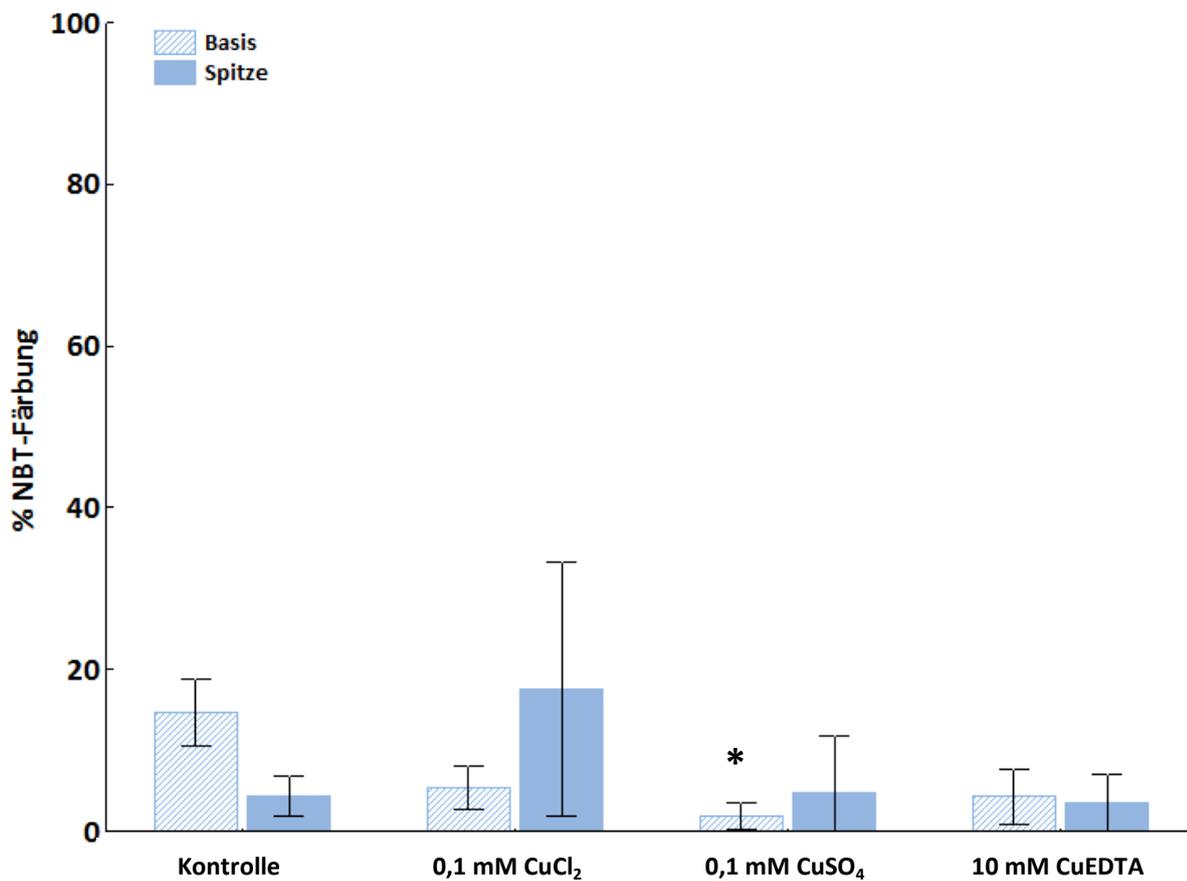


Abb. 21: NBT-Färbung an der Basis und der Spitze des Stämmchens in *P. drummondii*; Kontrolle und Stämmchen aus 0,1 mM CuCl_2 , 0,1 mM CuSO_4 und 10 mM CuEDTA -Platten; Fehlerbalken = $2 \times \text{SE}$, * zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle ($p < 0,05$)

4.3 Starke Bildung von H₂O₂ in der CuSO₄ Behandlung von *A. patens*

Zur Färbung des H₂O₂ wird 3,3-Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Diese Lösung reagiert mit endogenen Peroxidasen und bildet einen braunen wasserunlöslichen Farbkomplex.

Generall waren die Basisbereiche von *M. elongata* und *P. drummondii* in allen Ansätzen stärker gefärbt als die Spitzenbereiche, was bei *A. patens* nicht überall der Fall war.

Die Beigabe von CuCl₂ ins Medium führte bei allen drei Moosarten zu einer stärkeren Färbung des Spitzenbereiches verglichen mit den Kontrollpflänzchen. Bei *P. drummondii* war auf CuCl₂ Platten sowohl in der Basis als auch in der Spitze überhaupt die stärkste Färbung zu finden (Abb. 22C).

Beim CuSO₄ Ansatz von *A. patens* war die Färbung mit DAB am stärksten und erreichte sowohl an der Basis als auch in der Spitze über 90%. In den Kupfer angepassten Moosen waren hingegen auf CuSO₄ beide Bereiche der Kontrolle sehr ähnlich, d.h. leichte Färbung an der Basis und kaum Färbung in der Spitze (Abb 22B).

Die CuEDTA Behandlung führte bei allen drei Moosarten zu stärkeren DAB-Färbungen als in der Kontrolle. Bei *A. patens* wurden gleich wie bei bei CuCl₂/CuSO₄ sehr starke Färbungen an der Basis gefunden (Abb. 22A). Bei *M. elongata* bewirkte das CuEDTA von allen Behandlungen die stärkste Färbung. Bei *P. drummondii* war hingegen in diesem Ansatz nur eine leichte Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen.

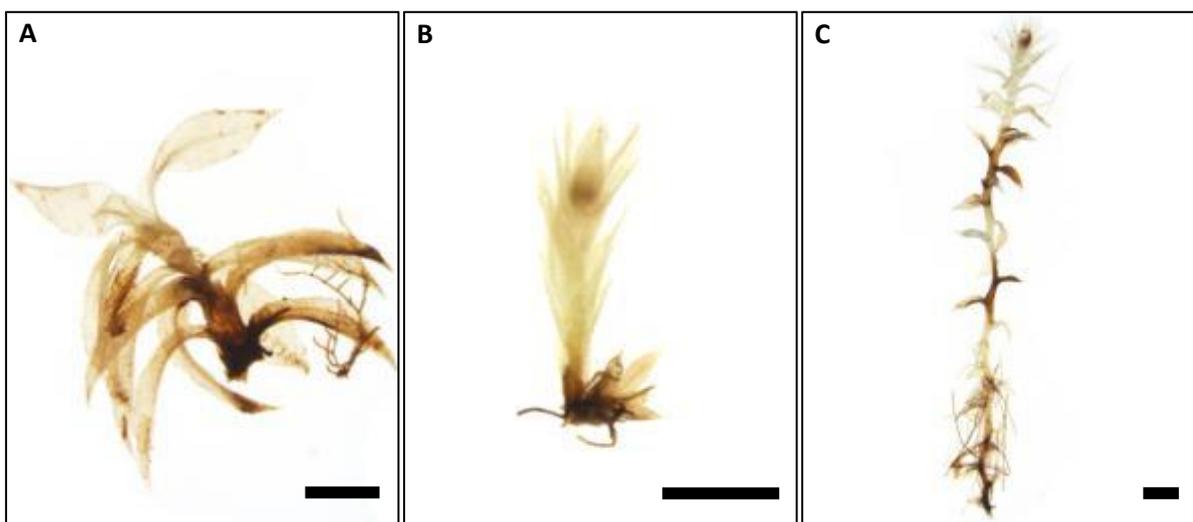


Abb. 22: H₂O₂-Färbung mit DAB im Hellfeld A) *A. patens*: 10 mM CuEDTA-Ansatz, B) *M. elongata*: CuSO₄-Ansatz, C) *P. drummondii*: CuCl₂-Ansatz; Messbalken = 500 µm

4.3.1 *Aphanorhegma patens*

Bei *A. patens* war die Färbung in allen Kupferansätzen stärker als in der Kontrolle (Abb. 23). In Stämmchen der Kontrollplatten war eine Färbung von 52,1% an der Basis und 51,2% in der Spitze zu finden. Der CuCl_2 und der 10 mM CuEDTA Ansatz erreichte in der Basis 89,0% bzw. 92,0% Färbung; in der Spitze hingegen nur 66,5% bzw. 66,2%. Auf CuSO_4 war dagegen in beiden Abschnitten eine sehr starke Färbung zu erkennen und beinahe gleich hohe Werte von 94,7% (Basis) und 93,3% (Spitze) gemessen.

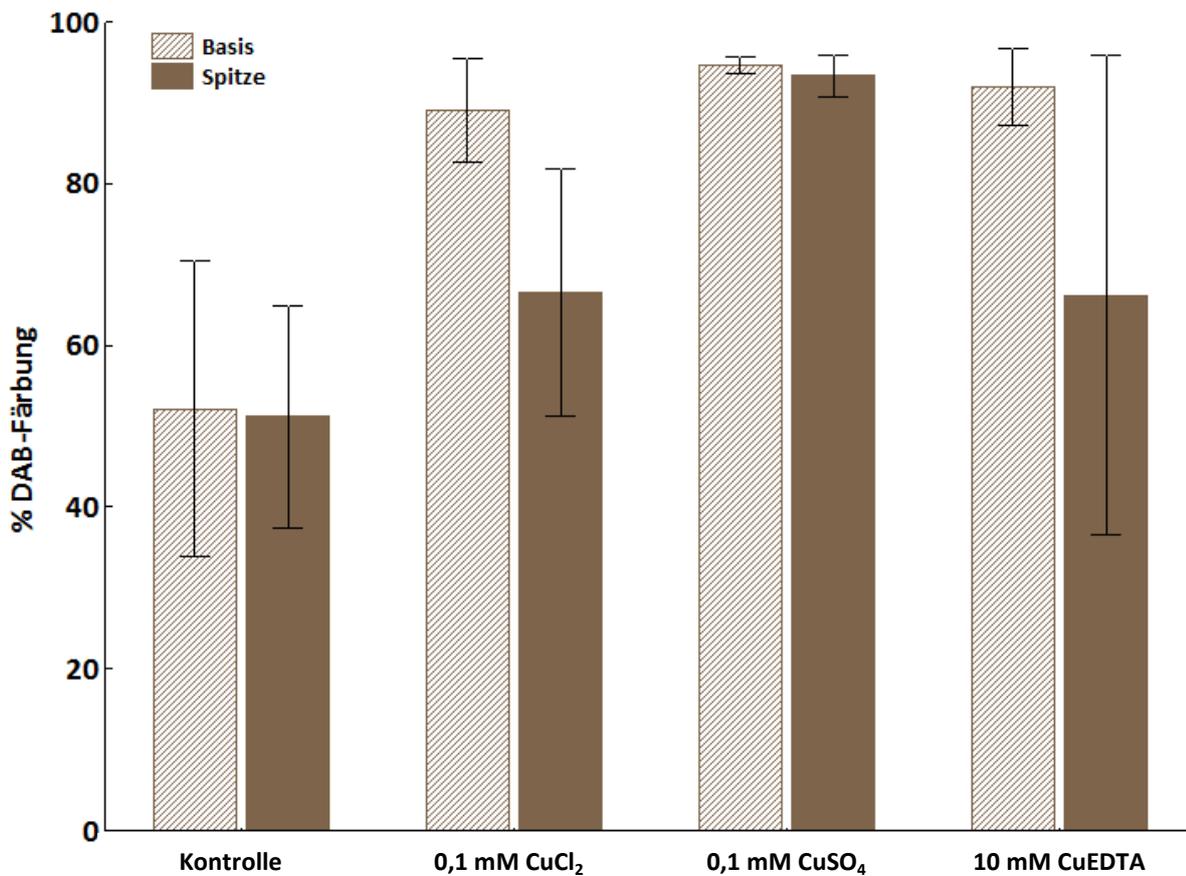


Abb. 23: Vergleich der DAB-Färbung der Basis mit der Spitze des Stämmchens in *A. patens*; Kontrolle und Ansätze mit 0,1 mM CuCl_2 , 0,1 mM CuSO_4 und 10 mM CuEDTA; Fehlerbalken = 2x SE

4.3.2 *Mielichhoferia elongata*

M. elongata zeigte bei der Färbung mit DAB in allen Behandlungen eine stärkere Färbung in der Stämmchenbasis als in der Spitze (Abb. 24). In der Kontrolle, im CuCl_2 und im CuSO_4 Ansatz war eine ungefähr gleichstarke Färbung des Basisbereiches zu erkennen. Die Kontrolle erreichte dabei 26,0% und die Kupferansätze 30,0% bzw. 31,5%. Dagegen lag die Färbung im Spitzenbereich in der Kontrolle und nach CuSO_4 Behandlung sehr niedrig und erreichte Werte von 9,8% bzw. 6,2%. Auf CuCl_2 Platten waren dagegen 21,8% der Stämmchenspitze gefärbt. Der 10 mM CuEDTA Ansatz war gleich wie beim NBT deutlich stärker gefärbt als die Kontrolle. Hier erreichte die Basis 57,5% und die Spitze 40,7%.

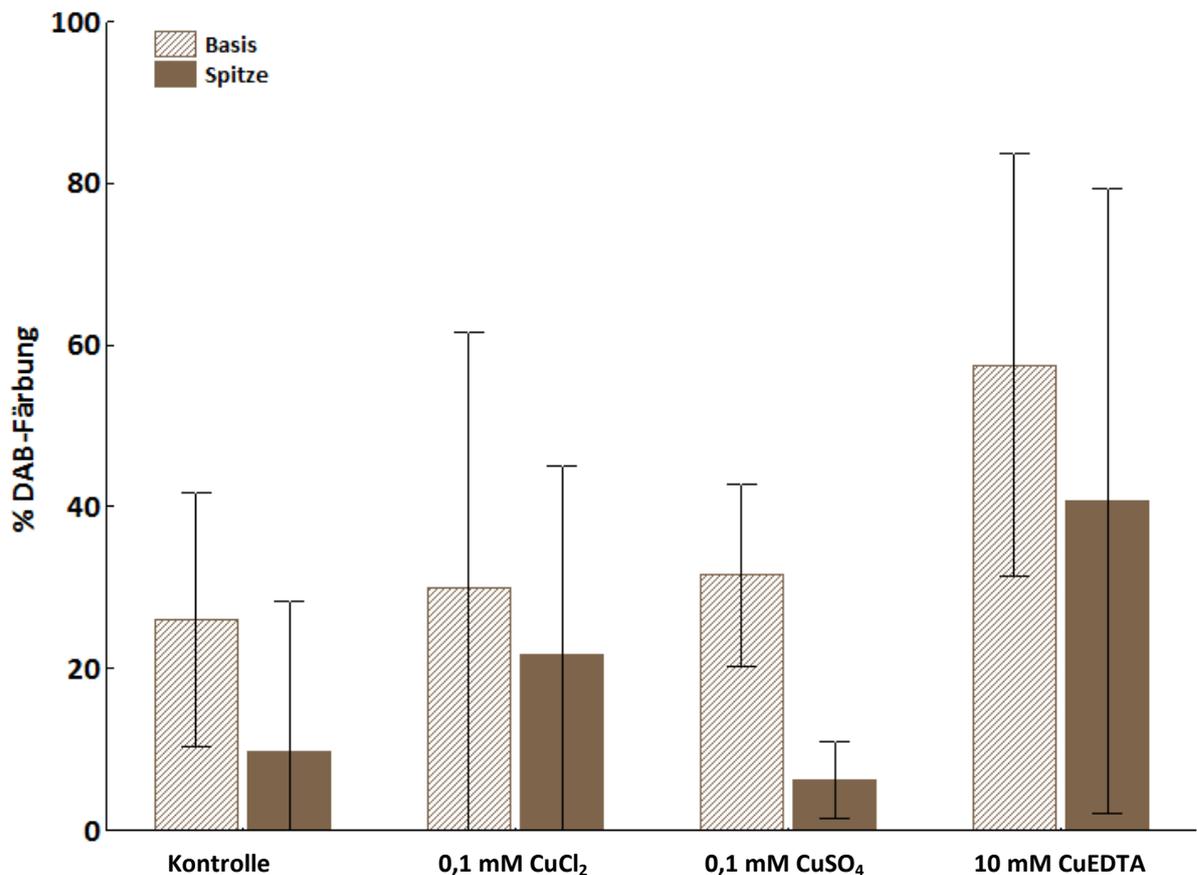


Abb. 24: Vergleich der DAB-Färbung der Basis mit der Spitze des Stämmchens in *M. elongata*; Kontrolle und Ansätze mit 0,1 mM CuCl_2 , 0,1 mM CuSO_4 und 10 mM CuEDTA ; Fehlerbalken = 2x SE

4.3.3 *Pohlia drummondii*

Ähnlich wie bei *M. elongata* bewirkte DAB in den Stämmchen von *P. drummondii* in allen Ansätzen an der Basis eine stärkere Färbung als in der Spitze (Abb. 25). Die Kontrolle war an der Basis zu 32,9% und in der Spitze nur zu 8,0% gefärbt. Nach CuSO_4 und CuEDTA Behandlung waren die Werte ähnlich. Hier erreichten die bodennahen Abschnitte 32,3% bzw. 37,2% und die spitzennahen 15,9 bzw. 19,9%. Im Vergleich dazu waren die Färbungen auf CuCl_2 Medium etwas höher. Die Färbung der Basis lag hier bei 64,2% und die der Spitze bei 36,7%.

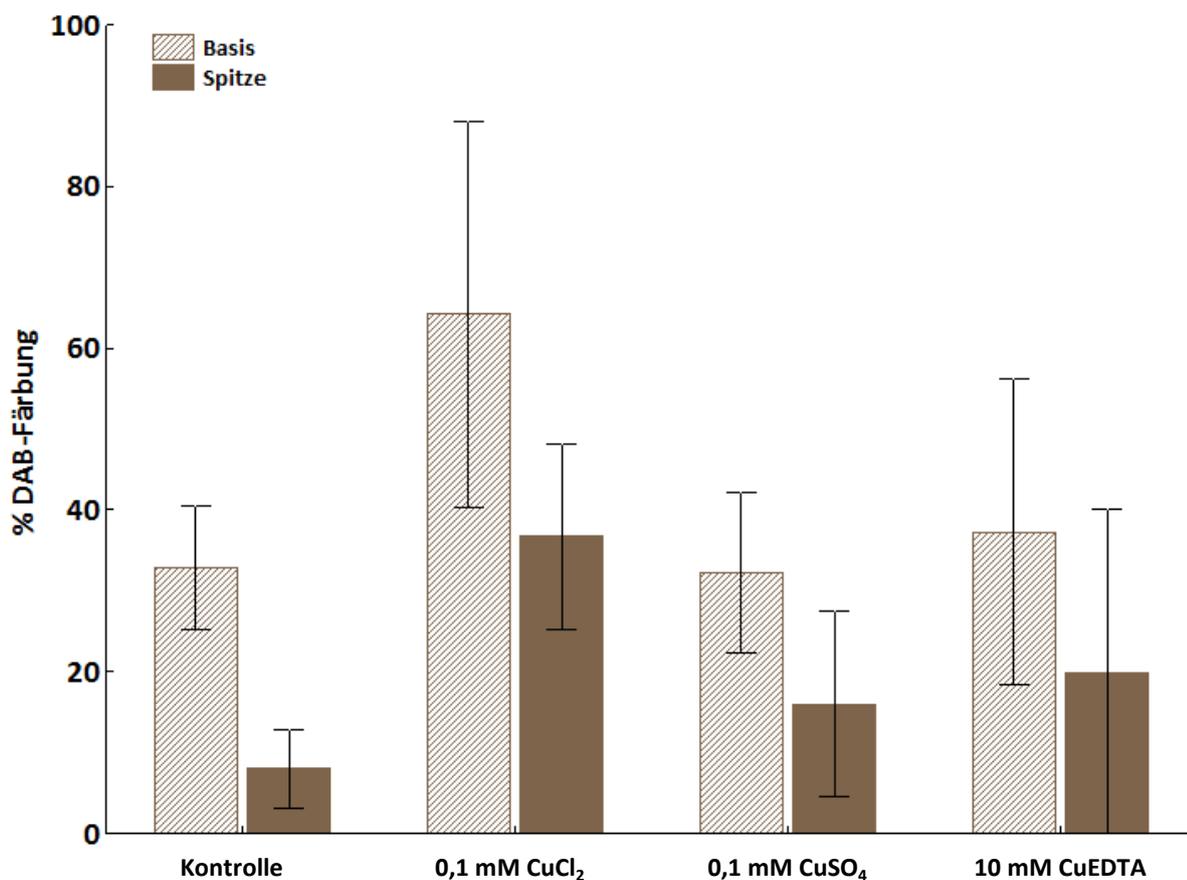


Abb. 25: Vergleich der DAB-Färbung der Basis mit der Spitze des Stämmchens in *P. drummondii*; Kontrolle und Ansätze mit 0,1 mM CuCl_2 , 0,1 mM CuSO_4 und 10 mM CuEDTA; Fehlerbalken = 2x SE

5 Ergebnisse - Aufnahmefähigkeit

5.1 Hohe Kupferanreicherung im Spitzenbereich von *A. patens*

Zur Bestimmung des Kupfergehaltes in den Basis- und Spitzenbereichen wurde ein Rasterelektronenmikroskop mit energiedispersivem Röntgenspektrometer (REM-EDX) verwendet. Damit wurden die einzelnen Elemente in den verschiedenen Stämmchenbereichen (Basis und Spitze) semi-quantitativ gemessen und miteinander verglichen (Abb. 26).

Bei *A. patens* lagen die Kupferwerte des CuCl_2 und des CuSO_4 Ansatzes sowohl in der Basis als auch in der Spitze deutlich über den Werten der Kontrolle. Zwischen den beiden Abschnitten war interessanterweise kein Unterschied festzustellen, was für eine starke Anreicherung und Verteilung des Kupfers über das gesamte Moosstämmchen spricht. Betrachtete man nun die Moosarten *M. elongata* und *P. drummondii* von CuCl_2 und CuSO_4 Medien, so fand man an der Basis weit mehr Kupfer als in der Spitze. Dabei lagen die Kupferwerte in den Spitzen um den Wert der jeweiligen Kontrolle. Bei *M. elongata* war nach CuCl_2 Behandlung in der Basis weniger Kupfer zu finden als nach CuSO_4 Behandlung; bei *P. drummondii* wurde hingegen auf CuCl_2 Medium mehr Kupfer gemessen.

Auf 0,1 mM CuEDTA zeigten die Stämmchen von *A. patens* und *M. elongata* kaum Unterschiede zur Kontrolle. Bei *P. drummondii* waren im Spitzenbereich leicht erhöhte Werte zu finden. Im Gegensatz dazu befand sich nach 10 mM CuEDTA-Behandlung in allen drei Moosarten deutlich stärkere Anreicherung an Kupfer als in der Kontrolle. Die Werte in den Basisbereichen waren bei *A. patens* und *M. elongata* im Mittel ca. drei Mal höher als die der Kontrolle, bei *P. drummondii* nur um das Zweifache. Die Kupfermengen in den Spitzenbereichen lagen noch höher und erreichten bei *A. patens* und *P. drummondii* ungefähr das Doppelte der Werte in der Basis. *M. elongata* zeigte hingegen nur eine leicht stärkere Anreicherung in der Spitze gegenüber der Basis.

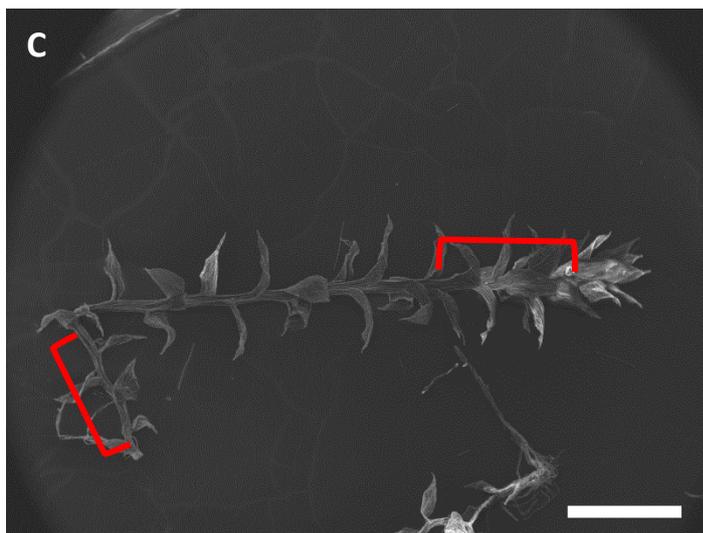
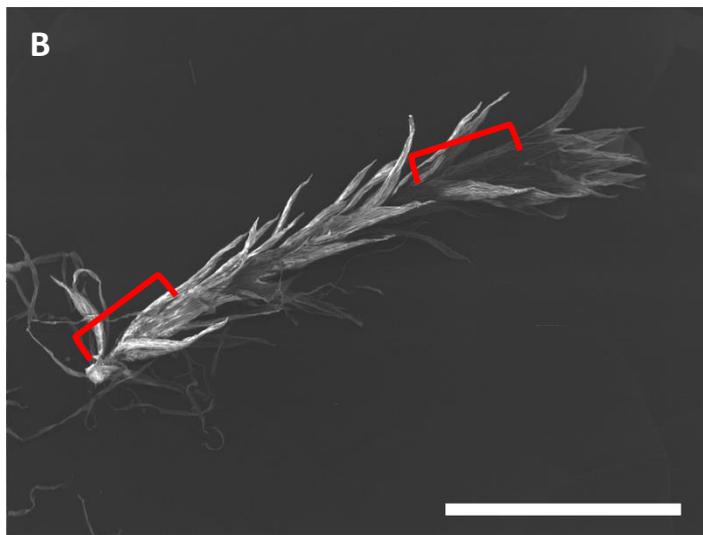
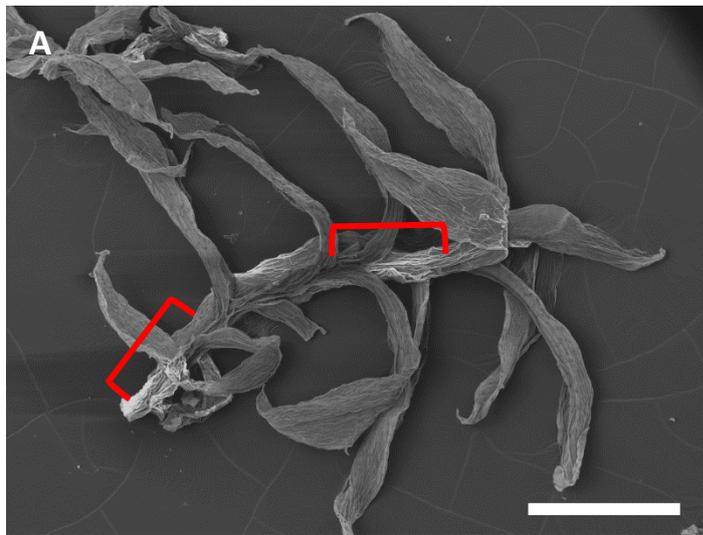


Abb. 26: REM-Aufnahmen von A) *A. patens*, B) *M. elongata* und C) *P. drummondii*; die roten Klammern zeigen Basis- und Spitzenbereiche der Stämmchen, die für die Elementanalyse verwendet wurden; Messbalken = 1 mm

5.1.1 *Aphanorhegma patens*

Die Elementanalyse zeigte bei *A. patens* beim Vergleich der Basen- und Spitzenbereiche mit der Kontrolle signifikante Unterschiede bei den $\text{CuCl}_2/\text{CuSO}_4$ Medien und beim 10 mM CuEDTA (Abb. 26). Nach CuCl_2 und CuSO_4 Behandlung waren die Werte insgesamt höher und lagen im unteren Bereich des Sprosses bei 0,31 wt% bzw. 0,41 wt%. Im oberen Bereich erreichten die Werte 0,31 wt% (CuCl_2) und 0,44 wt% (CuSO_4). Gegenüber der Kontrolle (Basis 0,09 wt% und Spitze 0,10 wt%) waren die Werte an Basis und Spitze der CuCl_2 und CuSO_4 gewachsenen Stämmchen signifikant höher (Basis $p < 0,01$, Spitze $p < 0,05$). Die Messungen der 0,1 mM CuEDTA-Konzentration unterschieden sich mit 0,12 wt% im Basis- und 0,11 wt% im Spitzenbereich nicht signifikant von der Kontrolle. Die größte Differenz wurde im 10 mM CuEDTA-Ansatz gemessen, wo der untere Abschnitt 0,33 Gewichtsprozent (wt%) des Kupferanteils und der obere sogar 0,66 wt% Kupfer aufwies. Beide Stämmchenbereiche lagen signifikant über den Werten der Kontrolle (Basis $p < 0,05$, Spitze $p < 0,001$).

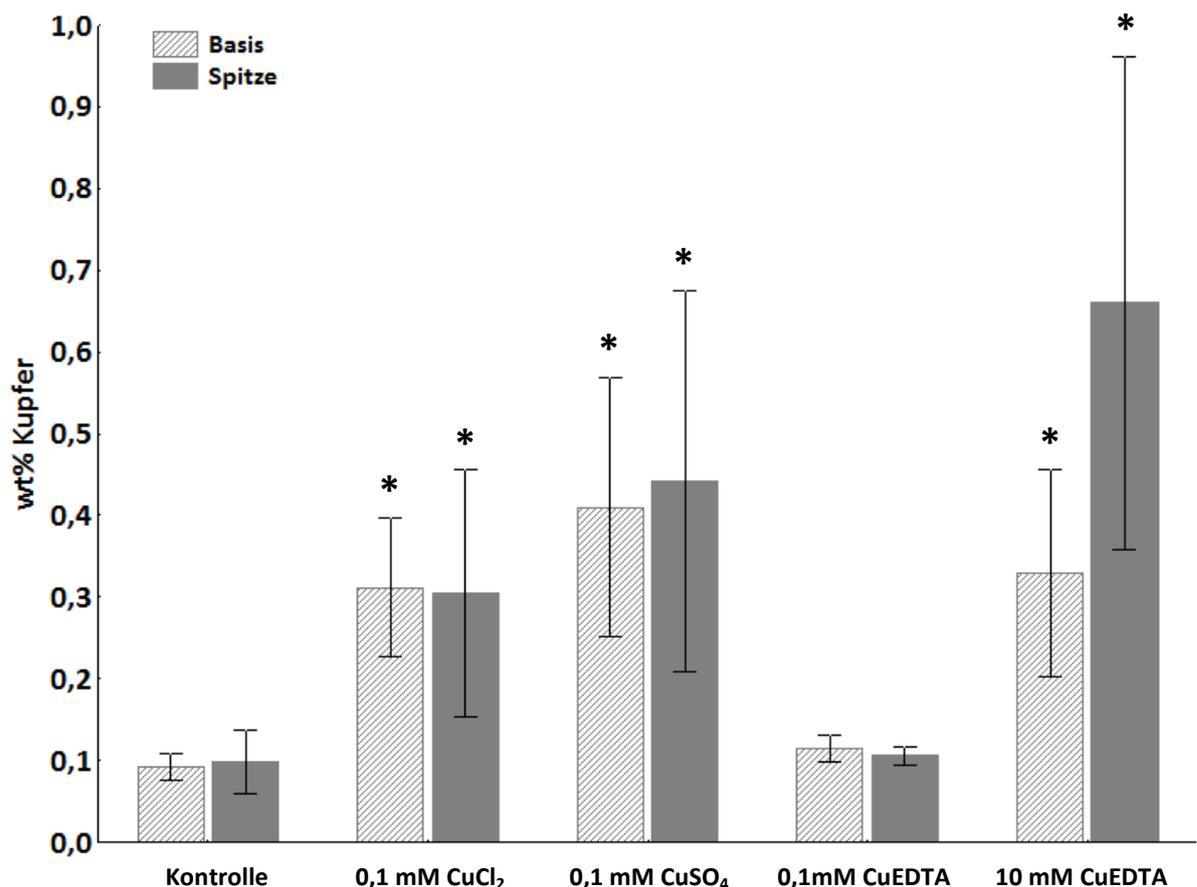


Abb. 27: EDX-Messungen an der Basis und Spitze des Stämmchens von *A. patens* in den fünf Ansätzen; Fehlerbalken = 2x SE, * zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle ($p < 0,05$)

5.1.2 *Mielichhoferia elongata*

Bei *M. elongata* zeigte die Kontrolle keinen Unterschied zwischen Basisbereich mit 0,12 wt% und Spitzenbereich mit 0,13 wt% (Abb. 27). Auf CuCl_2 und CuSO_4 Medium wurde in den Stämmchen jeweils deutlich mehr Kupfer in den Basisbereichen gefunden; beim CuCl_2 lag der Wert an der Basis bei 0,19 wt% und an der Spitze jedoch nur bei 0,06 wt%. Beim CuSO_4 waren es im Basisbereich 0,27 wt% (signifikant höher als die Kontrolle, $p < 0,05$) und im Spitzenbereich 0,11 wt%. Der 0,1 mM CuEDTA Ansatz verhielt sich ähnlich wie die Kontrolle und die Werte erreichten an der Basis 0,14 wt% und in der Spitze 0,11 wt%. Die 10 mM CuEDTA-Behandlung zeigte die höchsten Werte mit 0,37 wt% an der Basis ($p < 0,05$) und mit 0,56 wt% in der Spitze.

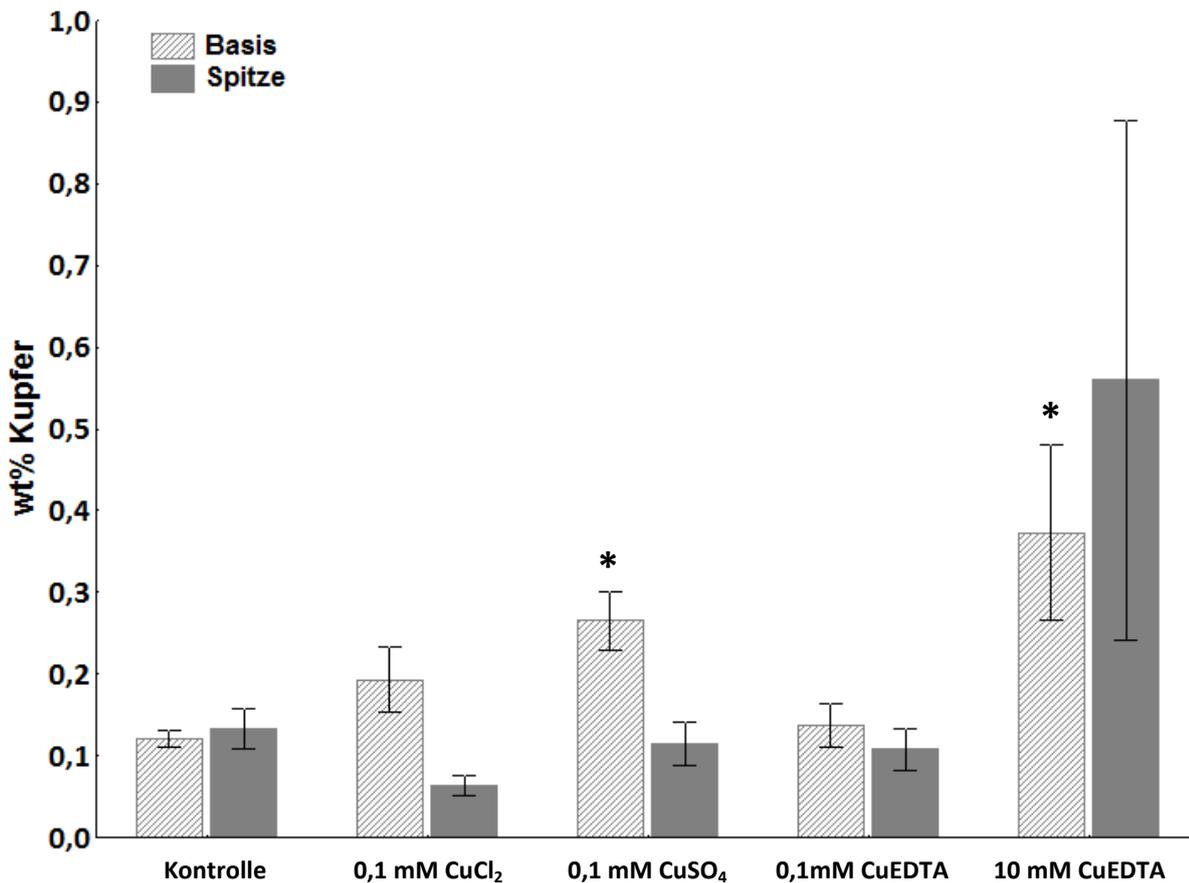


Abb. 28: EDX-Messungen an der Basis und Spitze des Stämmchens von *M. elongata* in den fünf Ansätzen; Fehlerbalken = 2x SE, * zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle ($p < 0,05$)

5.1.3 *Pohlia drummondii*

Auch bei *P. drummondii* ergab die Messung in der Kontrolle geringe Werte (an der Basis 0,05 wt% und an der Spitze 0,08 wt% [Abb. 28]). Die restlichen Ansätze unterschieden sich jeweils stark. Auf CuCl_2 und CuSO_4 wurden an der Basis der Stämmchen Werte von 0,30 wt% bzw. 0,19 wt% gemessen, welche damit signifikant (CuCl_2 $p < 0,001$, CuSO_4 $p < 0,01$) über den Werten der Kontrolle lagen. An der Spitze waren Kupferwerte von 0,12 wt% bzw. 0,09 wt% zu finden, also ungefähr auf dem Niveau der Kontrolle. Interessanterweise lagen nach 0,1 mM und 10 mM CuEDTA-Behandlung die Werte im Basisbereich mit 0,11 wt% bzw. 0,14 wt% niedriger als im Spitzenbereich des Stammes mit 0,18 wt% bzw. 0,33 wt%. In der 10 mM Konzentration enthielten sogar beide Bereiche signifikant (Basis $p < 0,05$, Spitze $p < 0,001$) mehr Kupfer als die Kontrolle.

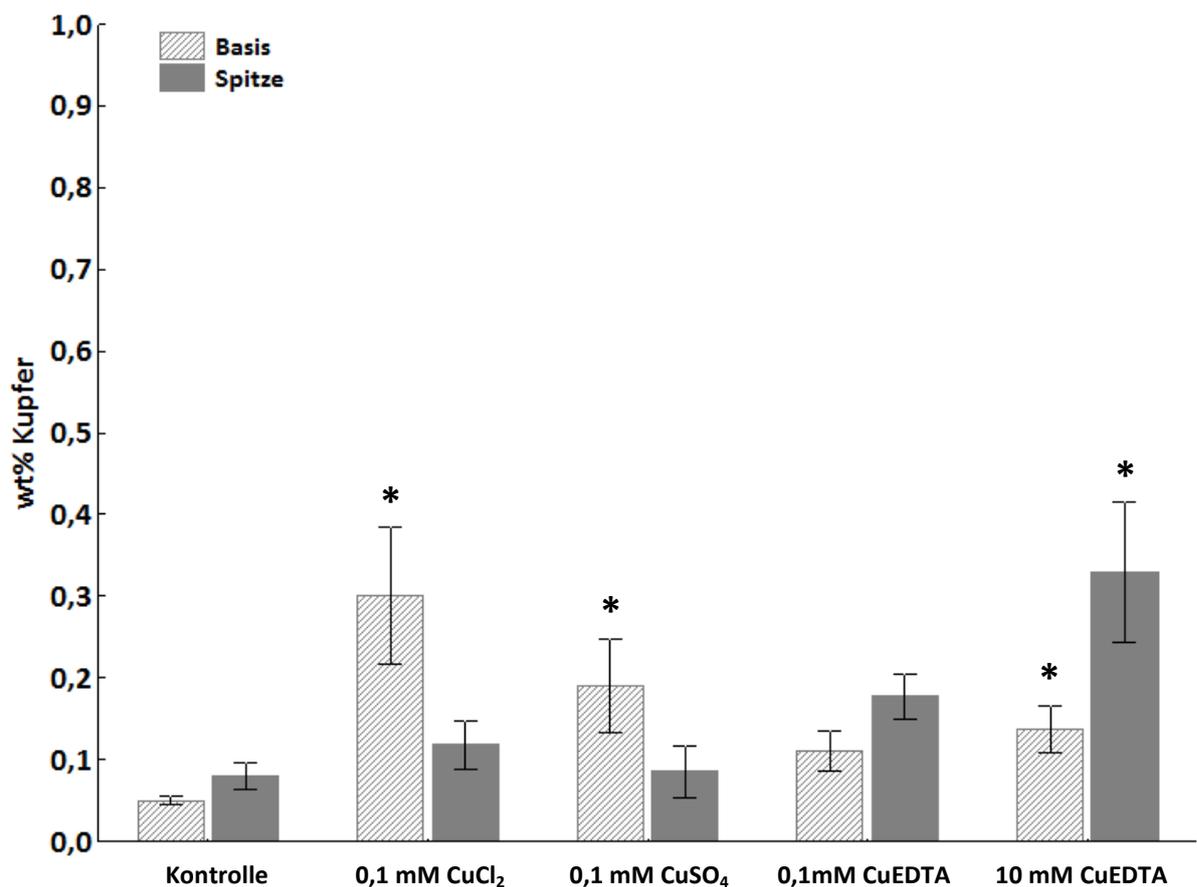


Abb. 29: EDX-Messungen an der Basis und Spitze des Stämmchens von *P. drummondii* in den fünf Ansätzen; Fehlerbalken = 2x SE, * zeigt signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$)

5.2 Schnelle Abnahme des Kupfergehalts entlang des Stämmchens von *M. elongata*

Die Verteilung des Kupfers in den einzelnen Moosen und Ansätzen wurde mit Hilfe von Linienscans veranschaulicht. Hierbei wurde der Kupfergehalt entlang des Stämmchens von der Basis zur Spitze (in den Abb. 29-43 als rote Linie gekennzeichnet) mittels EDX semi-quantitativ gemessen. Die Messungen zeigten, dass im CuCl_2 - und CuSO_4 -Ansatz bei *A. patens* über eine lange Strecke hohe Kupferwerte zu finden waren. Bei *M. elongata* und *P. drummondii* konnte hingegen ein Abfall zur Spitze hin gemessen werden, wobei *P. drummondii* viel geringere Kupfermengen im Basisbereich und eine langsamere Abnahme entlang des Stämmchens aufwies. CuEDTA-Behandlung zeigte in allen Moosarten einen mehr oder weniger starken Anstieg der Kupfermenge zur Spitze hin. In der 10 mM Konzentration sind im Spitzenbereich vermehrt hohe Einzelwerte gefunden worden. Besonders war dies bei *M. elongata* beobachtbar, wo bis zu 10-fach höhere Spitzenwerte gefunden wurden als in der Kontrolle.

5.2.1 *Aphanorhegma patens*

Bei *A. patens* zeigte sich in der Kontrolle ein konstanter Verlauf mit niedrigen Werten entlang des gesamten Stämmchens (Abb. 29). In den Proben der CuCl_2 Behandlung beschrieben die Zählimpulse für Kupfer eine Parabel (Abb. 30). Das hieß, dass mehr Kupfer im mittleren Bereich des Sprosses zu finden war. Bei Stämmchen der CuSO_4 Behandlung beschrieb die Trendlinie einen eher welligen Verlauf mit viel Kupfer an der Basis, einem gleichbleibend hohen Kupferanteil bis zum letzten Drittel und einem anschließenden Abfall zur Spitze hin (Abb.31). Die beiden CuEDTA Ansätze zeigten mehr Kupfer in den oberen Sprossbereichen. Beim 0,1 mM CuEDTA stieg der Kupferanteil linear an (Abb. 32). Beim 10 mM CuEDTA war der Anstieg bis zur Hälfte des Stämmchens gering. Aber ab der Hälfte war der Anstieg zur Spitze hin viel stärker und vereinzelt wurden sehr hohe Werte im Spitzenbereich gemessen (Abb. 33).

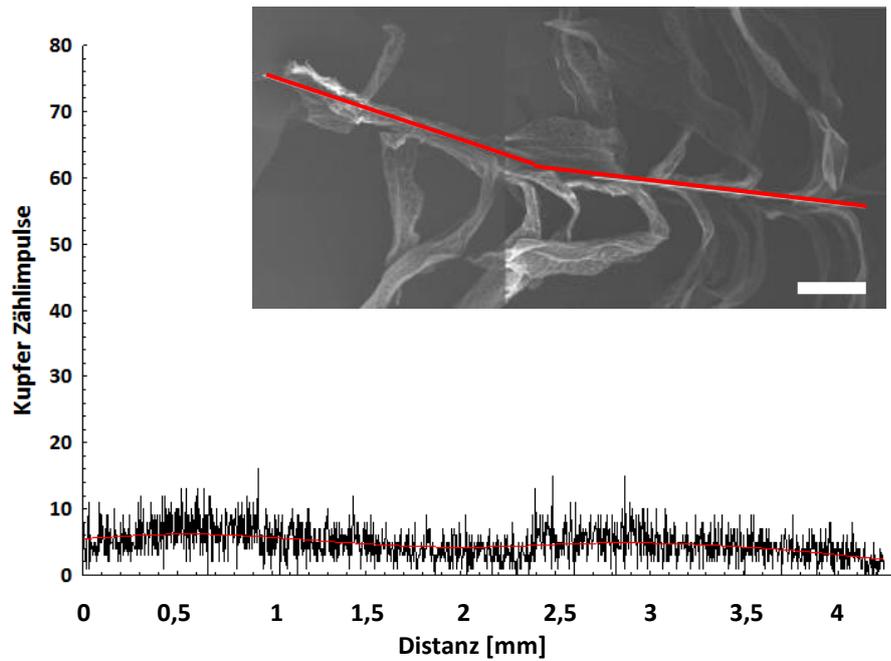


Abb. 30: REM-Aufnahme von *A. patens* (Kontrolle) und dazugehöriger Linienscan; die Zählimpulse für die Kupferdetektierung beschrieben einen gleichbleibenden niedrigen Verlauf entlang des gesamten Stämmchens; die Messung erfolgte entlang der roten Linie von links nach rechts; Messbalken = 500 μm

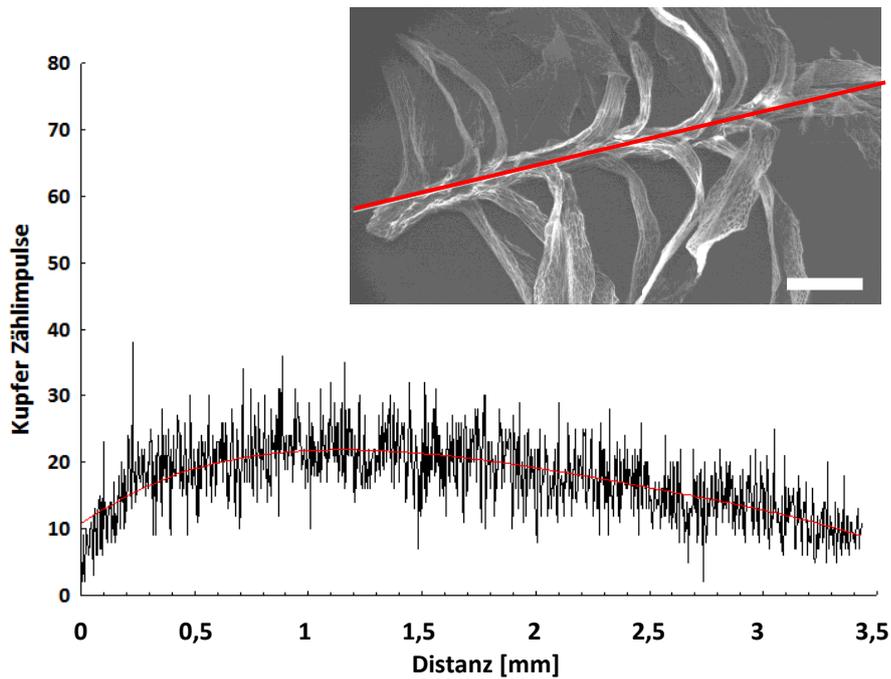


Abb. 31: REM-Aufnahme von *A. patens* (CuCl_2) und dazugehöriger Linienscan; das meiste Kupfer wurde in der Mitte des Stämmchens gemessen, wodurch die Trendlinie eine Parabel beschrieb; die Messung erfolgte entlang der roten Linie von links nach rechts; Messbalken = 500 μm

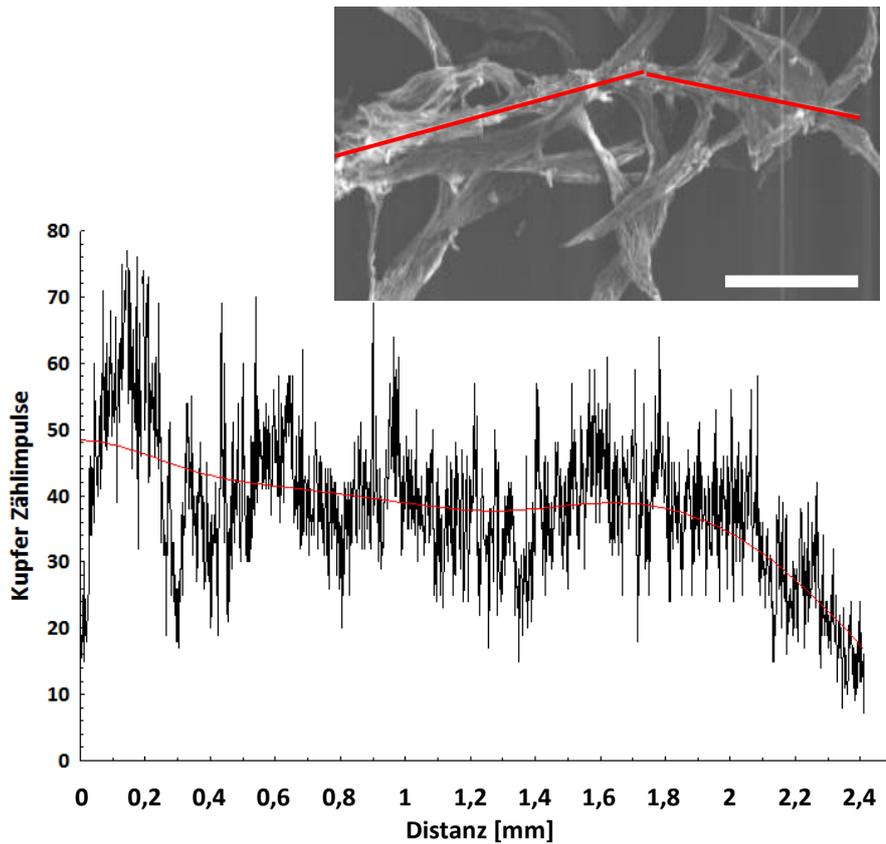


Abb. 32: REM-Aufnahme von *A. patens* (CuSO_4) und dazugehöriger Linienscan; es wurden sehr hohe Kupferwerte entlang des Stämmchens gemessen; die Messung erfolgte entlang der roten Linie von links nach rechts; Messbalken = 500 μm

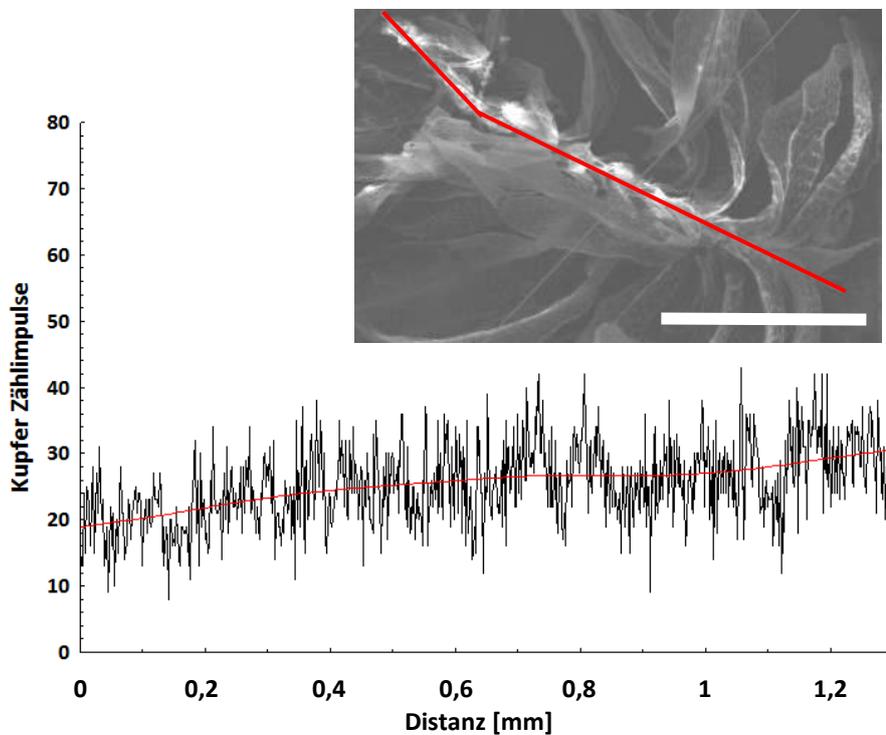


Abb. 33: REM-Aufnahme von *A. patens* (0, 1 mM CuEDTA) und dazugehöriger Linienscan, hier zeigte sich ein leichter Anstieg des Kupfers zur Spitze hin; die Messung erfolgte entlang der roten Linie von links nach rechts; Messbalken = 500 μm

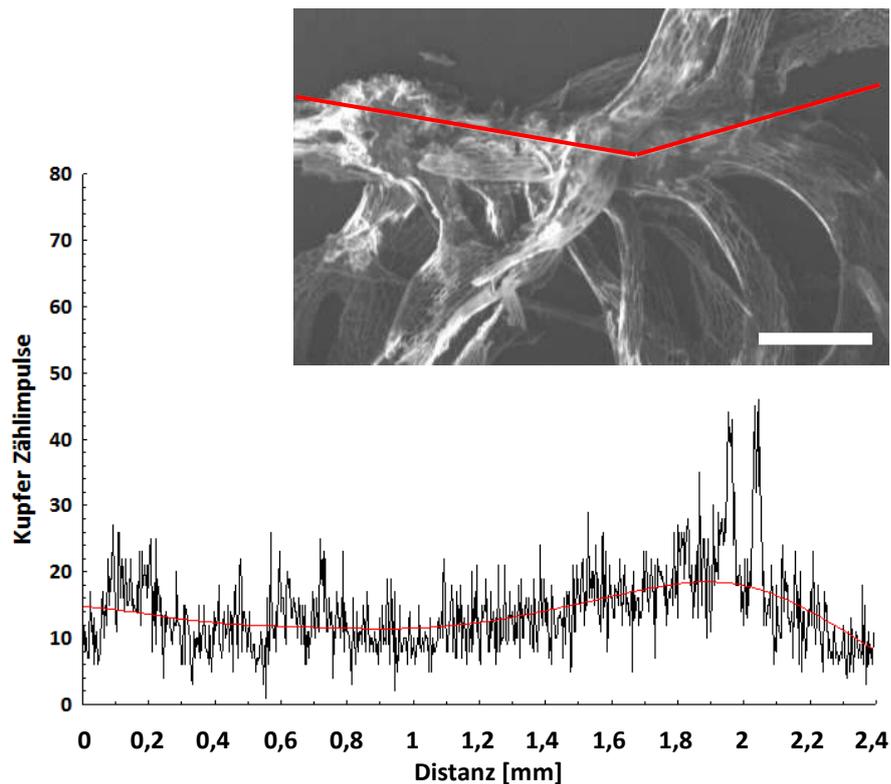


Abb. 34: REM-Aufnahme von *A. patens* (10 mM CuEDTA) und dazugehöriger Linienscan, es wurden sehr hohe Kupferanreicherungen im Spitzenbereich gefunden; die Messung erfolgte entlang der roten Linie von links nach rechts; Messbalken = 500 μ m

5.2.2 *Mielichhoferia elongata*

Die Kontrolle zeigte wie bei *A. patens* einen konstanten niedrigen Verlauf entlang des Stämmchens (Abb. 34). Die Zählimpulse für Kupfer fielen in den Ansätzen mit CuCl_2 und CuSO_4 nach einem hohen Anfangswert an der Basis stark zur Spitze hin ab und beschrieben eher eine negative exponentielle Funktion (Abb. 35 & 36). Die CuEDTA-Ansätze zeigten hingegen den gleichen Verlauf wie bei *A. patens*; einen leichten linearen Anstieg bei 0,1 mM (Abb. 37) und einen stärkeren bei 10 mM, ebenfalls mit vereinzelt sehr hohen Werten im Spitzenbereich (Abb. 38).

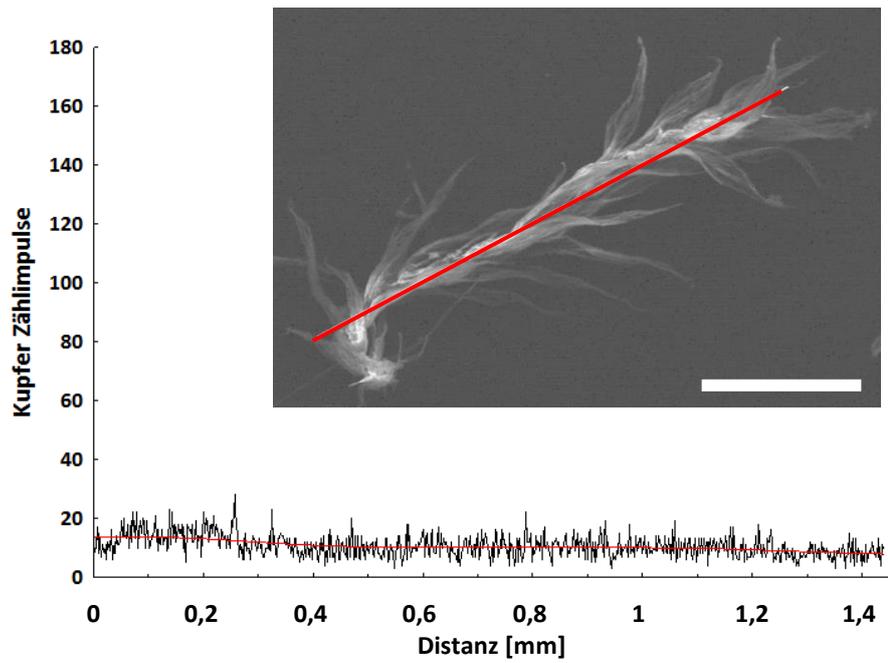


Abb. 35: REM-Aufnahme von *M. elongata* (Kontrolle) und dazugehöriger Linienscan, die Kupfermenge war entlang des gesamten Stämmchens gering; die Messung erfolgte entlang der roten Linie von links nach rechts; Messbalken = 500 μm

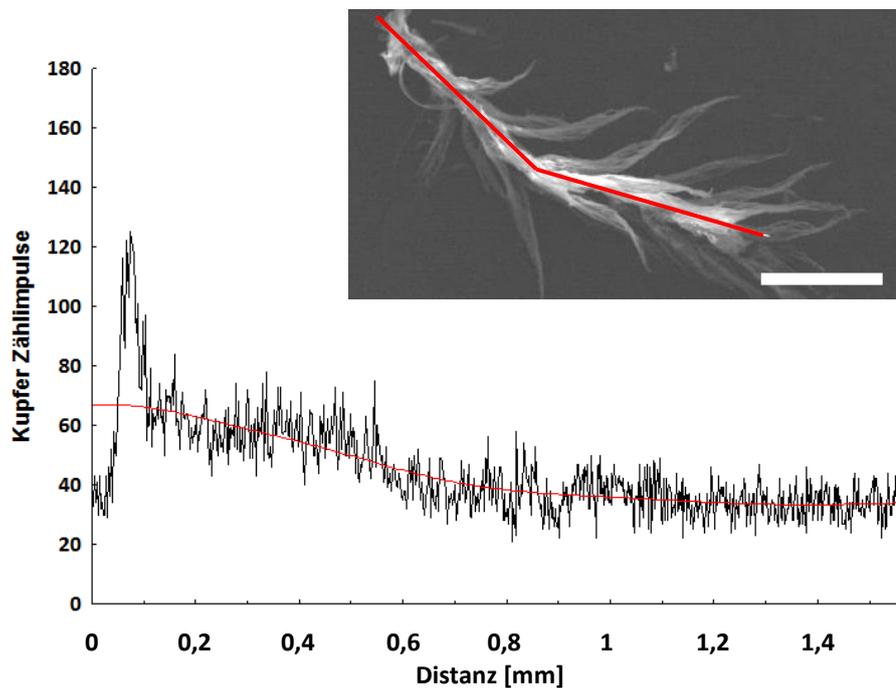


Abb. 36: REM-Aufnahme von *M. elongata* (CuCl_2) und dazugehöriger Linienscan, nach einem sehr hohen Anfangswert fielen die Zählimpulse für Kupfer bis zur Hälfte des Stämmchens stark ab; die Messung erfolgte entlang der roten Linie von links nach rechts; Messbalken = 500 μm

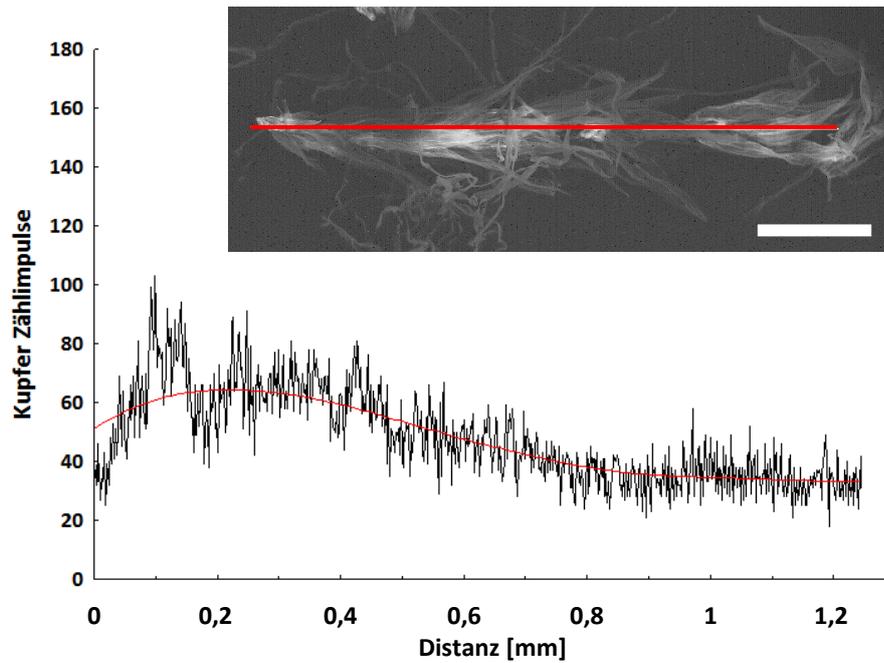


Abb. 37: REM-Aufnahme von *M. elongata* (CuSO_4) und dazugehöriger Linienscan, in der Basis wurden hohe Kupferwerte gemessen, die bis zur Hälfte des Stämmchens stark abnahmen; die Messung erfolgte entlang der roten Linie von links nach rechts; Messbalken = 250 μm

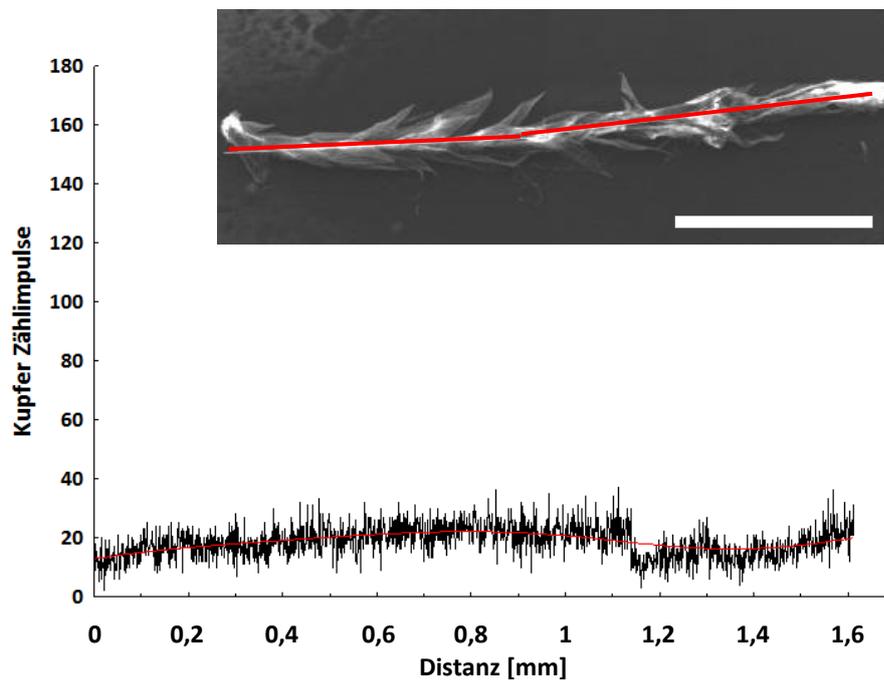


Abb. 38: REM-Aufnahme von *M. elongata* (0,1 mM CuEDTA) und dazugehöriger Linienscan, hier zeigte sich ein leichter Anstieg an Kupfer-Zählimpulsen zur Spitze hin; die Messung erfolgte entlang der roten Linie von links nach rechts; Messbalken = 500 μm

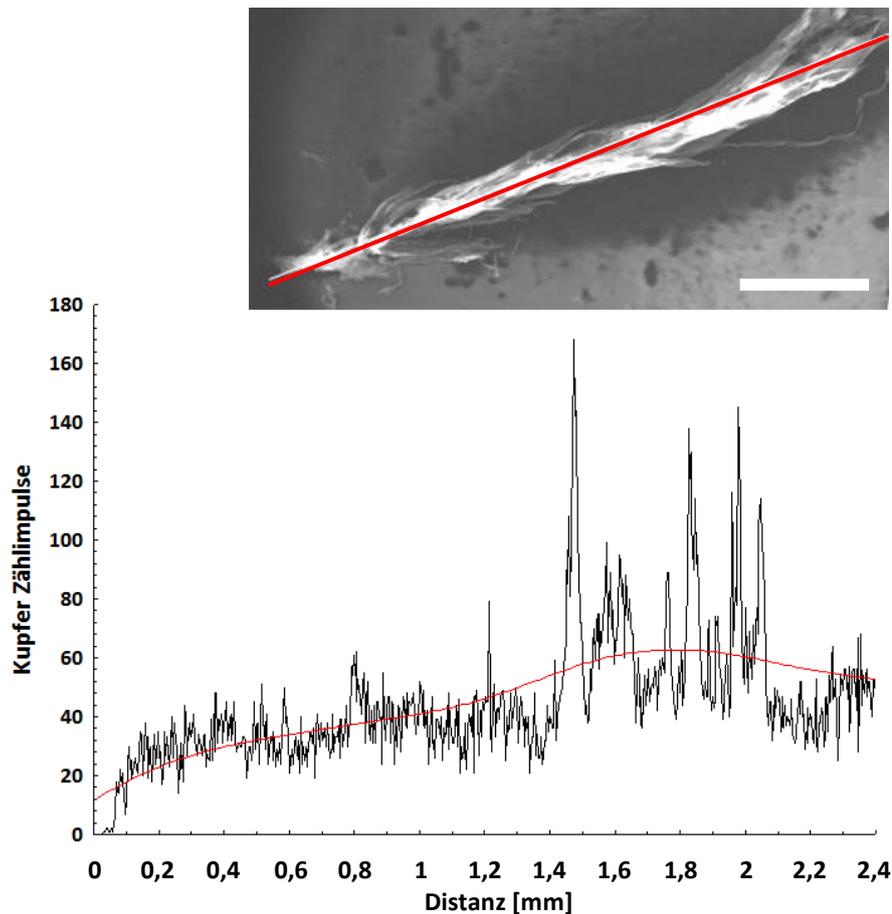


Abb. 39: REM-Aufnahme von *M. elongata* (10 mM CuEDTA) und dazugehöriger Linienscan, von der Basis weg wurde ein starker Kupferanstieg richtung Spitze gemessen, wobei im Spitzenbereich sehr hohe Einzelwerte gefunden wurden; die Messung erfolgte entlang der roten Linie von links nach rechts; Messbalken = 500 μm

5.2.3 *Pohlia drummondii*

Bei *P. drummondii* zeigten die Linienscans der Kontrollpflänzchen einen ähnlich konstanten Verlauf wie die der anderen beiden Moosarten (Abb. 39). Wie bei *M. elongata* sank auch bei *P. drummondii* im CuCl_2 Ansatz der Kupferanteil zur Spitze hin ab, doch war der Verlauf mehr oder weniger linear (Abb. 40). Nach CuSO_4 Behandlung zeigte der Verlauf einen hohen Anfangswert an der Basis, der ab der Hälfte zur Spitze hin abfällt (Abb. 41). Die CuEDTA Ansätze verhielten sich auch hier wie bei den beiden vorhergehenden Moosarten; ein leichter Anstieg bei 0,1 mM (Abb. 42) und ein stärkerer Anstieg bei 10 mM, wobei aber weniger hohe Einzelwerte im Spitzenbereich zu finden waren (Abb. 43).

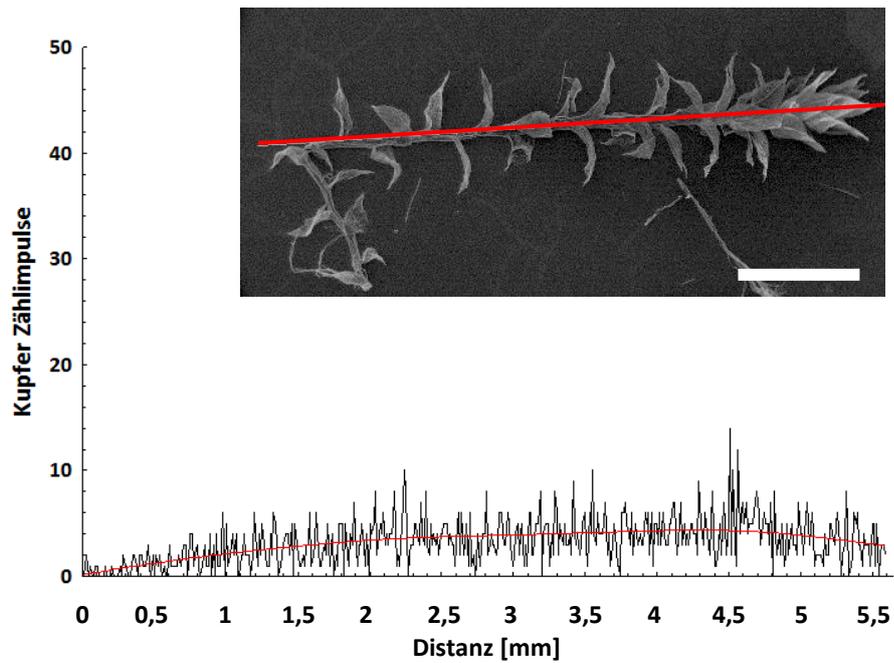


Abb. 40: REM-Aufnahme von *P. drummondii* (Kontrolle) und dazugehöriger Linienscan, es wurden nur sehr geringe Werte entlang des gesamten Stämmchens gemessen; die Messung erfolgte entlang der roten Linie von links nach rechts; Messbalken = 1 mm

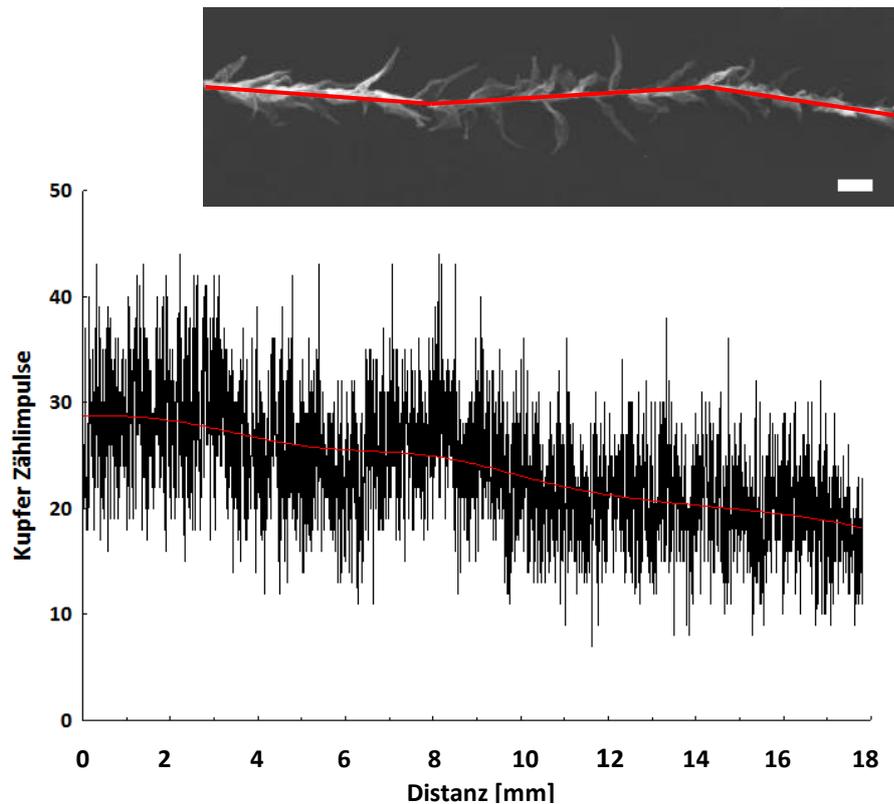


Abb. 41: REM-Aufnahme von *P. drummondii* (CuCl_2) und dazugehöriger Linienscan; von der Basis zur Spitze fällt die Kupfermenge stetig ab; die Messung erfolgte entlang der roten Linie von links nach rechts; Messbalken = 1 mm

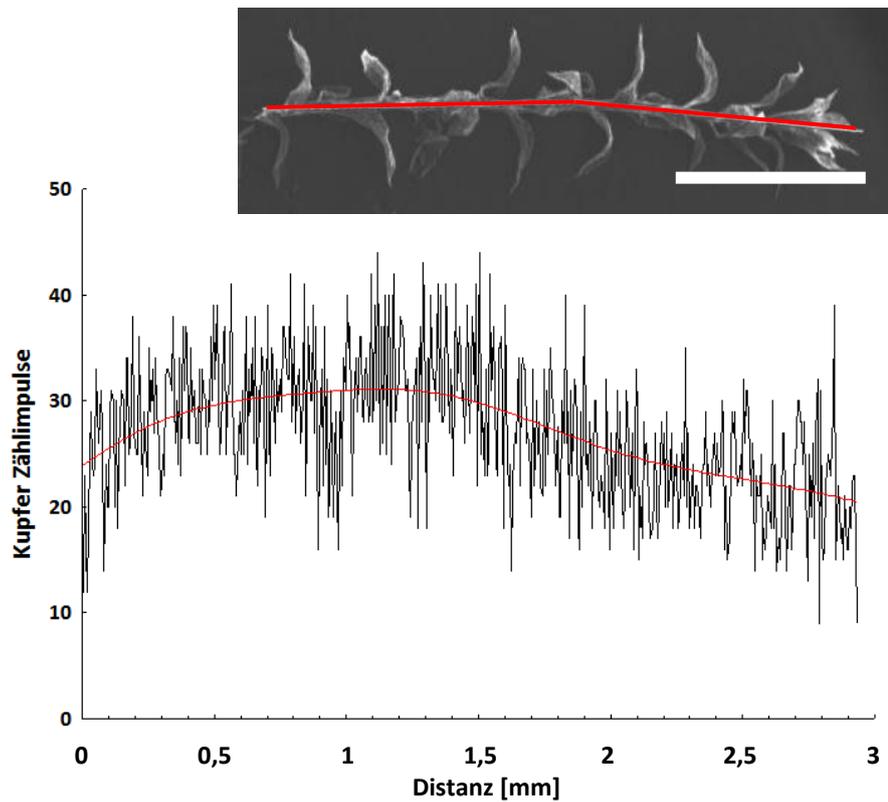


Abb. 42: REM-Aufnahme von *P. drummondii* (CuSO_4) und dazugehöriger Linienscan; die Kupfermenge stieg zur Mitte des Stämmchens an und sank bis zur Spitze wieder; die Messung erfolgte entlang der roten Linie von links nach rechts; Messbalken = 1mm

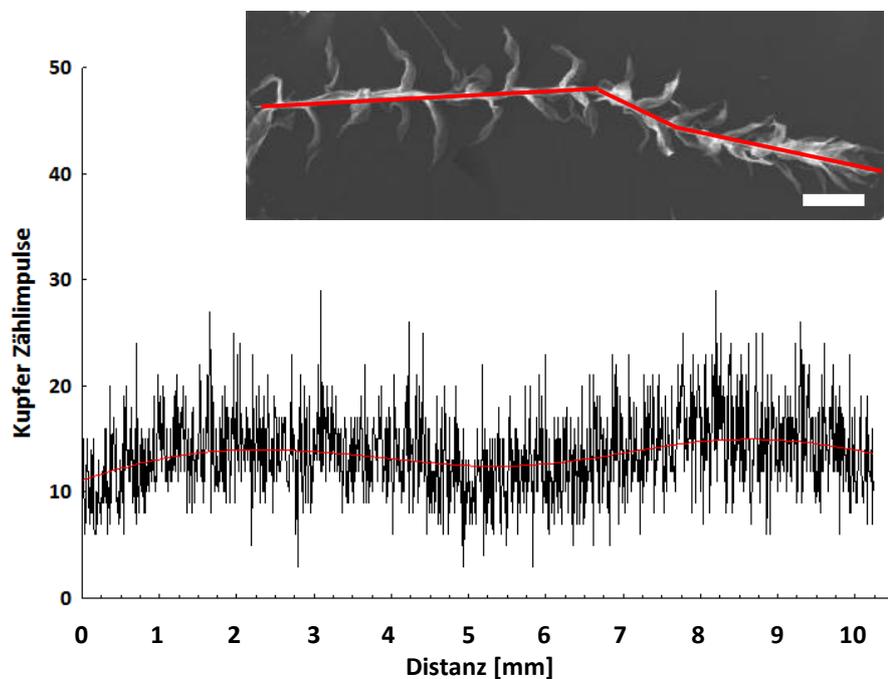


Abb. 43: REM-Aufnahme von *P. drummondii* (0,1 mM CuEDTA) und dazugehöriger Linienscan; die Messungen zeigten einen welligen Verlauf mit einem leichten Anstieg der Kupfermenge zur Spitze hin; die Messung erfolgte entlang der roten Linie von links nach rechts; Messbalken = 1 mm

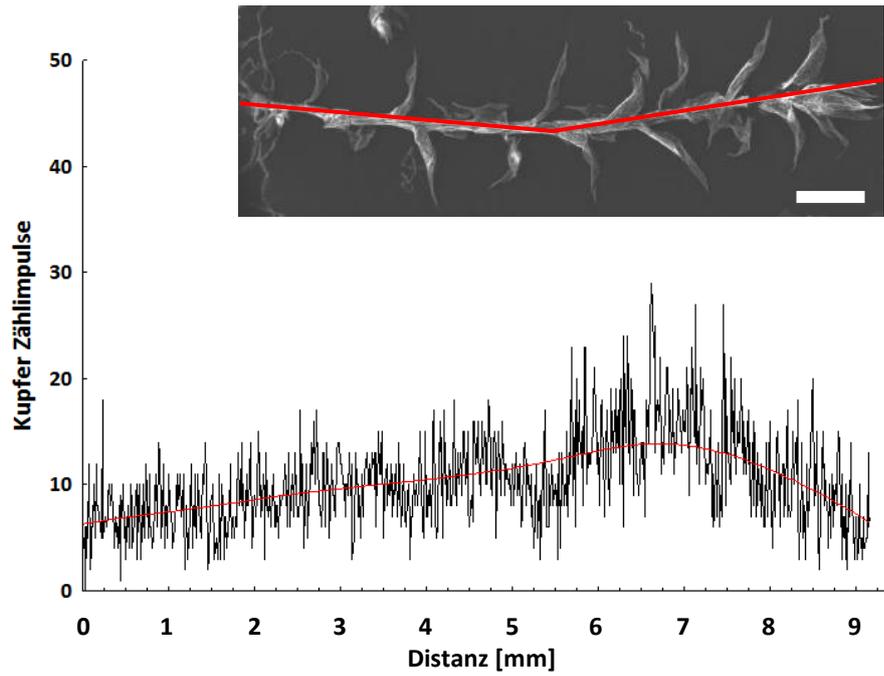


Abb. 44: REM-Aufnahme von *P. drummondii* (10 mM CuEDTA) und dazugehöriger Linienscan, die Zählimpulse für Kupfer stiegen entlang des Stämmchens zur Spitze stark an; die Messung erfolgte entlang der roten Linie von links nach rechts; Messbalken = 1 mm

6 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Kupferlösungen auf Morphologie und Physiologie dreier Moosarten unter Laborbedingungen. Der Fokus lag dabei vor allem beim Vergleich der drei Arten, von denen eine kupfersensitiv ist (*A. patens*), die anderen Arten aber als „Kupfermoos“ (*M. elongata*) bzw. als kupfertolerante Art bekannt sind (*P. drummondii*).

Als Grundlage wurden die Ergebnisse der Fotodokumentation und der Größenmessung herangezogen. Besonders in den CuCl_2 und CuSO_4 Behandlungen von *A. patens* war stark reduziertes Wachstum erkennbar. Hier waren die Pflänzchen weitaus kleiner als in der Kontrolle und zeigten auch ein Absterben des Protonemas. In der 10 mM CuEDTA Behandlung von *M. elongata* war auch weniger Biomasse produziert worden. Doch lag dies weniger an der Größe der Pflänzchen, die die der Kontrolle überstieg, als vielmehr an der nur geringen Anzahl von neuen vegetativen Ablegern. In beiden Fällen konnte von einem starken Kupferstress ausgegangen werden, da in der Regeneration all diese Ansätze ein „normales“, d.h. der Kontrolle ähnliches Wachstum aufzeigten.

Zugleich wurde der positive Einfluss des Kupfers berücksichtigt, da auch Förderungen des Wachstums in verschiedenen Ansätzen gefunden wurden. So waren bei *A. patens* auf beiden CuEDTA Konzentrationen deutlich mehr und größere Pflänzchen vorzufinden als in der Kontrolle. Auch bei *M. elongata* und *P. drummondii* waren in den CuCl_2 und CuSO_4 Ansätzen die Pflänzchen größer und kompakter beblättert als die der Kontrolle. Diese Förderungen waren in der Regeneration nicht mehr ersichtlich, weshalb der positive Effekt von den Kupferbehandlungen herführen musste.

Auf diesen Schlussfolgerungen aufbauend werden nun in der weiteren Diskussion die in der Einleitung aufgestellten Hypothesen behandelt.

Hypothese 1: Die Moose, die dem Kupfer ausgesetzt sind, werden kleiner Zellen haben, da nicht die ganze Energie für Zellwachstum verwendet werden kann.

Bei *A. patens* waren die Zellen der Kupferansätze nach der ersten Woche deutlich längere als die Kontrolle. Dies deutete darauf hin, dass die Moose von dem Kupfer im Medium anfänglich profitierten. Da das Kupfer ein Mikronährstoff ist, sorgte die erhöhte Menge an Kupfer im Medium für ein stärkeres Zellwachstum (Cook *et al.*, 1997). Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zur Arbeit von Sidhu und Brown (1996), wo die Zugabe von Schwermetallen (inkl. Kupfer) zu einer Reduktion des Spitzenwachstums führt. Es zeigt sich aber, dass sich innerhalb der ersten fünf Tage die Zellen trotz Schwermetallbehandlung noch streckten. Daraus schließen die Autoren, dass sich die Schwermetalle mehr auf die Zellteilung und nicht auf die Zellstreckung auswirken.

Dieser anfängliche Wachstumsvorteil war nämlich nach sechs Wochen nicht mehr vorhanden; besonders im CuCl_2 und im 10 mM CuEDTA Ansatz, wo die Zellen gegenüber der Kontrolle deutlich kleiner waren. Auf CuCl_2 dürfte die Zellgröße aufgrund der toxischen Wirkung der Kupferverbindung verkleinert sein. Hingegen ist auf 10 mM CuEDTA die Höhe der Konzentration ausschlaggebend, weil der 0,1 mM Ansatz gleich große Zellen wie die Kontrolle entwickelte. Dieser Zusammenhang zeigt sich auch in der Arbeit von Sillanpää und Oikari (1996) mit *Photobacterium phosphoreum*, in der CuEDTA erst bei einer höheren Konzentration gleich giftig wird wie CuCl_2 . Neben der hohen Kupferkonzentration im Medium könnten hier auch Wechselwirkungen des EDTAs mit anderen Kationen eine Rolle spielen. So zeigt Geebelen *et al.* (2002) in *Phaseolus vulgaris* (L.), dass mit erhöhter PdEDTA Konzentration (bis zu 0,2 mM) auch weniger andere essentielle Kationen frei in den Blättern verfügbar sind und sich den jeweiligen Mangelkonzentrationen der Pflanze annähern. Dies lässt den Schluss zu, dass eine CuEDTA Konzentration von 10 mM (50-mal höher) zu einer weitaus stärkeren Komplexierung von essentiellen Kationen führen könnte, was ebenfalls die entstandenen Einbußen in Wuchshöhe und Zellgröße gegenüber der 0,1 mM CuEDTA Konzentration erklären würde.

Die Zellen von *M. elongata* waren in der ersten Woche auf CuCl_2 und auf CuSO_4 größer als in der Kontrolle. Dies bedeutete, dass das Zellwachstum in diesen Behandlungen mehr vom Kupfer profitierte als in der Kontrolle und in den CuEDTA-Ansätzen. Dieser Umstand könnte durch den möglichen hohen Bedarf an Kupfer für *M. elongata* erklärt werden, der in der

Kontrolle und den CuEDTA-Behandlungen nicht ausreichend gedeckt wurde, da hier weniger freie Kupferionen zur Verfügung stehen (Sassmann *et al.*, 2015).

In der sechsten Woche waren dann die Zellen aller Kupferansätze deutlich größer als die der Kontrolle. Ausgehend davon, dass *M. elongata* ein an Kupfer angepasstes Moos ist, stützte das die Vermutung, dass dieses Moos mehr Kupfer benötigte und dass bei längerer Kupferunterversorgung größere Wachstumseinbußen auftraten. Dies ist der gleiche Effekt wie bei *Thlaspi caerulescens* in den Arbeiten von Brown *et al.* (1995) und Gerstmann (2010), wo ebenfalls Wachstumseinbußen auf metallfreiem oder metallkomplexiertem Substrat auftreten.

Bei *P. drummondii* zeigte sich in der ersten Woche ein ähnliches Verhalten der Zellgrößen wie bei *A. patens* in der sechsten Woche. Kontrollpflänzchen und auf 0,1 mM CuEDTA gezogenen Pflänzchen hatten gleich große Zellen, während sie auf CuCl₂ und 10 mM CuEDTA stark verkleinerte Zellen zeigten. Hier erlitt wahrscheinlich das Moos schon anfänglich Einbußen im Zellwachstum aufgrund der bereits erwähnten Toxizität des CuCl₂ und der hohen CuEDTA Konzentration. Dass *P. drummondii* nach der ersten Woche eher Wachstumseinbußen und *A. patens* hingegen Wachstumszunahmen zeigte, könnte an der unterschiedlich schnellen Verstoffwechslung liegen. Da *A. patens* einen kürzeren Lebenszyklus und ein schnelleres Wachstum hat (Cove, 2005), könnten die hohen Kupferkonzentrationen anfangs entsprechend schnell genutzt werden, was beim langsamwüchsigen Moos *P. drummondii* womöglich nicht der Fall war.

Nach der sechsten Woche hatte aber der Kupferstress kaum noch Auswirkungen auf die Zellgröße, da diese in allen Ansätzen im Bereich der Kontrolle lagen. Trotzdem wirkte sich das CuEDTA negativer auf die Wuchshöhe aus als die CuCl₂/CuSO₄ Behandlungen. Dieser Umstand konnte dadurch erklärt werden, dass in dieser Arbeit nur die Zellen der Blätter gemessen wurden und die Wuchshöhe durch die Streckung der Zellen im Stämmchen erfolgte. Wernitznig (2009) zeigt, dass mit höherer Konzentration eine deutlich stärkere Anreicherung von Kupfer im Stämmchen als in den Blättern stattfindet. Somit wirkte sich die hohe Konzentration an CuEDTA wahrscheinlich verstärkt in den Zellen des Stämmchens negativ aus, was zu einer kleineren Wuchshöhe führte.

Verglich man alle Ansätze der drei Moosarten miteinander, war augenfällig, dass sich auf CuSO₄ Medien in allen Fällen flächenbezogen größere Zellen bildeten als in der Kontrolle.

Selbst bei *A. patens* war dies der Fall, obwohl dieser Ansatz sehr geringere Wuchshöhen und erhöhten oxidativen Stress zeigte. Da die größeren Zellen aber in allen Moosen gefunden wurden, sprach das eher für einen fördernden Effekt durch das Sulfat. Zum einen ist Schwefel ein Makronährstoff für Pflanzen und wird hauptsächlich als SO_4^{2-} aufgenommen (Leustek & Saito, 1999). Zum anderen könnte die Bildung von Glutathion eine Rolle spielen (Takács *et al.* 2001). Dieses schwefelreiche Antioxidans ist für die Bildung von Metallothioneinen verantwortlich, die reaktive Metalle komplexieren. Bruns *et al.* (2001) zeigen bei verschiedenen Moosen, dass sich die Menge dieser schwefelreichen Antioxidantien bei Metallstress stark erhöhen und sie wahrscheinlich für den Transport der Metalle in die Vakuole verantwortlich sind. Durch diesen Mechanismus wäre das Moos in der Lage das Kupfer stärker zu binden, in der Vakuole „unschädlich“ zu machen bzw. weitergehend vielleicht auch für das Wachstum zu nutzen.

Die Hypothese, dass durch erhöhten Kupferstress die Zellen kleiner werden, konnte nur teilweise bestätigt werden. Auf CuCl_2 zeigte *A. patens* bei längerer Behandlung kleinere Zellen, was mit der Fotodokumentation und der Pflanzengröße übereinstimmt. In den angepassten Moosarten waren die Zellen in den Kupferbehandlungen meist größer als die der Kontrolle. Auch war das CuSO_4 weitaus fördernder für das Zellwachstum als das CuCl_2 , selbst bei *A. patens* mit den starken Wachstumseinbußen bei dieser Behandlung.

Hypothese 2: Das kupfertolerante Moos *M. elongata* und das fakultative Schwermetallmoos *P. drummondii* zeigen weniger Stresssymptome in Form einer Verschiebung des Chl *a/b* Verhältnisse zu mehr Chl *a* als das kupfersensible Moos *A. patens*.

Die Veränderungen der Chl *a/b*-Verhältnisse unterschieden sich in *A. patens* stark von den erwarteten Ergebnissen, die die Fotodokumentation angedeutet hatte. Sowohl in der ersten Woche als auch nach sechs Wochen zeigten die CuCl_2 und CuSO_4 Proben kein deutlich verändertes Verhältnis als die Kontrolle. Da das Chl *a/b*-Verhältnis als Maß für Stress herangezogen wird, bedeutet das, dass bei *A. patens* das CuCl_2 und CuSO_4 kaum Stress verursacht hätte. Vor allem der CuSO_4 Ansatz, der in der Fotodokumentation offensichtlich am stärksten unter der Kupferbelastung litt, hatte das höchste zum Chl *a* verschobene Verhältnis. Dies könnte vielleicht daran liegen, dass das Kupfer verstärkt hemmende Effekte auf die Photosynthese hat, wie z.B. das Blockieren der Elektronentransportkette zwischen

den Photosystemen (Barón *et al.*, 1995; Yurela *et al.*, 1996), und nicht auf die Pigmente selbst. Auch wenn man die erste Woche mit der sechsten Woche vergleicht, zeigten besonders die Pflanzen auf CuCl_2 und CuSO_4 zunehmende Chl a/b -Verhältnisse gegenüber der Kontrolle. Dies steht in Kontrast zu anderen Studien über Moose (Shakya *et al.*, 2008; Lopez & Carballeira, 1989), in denen das Chlorophyll-Verhältnis bei Kupferstress abnimmt.

Die CuEDTA-Ansätze hatten bei *A. patens* in der ersten Woche ein etwas höheres Chl a/b -Verhältnis gegenüber der Kontrolle. Dies ändert sich zur sechsten Woche hin, wo das Verhältnis mehr zu Chl b tendierte, was für etwas höhere Stressbedingungen sprechen würde. Unterstützt wurde diese Vermutung durch eine ebenfalls starke O_2^- Färbung in der 10 mM CuEDTA Behandlung (Abb. 44A). Doch gerade auf 10 mM CuEDTA wuchsen viel mehr und größere Pflanzen als auf CuCl_2 und CuSO_4 . Dieses bessere Wachstum auf CuEDTA ist auch in der Arbeit von Sassmann (2009) erwähnt, wo *A. patens* bis zu einer Konzentration von 10 mM CuEDTA nach fünf Wochen gleich hohe oder sogar höhere Biomasseproduktion zeigt als die Kontrolle. Dies ließ vermuten, dass die Behandlung mit CuEDTA einen fördernden Stress in *A. patens* verursachte. Nach Lichtenthaler (1988) führt ein solcher leichter Stress (*eu-stress*) zu verstärktem Zellmetabolismus und höherer physiologischer Aktivität, ohne der Pflanze auf lange Sicht zu schaden.

M. elongata zeigte eine etwas heterogenere Entwicklung in den verschiedenen Ansätzen. Das Chl a/b -Verhältnis als Stressindikator war besonders auffällig bei der CuSO_4 Behandlung, wo es ein hohes Verhältnis zeigte; sowohl in der ersten als auch in der sechsten Woche waren die Werte am stärksten zum Chl a verschoben. Wenn man nun aber bedenkt, dass *M. elongata* ein an Kupfer angepasstes Moos ist (Shaw 1994) und die Hauptformen an Kupferverbindungen im Boden zum Großteil mit Schwefel assoziiert sind (Kapitel 1.5), dann wird diese Verbindung vielleicht am effektivsten genutzt. Beim CuCl_2 waren die Chl a/b -Verhältnisse während der ganzen Kupferbehandlung sehr ähnlich wie in der Kontrolle. Somit hat diese Kupferverbindung zwar einen positiven Effekt auf das Wachstum (größte Pflänzchen), doch wird das Photosystem dabei nicht beeinflusst.

Die CuEDTA Ansätze, deren Chl a/b -Verhältnisse anfangs ähnlich gegenüber der Kontrolle waren, verschoben sich nach der sechsten Woche zu mehr Chl b . Dies spiegelt sich auch in der Fotodokumentation wieder, in denen diese Ansätze den geringsten Biomassezuwachs zeigten. Im Gegensatz zu *A. patens* war anscheinend der Stress durch das CuEDTA auf

M. elongata stärker, weshalb sich hier negative Auswirkungen auf die Entwicklung des Moores zeigten. Bestätigt wurde dieser Zusammenhang mit einer signifikanten Korrelation des O_2^- mit dem Chl *a/b* Verhältnis (Abb. 44B); im 10 mM CuEDTA-Ansatz wurde der höchste Gehalt an O_2^- Radikalen im gesamten Moos gemessen. Auch in der bereits erwähnten Arbeit von Geebelen *et al.* (2002) zeigt sich eine Korrelation zwischen der Zunahme an PbEDTA und der Abnahme des Chl *a/b*-Verhältnisses, wobei auch da die reduzierte Verfügbarkeit von essentiellen Kationen wohlmöglich der Grund für das schlechtere Verhältnis ist.

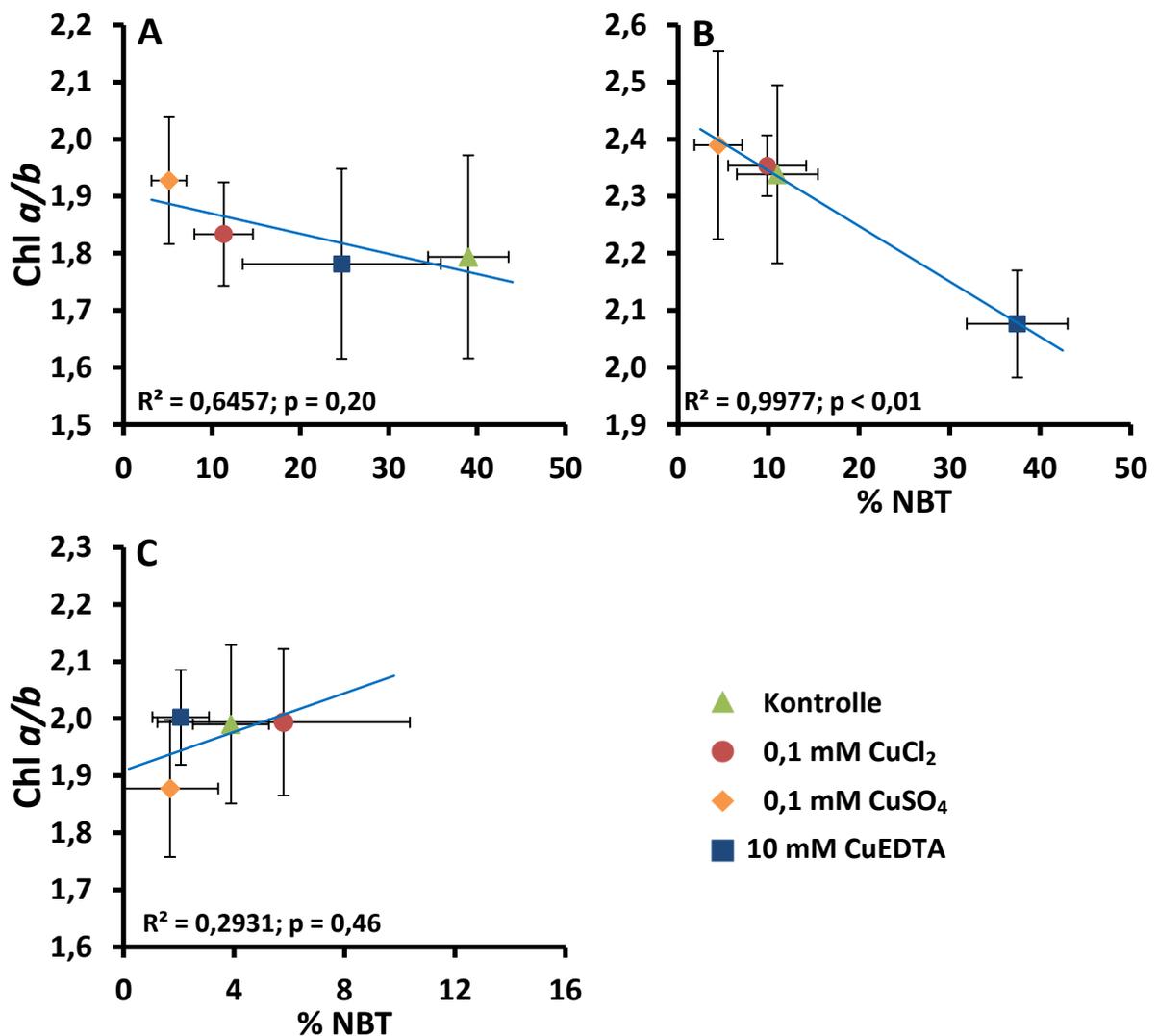


Abb. 45: Korrelationen zwischen der O_2^- -Bildung (NBT-Färbung in %) und dem Chl *a/b*-Verhältnis in A) *A. patens*, B) *M. elongata* und C) *P. drummondii*; *M. elongata* zeigte einen signifikanten negativen Zusammenhang zwischen NBT-Färbung und Chl *a/b* Verhältnis im gesamten Moos; in den beiden anderen Arten ist der Zusammenhang weniger deutlich; Fehlerbalken = 2x SE

P. drummondii zeigte sowohl nach einer Woche als auch nach sechs Wochen Kupferbehandlung kaum Unterschiede in den Chl *a/b*-Verhältnissen zwischen den einzelnen Ansätzen. Dieser Umstand könnte dadurch erklärt werden, dass weniger Kupfer entlang des Moores gefunden wurde und somit auch der Einfluss auf den Photosyntheseapparat weit geringer war als bei den anderen beiden Arten. Ein Vergleich des Chl *a/b*-Verhältnisses mit den NBT-Färbungen des gesamten Moores zeigte auch zum einen eine nur sehr geringe Färbung und zum anderen keine Korrelation (Abb. 44C).

Die Hypothese, dass stärker gestresste Moose ein kleineres Chl *a/b*-Verhältnis besitzen, konnte nur für *M. elongata* gezeigt werden. Das „Kupfermoos“ besaß unter den Kupferbedingungen höhere Werte, als die Kontrolle. Auf CuEDTA, welches das Kupfer im Komplex bindet, waren offenbar schlechtere Bedingungen für das Moos vorhanden und dadurch wurde auch das Verhältnis niedriger. Bei *A. patens* konnte kein deutlicher Trend gefunden werden, denn besonders nach CuCl₂ und CuSO₄ Behandlung hätte man niedrigere Verhältnisse erwartet. Bei *P. drummondii* konnte überhaupt kein Einfluß auf das Chl *a/b*-Verhältnis durch die verschiedenen Kupferverbindungen festgestellt werden.

Hypothese 3: Nach der Regenerationsphase von sechs Wochen kehren alle Moose zu ihren ursprünglichen durchschnittlichen Zellgrößen und Chl *a/b*-Verhältnissen zurück.

Nach der Regeneration waren bei *A. patens* die Zellen in den CuCl₂/CuSO₄ Verbindungen deutlich kleiner als die Kontrolle. Hier könnte das Moos durch die Folgen der Kupfervergiftung noch leichte Einbußen in der Zellentwicklung erlitten haben, was sich negativ auf die Zelllänge auswirkte. Dagegen befand sich das Chl *a/b*-Verhältnisse nach dem Überimpfung vom CuCl₂ und CuSO₄ auf Kontrollmedium auf dem gleichen Niveau wie die Kontrolle, was auf die Regeneration des Photosyntheseapparates nach der Kupferbehandlung hindeutete.

Die 0,1 mM und 10 mM CuEDTA Ansätze zeigten nach der Regeneration in *A. patens* signifikant größere Zellen und mehr zu Chl *a* verschobene Chl *a/b*-Verhältnisse im Vergleich zur Kontrolle. Dies deutete auf viel weniger Stress im Moos hin. So zeigt sich z.B. in *Hylocomium splendens*, dass Kationen aus den alten Segmenten in die jungen Segmente transferiert werden, um das Wachstum voranzutreiben (Brümelis & Brown, 1997). Aus demselben Grund könnte in *A. patens* durch das vermehrt in den Spitzenbereichen

angereicherte Kupfer ein Vorteil entstanden sein (siehe Kapitel 3.7), da dieses Kupfer nach der Überimpfung für das Wachstum von neugebildeten Moossegmenten in der Regeneration genutzt werden konnte.

Bei *M. elongata* entwickelten die Pflänzchen nach CuCl_2 bzw. CuSO_4 Behandlungen deutlich breitere Zellen als die Kontrolle. Das Chl *a/b*-Verhältnis lag hingegen im Bereich der Kontrolle.

Die CuEDTA-Ansätze dagegen zeigten große Unterschiede gegenüber der Kontrolle. Hier waren sowohl die Zellen größer als auch die Chl *a/b*-Verhältnisse leicht zum Chl *a* verlagert, was ebenfalls einen positiven Effekt des bei der Überimpfung angereicherten Kupfers auf das Moos vermuten lässt.

P. drummondii hatte nach der Regenerationsphase aus CuCl_2 und CuSO_4 beim Chlorophyll Werte um die Kontrolle. Der Unterschied zu *M. elongata* lag aber darin, dass hier die Zellen der CuCl_2 Behandlung deutlich größer und nur die der CuSO_4 Behandlung deutlich breiter waren als die Kontrolle. Somit führten die unterschiedliche Anionen bei *P. drummondii* zu einer unterschiedlichen Zellregeneration.

Auffällig waren wieder die CuEDTA-Ansätze, die gleich wie bei *A. patens* und *M. elongata* deutlich größere Zellen und etwas höhere Chl *a/b*-Verhältnisse hatten als die Kontrolle. Somit könnte auch hier der bereits oben beschriebene Effekt aufgetreten sein.

Die Hypothese, dass in der Regeneration die durchschnittlichen Zellgrößen und Chl *a/b*-Verhältnisse zum Kontrollwert zurückkehren, wurde nicht bestätigt. *A. patens* zeigte noch immer Einbußen im Zellwachstum. Bei *M. elongata* und *P. drummondii* entwickelten sich bei diesen Verbindungen größere Zellen und das Chl *a/b*-Verhältnis stieg auch leicht an. Besonders die Zellen nach der Regeneration der CuEDTA Behandlungen aller Moosarten waren deutlich größer und die Verhältnisse stärker zum Chl *a* verschoben, was für eine positive Anpassung in diesen Ansätzen sprach. Dabei dürfte der Hauptgrund beim in die Regeneration mitgeführten Kupfer liegen, welcher in allen drei Arten nach sechs Wochen Behandlung vermehrt im Spitzenbereich gefunden wurde.

Hypothese 4: Die Bereiche, in denen mehr Kupfer zu finden ist, weisen auch mehr oxidativen Stress in Form von Sauerstoffradikalen auf.

Bei *A. patens* war der Zusammenhang von Kupfer, der entlang des Stämmchens gemessen wurde, und oxidativem Stress zwischen den einzelnen Sauerstoffradikalarten sehr unterschiedlich. Die Färbung des O_2^- zeigte eine Abnahme im Basisbereich des $CuCl_2$ Ansatzes und im Basis- und Spitzenbereich des $CuSO_4$ Ansatzes gegenüber der Kontrolle. Das waren die Bereiche, wo eine fast 100%ige Färbung mit DAB zu finden war, was für eine hohe Aktivität der SOD sprechen würde, die entstandenes O_2^- sofort in H_2O_2 umwandelte. Das zeigen auch Wu *et al.* (2009) beim Moos *Plagiomnium cuspidatum*, wo bei erhöhten Kupferkonzentrationen ebenfalls vermehrt H_2O_2 durch die Umwandlung von O_2^- gebildet wird.

Die Pflänzchen der 10 mM CuEDTA-Behandlung waren im Vergleich zu den beiden $CuCl_2/CuSO_4$ Ansätzen beim O_2^- stärker gefärbt und erreichten gleiche Werte wie die Kontrolle. Beim DAB wurde hingegen eine stärkere Färbung als in den $CuCl_2$ Proben gefunden. Dies deutete darauf hin, dass das Kupfer trotz der Komplexierung durch das EDTA bei *A. patens* zu mehr Stress führte. Tubbing *et al.* (1994) erwähnen ebenfalls, dass trotz der Komplexierung des Kupfers durch EDTA dieses weiterhin für die Pflanze verfügbar ist. Aber dieser Stress schien für *A. patens* fördernd zu sein, denn er trug zu einer Steigerung des Wachstums bei, was auch die hohen Biomassezuwächse bestätigten (siehe Hypothese 2).

Die starke Färbung von O_2^- in der Kontrolle könnte hingegen ein Zeichen für Kupfermangel sein. So zeigen Droppa *et al.* (2003) bei *Beta vulgaris* (L.), dass bei Kupfermangel der Elektronentransport in PS I und PS II sowie zwischen beiden Photosystemen gehemmt ist. In weiterer Folge kann der Elektronenüberschuss zur Bildung von Superoxidradikalen in den Chloroplasten führen, was wiederum die hohe NBT-Färbung im Spitzenbereich erklären würde.

M. elongata zeigte nach $CuCl_2$ und $CuSO_4$ Behandlung bei der NBT-Färbung geringere Werte als die Kontrolle. Auch nach DAB-Färbung waren die Werte nur im Spitzenbereich des $CuCl_2$ Ansatzes höher. Dass bei *M. elongata* trotz der starken Anreicherung von Kupfer in den Basisbereichen dort keine Erhöhung von oxidativem Stress zu finden war, spricht für eine Exkludierung des Kupfers an der Außenwand.

Die Färbung im CuEDTA-Ansatz war hingegen sowohl beim NBT als auch beim DAB deutlich stärker als in der Kontrolle. Das verdeutlichte den starken Stress im Moos bei dieser Konzentration, der vorallem in der Fotodokumentation und in den Chlorophyllverhältnissen sichtbar war. Es fand sich aber keine stärkere Färbung in den Spitzenbereichen gegenüber der Basis, womit beim CuEDTA nicht von einer Korrelation des oxidativen Stresses mit den Kupfermengen auszugehen war. Besonders augenscheinlich war die sehr starke Färbung von O_2^- , welche sogar höher als die H_2O_2 Färbung war. Dies wies entweder auf eine starke Bildung von O_2^- oder auf eine schwache SOD-Aktivität hin. Hier kann die bereits erwähnte Komplexierung essentieller Kationen durch das EDTA eine Rolle spielen (Gebeleen *et al.*, 2002). Andererseits zeigen Tanaka *et al.* (1994) eine Inaktivierung der Cu/Zn-SOD in *Marchantia paleacea* var. *diptera* mit der Zugabe eines Kupfer-Chelators. Da das EDTA ebenfalls Kupfer bindete, könnte dies zur beobachteten Reduzierung der SOD-Aktivität geführt haben.

Bei *P. drummondii* war sowohl nach NBT- als auch nach DAB-Färbung nur im $CuCl_2$ Ansatz eine stärkere Färbung in den Stämmchen gegenüber der Kontrolle zu finden. Im $CuSO_4$ Ansatz waren die Werte wie bei *M. elongata* kleiner. Das Chlorid-Anion zeigte somit eine leicht höhere Stressbildung gegenüber dem Sulfat-Anion. Verglichen mit den EDX-Ergebnissen war im $CuSO_4$ Ansatz von *P. drummondii* aber auch weniger Kupfer gegenüber dem $CuCl_2$ zu finden. Trotzdem sind die Werte noch sehr gering wenn man sie den anderen Moosen gegenüber stellt. Außerdem zeigte *P. drummondii* bei diesem Ansatz die höchsten Pflänzchen, was ebenfalls zeigt, dass hier relativ wenig Stress auftrat.

Gleich wie bei *M. elongata* waren im 10 mM CuEDTA-Ansatz von *P. drummondii* trotz erhöhtem Kupfergehalt in der Spitze sowohl mit NBT als auch mit DAB die Basen stärker gefärbt als die Spitzen. Da die Zellen an der Basis aller Moospflänzchen älter sind und auch länger dem Kupfer ausgesetzt waren, entstanden hier wohlmöglich mehr Schäden an den Zellmembranen, was zur höheren Bildung von ROS führte. Zhang *et al.* (2008) zeigen in Wurzeln von *Elsholtzia haichowensis* (Y.Z.Sun) unter Kupferstress, dass diese erhöhte Bildung von O_2^- und H_2O_2 durch die zellmembrangebundene NADPH-Oxidase verursacht wird.

Vergleicht man jedoch die Höhen der NBT- und DAB-Werte in *P. drummondii* mit den jeweiligen Kontrollen, so zeigten die CuEDTA-Behandlungen kaum eine erhöhte Färbung, was wiederum gut mit der Entwicklung während der Fotodokumentation vereinbar war.

Die Hypothese, dass der oxidative Stress mit der Kupferanreicherung zusammen hängen könnte, wurde in den CuCl₂ und CuSO₄ Behandlungen vor allem durch das H₂O₂ gezeigt. *A. patens*, welches hohe Kupfermengen sowohl in der Basis als auch in der Spitze hatte, zeigte besonders hohe DAB-Werte in diesen Bereichen. Die angepassten Arten *M. elongata* und *P. drummondii* hatten dagegen mehr Färbung in der Basis, wobei allerdings die Werte der Kontrollen kaum überstiegen wurden.

Weiters zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Kupfermenge und oxidativem Stress nach CuEDTA Behandlung. Je höher die Menge insgesamt war, desto mehr oxidativer Stress wurde gefunden. Dennoch war trotz der höheren Kupferanreicherung (EDX) in den Spitzenbereichen die Färbung in den Basisbereichen (NBT/DAB) meist stärker. Dies spricht dafür, dass das Kupfer durch den EDTA-Komplex gebunden ist und nicht verstärkt in das Moos aufgenommen wird.

Hypothese 5: Die Unterschiede in den Kupfermengen zwischen Basis- und Spitzenbereich sind bei *A. patens* kleiner als bei *M. elongata* und *P. drummondii*, da dieses keine Strategie zur Kupferexkludierung besitzt.

Die Auswertung der Elementanalyse zeigte einen großen Unterschied zwischen *A. patens* und den beiden anderen Moosarten. Bei *A. patens* wurden nach CuCl₂ und CuSO₄ Behandlung sowohl in den Spitzen- als auch in den Basisbereichen signifikant höhere Kupferkonzentrationen gemessen als in der Kontrolle. Weiters war in diesen beiden Behandlungen zwischen den beiden Stammbereichen kein Unterschied feststellbar. Es waren auch anhand der Linienscans ersichtlich, dass das Kupfer in hohen Mengen entlang des gesamten Stämmchen zu finden war. Der Grund für die hohe Kupferanreicherung lag wahrscheinlich an der höheren Kationenaustauschkapazität (CEC) von *A. patens*. Büscher *et al.* (1990) zeigen, dass Moose, die auf Al-reichen Böden wachsen, weniger Kationenaustauschstellen besitzen, an die Al-Ionen binden können. Das Moos vermeidet somit die toxische Wirkung dadurch, dass die Aufnahmemöglichkeiten reduziert sind. Für *A. patens*, welches nicht an hohe Kupferkonzentrationen angepasst ist und daher wohl eine

hohe CEC besitzt, führte das zu einer stärkeren Anlagerung des Kupfers. Die erhöhte Außenkonzentration führte dann unweigerlich zu einer erhöhten Kupferaufnahme in die Pflänzchen.

Die Elementanalyse der Proben, die auf 0,1 mM CuEDTA Konzentration wuchsen, lag bei denselben Werten wie die Kontrolle. Dies bestätigt deutlich die anfänglich aufgestellte Annahme, dass das CuEDTA in dieser Konzentration kaum aufgenommen wird. Bei der 10 mM Konzentration wurde weitaus mehr Kupfer gemessen. Interessant war, dass der durchschnittlich gemessene Kupferanteil in der Spitze doppelt so hoch war wie in der Basis. Diese verstärkte Anreicherung von in Komplexen gebunden Kationen wurde schon in Arbeiten mit höheren Pflanzen gezeigt. So wiesen Jarvis und Leung in *Chamaecytisus proliferus* (L.f.) (2001) und auch in *Pinus radiata* (D. Don)(2002) eine erhöhte Anreicherung von PdEDTA in den oberirdischen Bereichen nach. Außerdem wird EDTA häufig in der Phytoremediation eingesetzt, um die Metallaufnahme in die Pflanze zu erhöhen (Chen & Cutright 2001; Madrid *et al.* 2003; Alkorta *et al.* 2004). Da das Kupferatom durch den EDTA-Komplex abgeschirmt ist, kann dieses nicht mehr mit der Zellwand reagieren und kann somit mit dem Wasserstrom in die oberen Bereiche transferiert werden. Dieser Effekt konnte hier anschaulich auch bei Moosen für Kupfer dargestellt werden. Doch ist die Anreicherung nicht proportional zum zugefügten Kupfer, denn trotz der 100-fach höheren Konzentration wurde nur 3-6 mal mehr Kupfer gemessen als im 0,1 mM CuEDTA. Dies lässt sich durch die tatsächliche Verfügbarkeit der freien Kupferionen erklären. So zeigen Sassmann *et al.* (2015), dass das Gametophytenwachstum von *A. patens* mit der Menge der freien Kationen zusammenhängt und diese beim 10 mM CuEDTA Ansatz im Vergleich mit dem 0,1 mM CuEDTA Ansatz nur um ca. das 10-fache höher ist. Dies ließ den Schluss zu, dass CuEDTA ungehindert zwischen Medium und Stämmchenaußenseite über den Wasserstrom ausgetauscht wurde, aber erst durch Austauschprozesse das Kation vom EDTA-Komplex frei und für die Kationenaustauschstellen verfügbar wurde.

Bei *M. elongata* waren nach CuCl_2 und im CuSO_4 Behandlung nur in der Basis die gemessenen Kupferwerte deutlich höher als in der Kontrolle. Die Spitzen zeigten hingegen keine Erhöhung, was auf weniger Kationenaustauschstellen entlang des Stämmchens hindeutete. Auch die Linienscans entlang der Stämmchen dieser Ansätze zeigten eine sehr rasche (nicht lineare) Abnahme des Kupfers, obwohl die Stämmchen nur wenige Millimeter

groß waren und somit die Anlagerung von Kupfer durch die Wassersogwirkung möglich wäre. Außerdem ist der Boden im Bereich der Schwarzwand, auf dem *M. elongata* wächst meist sauer (pH 5,8-6,5; Sissolak, 1984), was in Anlehnung an Büscher *et al.* (1990) für eine geringe CEC spricht. Ähnliche Ergebnisse zeigen Vázquez *et al.* (1998) bei aquatischen Moosen, wo die azidophilste Art die geringste extrazelluläre Kupferanreicherung besitzt.

Bei Proben auf 0,1 mM CuEDTA war bei *M. elongata* ebenfalls kein Unterschied zur Kontrolle ersichtlich. Auch hier konnte erst beim 10 mM Ansatz eine starke (4-5-fach stärkere) Aufnahme festgestellt werden. Dabei zeigte sich ebenfalls wie bei *A. patens* eine stärkere Verlagerung des Kupfers in die Spitze des Stämmchens.

P. drummondii hatte gleich wie *M. elongata* nur in den Basisbereichen signifikant höhere Kupferwerte als die Kontrolle. Somit dürfte hier ebenfalls eine stärkere Adsorption des Kupfers in der Basis stattfinden. Bei Versuchen mit Zink ist bei *P. drummondii* eine starke Anreicherung des Zinks an der Plasmamembran gezeigt worden (Lang *et al.*, 2011). Dies konnte auch mit anderen Metallen an anderen Moosen bestätigt werden (Basile *et al.*, 2012), weshalb auch für das Kupfer eine starke Bindung an die Plasmamembran anzunehmen ist.

Im Gegensatz zu *A. patens* und *M. elongata* waren auch die Kupferwerte der 0,1 mM CuEDTA Proben leicht höher als die Kontrolle. Des Weiteren konnte schon bei dieser Konzentration eine größere Menge an Kupfer in der Spitze gemessen werden. Gegenüber der 100-fach höheren Kupferkonzentration im 10 mM CuEDTA Medium stieg der prozentuelle Anteil aber nur um das 2-3-fache, doch war auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen Basis und Spitze auszumachen. Es schien aber als würde *P. drummondii*, auch anhand der Linienscans, viel weniger Kupfer bei der CuEDTA-Behandlung aufnehmen als die andern beiden Arten. Wenn man nun die pH-Werte unter den natürlichen Bedingungen von *P. drummondii* an der Schwarzwand berücksichtigt, die bei pH 4,0-4,4 liegen (Sissolak, 1984), kann hier auch ein Zusammenhang zwischen CEC und pH-Wert festgestellt werden. Somit ergab sich die geringe Anreicherung von Kupfer aufgrund der ebenfalls geringen CEC von *P. drummondii*.

Desweiteren stimmen die hier gemessenen Verteilungen in den Stämmchen von *M. elongata* und *P. drummondii* mit den Elementanalysen der auf der Schwarzwand vorkommenden Moosen überein, wo ebenfalls eine stärkere Anreicherung des Kupfers an der Basis gezeigt

wird (Hörmann, 2001; Hus, 2008). Gegenüber den natürlichen Standorten, wo sowohl Trockenperioden als auch Niederschläge die Menge des aufgenommenen Wassers beeinflussen, waren die Moose im Labor einer gesättigten Luft ohne große Temperaturschwankungen ausgesetzt. Dadurch war der Durchsatz an Kationen entlang des Stämmchens wahrscheinlich geringer als bei den Moosen der natürlichen Standorte, die höhere Kupferwerte in der Elementanalyse aufwiesen.

Die Hypothese, dass die Unterschiede zwischen dem Basis- und Spitzenbereich für *A. patens* kleiner sind als für *M. elongata* und *P. drummondii*, konnte in den CuCl_2 und CuSO_4 -Behandlungen bestätigt werden. So besaß *A. patens* in beiden Bereichen gleich hohe Kupferwerte, wo hingegen die Werte bei den beiden anderen Moosarten nur an der Basis erhöht waren. Somit hielten die angepassten Moosarten das Kupfer in der Basis zurück, was *A. patens* nicht konnte. Bei den EDTA Ansätzen war nur bei *P. drummondii* in beiden Konzentrationen ein signifikanter Unterschied zwischen Basis und Spitze feststellbar. *A. patens* und *M. elongata* zeigten zwar in der 10 mM CuEDTA Konzentration starke Unterschiede zwischen beiden Bereichen, doch schwankten die Werte hier auch sehr stark. Allen gemein war aber die stärkere Anreicherung von Kupfer im Spitzenbereich, was deutlich für die hohe Mobilität des CuEDTAs sprechen würde.

6.1 Zusammenfassende Betrachtung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten deutlich, dass vor allem zwischen *A. patens* und *M. elongata* große Unterschiede herrschten und die verschiedenen Moosarten doch sehr spezifisch reagierten. Dabei musste sorgfältig zwischen den Ansätzen unterschieden werden, da auch große Unterschiede zwischen $\text{CuCl}_2/\text{CuSO}_4$ und EDTA-Verbindungen gefunden wurden. *P. drummondii* wies hingegen die geringsten Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen auf.

A. patens zeigte bereits in der Fotodokumentation, dass das Wachstum auf Medien mit CuCl_2 und CuSO_4 negative Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit hatte. Dies ließ sich vor allem durch die starke Anreicherung des Kupfers entlang des Stämmchens bis zur Spitze hin erklären. Hierbei spielte die wahrscheinlich hohe CEC des Moooses eine Rolle. Die starke Anreicherung an extrazellulärem Kupfer führte dann zu einer höheren Aufnahme in die Zelle.

Das aufgenommene Kupfer löste infolge die Bildung von H_2O_2 und O_2^- im gesamten Moos aus, was wohl weitergehend zu erhöhter Schädigung von Membranen und verminderter Aktivität von Enzymen führte. Diese Auswirkungen zeigten sich sowohl in der reduzierten Wuchshöhe als auch anhand der extrahierbaren Chlorophyllmenge. Somit wurde deutlich, dass *A. patens* ein kupfersensitives Moos ist, dem spezielle Anpassungen an Substrate mit erhöhter Kupfermenge fehlen.

Überraschend waren die Ergebnisse der CuEDTA-Ansätze. Trotz der hohen Kupferanreicherung entlang des gesamten Moooses profitierte *A. patens* bei der Wuchshöhe, denn hier waren die Pflänzchen deutlich größer als die Kontrolle. Aber es zeigten sich doch auch Auswirkungen durch das erhöhte Kupfer. Sowohl bei der Zellgröße als auch bei der Bildung von Radikalen waren schlechtere Werte gegenüber der Kontrolle ersichtlich. Dennoch schien dieser *eu-stress* auf lange Sicht förderlich auf das Moos zu wirken.

Anders als *A. patens* zeigte *M. elongata* eine gegensätzliche Entwicklung in der CuCl_2 und CuSO_4 Behandlung. Besonders die Verteilung des Kupfers entlang des Stämmchen von *M. elongata* war beachtenswert. Hier nahm die Konzentration in beiden Medien sehr schnell ab, sodass in den Spitzenbereichen kaum noch Kupfer zu finden war. Dies deutete auf eine geringe CEC des Moooses in den oberen Stammbereichen hin. Insgesamt zeigten die Pflänzchen der Kupferbehandlung in vielerlei Hinsicht bessere Entwicklungen als die Kontrolle; angefangen von der größeren Wuchshöhe über die größeren Zellen bis hin zur geringeren Bildung von Sauerstoffradikalen. Diese Ergebnisse bestätigten die Tatsache, dass *M. elongata* eine an Kupfer angepasste Moosart ist.

Beim CuEDTA zeigte *M. elongata* sehr starke negative Veränderungen. Zwar wirkten sich diese Kupferverbindung positiv auf Wachstumshöhe und Zellgröße aus, aber nicht auf die Entwicklung neuer Gametophyten. Es wurde auch mehr oxidativer Stress im Moos gefunden als in der Kontrolle, was sich auch auf das Chl *a/b*-Verhältnis auswirkte, welches mehr zum Chl *b* verschoben war. Der Stress durch das CuEDTA hatte somit bei *M. elongata* größere Auswirkungen auf die Zellphysiologie als bei *A. patens*.

P. drummondii besaß im Vergleich zu den anderen beiden Moosarten im CuCl_2 und CuSO_4 Ansatz kaum Unterschiede zur Kontrolle. Nur die Wuchshöhe war in beiden Medien höher als die Kontrolle und das CuCl_2 bewirkte etwas höhere Werte bei den Sauerstoffradikalen.

Insgesamt zeigte *P. drummondii* keine physiologischen Einbußen durch die angebotenen Kupferkonzentrationen und profitierte in ähnlicher Weise wie *M. elongata*.

Auch beim CuEDTA zeigte *P. drummondii* die geringsten Unterschiede zur Kontrolle. Bei der Wuchshöhe zeigte nur der 0,1 mM Ansatz größere Pflänzchen mit längeren Zellen und der 10 mM CuEDTA hatte breitere Zellen. Ansonsten waren bei der Färbung von ROS und beim Chl *a/b*-Verhältnis kaum Unterschiede zur Kontrolle erkennbar. Auch wurde in der Elementanalyse im Vergleich mit den anderen Moosarten am wenigsten Kupfer entlang des Stämmchens gefunden. Hierbei dürfte wohl auch die niedrige CEC des Moooses eine wichtige Rolle spielen.

Bei der Regeneration waren zwei Trends zu erkennen, die in allen drei Moosarten gleich sind. Zum einen kehrten die Chl *a/b*-Verhältnisse und Zellgrößen in den CuCl₂ und CuSO₄ Ansätzen meist zu den ursprünglichen Werten zurück, was stark für eine erfolgreiche Regeneration spricht. Zum anderen zeigten die CuEDTA-Ansätze nach der Regeneration deutlich bessere Ergebnisse als die Kontrolle, wie z.B. höhere Chl *a/b*-Verhältnisse und größere Zellen. Dabei nutzte das Moos wahrscheinlich nach dem Überimpfen auf das Kontrollmedium das angereicherte Kupfer entlang des Stämmchens für den Stoffwechsel.

6.2 Weiterführende Forschungsthemen

Ein interessantes weiterführendes Forschungsthema wäre unter anderem die Untersuchung der Aufnahmefähigkeit von Kupfer in die Zelle. Das REM-EDX zeigte deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Stammbereichen und Kupferbehandlungen auf, doch konnte nicht bestimmt werden, wie viel Kupfer an den Zellwänden angelagert war und wie viel in die Zellen tatsächlich aufgenommen wurde. Mithilfe von Querschnitten in den entsprechenden Stammbereichen könnte mit dem EDX genauer zwischen Zelle und Zellwand unterschieden und deren Elementzusammensetzung untersucht werden.

Außerdem wäre die Untersuchung der photosynthetischen Leistung der Moose ergänzend zu den hier beschriebenen Chl *a/b*-Verhältnissen mit Fluoreszenz-Messgeräten interessant. Der Vorteil wäre hier, dass die Moose nicht getötet werden müssen, wodurch dieselben Moose kontinuierlich und auch in kürzeren Intervallen untersucht werden könnten ohne wiederholt Pflanzenmaterial zu züchten.

Eines der wichtigsten Themen wäre aber die Untersuchung der Proteinausstattung der drei Moose im Vergleich mit dem Schwerpunkt auf kupferhaltige Enzyme. Zum einen könnte man untersuchen, ob *M. elongata* als Kupfermoos mehr kupfer-assoziierte Enzyme besitzt und zum anderen, wie sich ein Kupferdefizit auf den Stoffhaushalt auswirkt.

Auch wäre eine vergleichende Untersuchung der Moose auf verschiedene Enzyme hin spannend, die an der Reduzierung von ROS beteiligt sind (z.B. Katalasen, Peroxidasen,...). Hierbei könnte man auch unterschiedliche Metalle verwenden und deren Auswirkung auf die Ausbildung von ROS untersuchen.

7 Literatur

- Alkorta I, Hernández-Allica J, Becerril JM, Amezaga I, Albizu I, Onaindia M, & Garbisu C (2004). Chelate-enhanced phytoremediation of soils polluted with heavy metals. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 3: 55–70
- Apel K & Hirt H (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373–399
- Baker AJM (1981). Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, 3: 643–654
- Barón M, Arellano J, & Gorgé J (1995). Copper and photosystem II: a controversial relationship. *Physiologia Plantarum*, 94:174–180
- Basile A, Sorbo S, Pisani T, & Paoli L (2012). Bioaccumulation and ultrastructural effects of Cd, Cu, Pb and Zn in the moss *Scorpiurum circinatum* (Brid.) Fleisch. & Loeske. *Environmental Pollution*, 166: 208–211
- Baszyński T, Tukendorf A, Ruszkowska M, Skórzyńska E, & Maksymiec W (1988). Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper. *Journal of Plant Physiology*, 132: 708–713
- Benecke W (1903). Über die Keimung der Brutknospen von *Lunularia cruciata*. Mit vergleichenden Ausblick auf andere Pflanzen. *Botanische Zeitung*, 2: 4–46
- Breuer K, & Melzer A (1990). Heavy metal accumulation (lead and cadmium) and ion exchange in three species of *Sphagnaceae*, I. Main principles of heavy metal accumulation in *Sphagnaceae*. *International Association for Ecology*, 4: 461-467
- Brown SL, Chancy RL, Angle JS, & Baker AJ (1995). Zinc and Cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown in nutrient solution. *Soil Science Society of America Journal*, 59: 125–133
- Brümelis G & Brown DH (1997). Movement of metals to new growing tissue in the moss *Hylocomium splendens* (Hedw.) BSG. *Annals of Botany*, 79: 679–686.
- Bruns I, Sutter K, Menge S, Neumann D, & Krauss G (2001). Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes. *Journal of Plant Physiology*, 158: 79–89
- Büscher BP, Koedam N, & Van Speybroeck D (1990). Cation-exchange properties and adaptation to soil acidity in bryophytes. *New Phytologist*, 115: 177–186

- Chen H, & Cutright T (2001). EDTA and HEDTA effects on Cd, Cr, and Ni uptake by *Helianthus annuus*. *Chemosphere*, 45: 21–28
- Cook CM, Kostidou A, Vardaka E, & Lanaras T (1997). Effects of copper on the growth, photosynthesis and nutrient concentrations of *Phaseolus* plants. *Photosynthetica* 34: 179–193
- Cove D (2005). The moss *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Genetics*, 39: 339–358
- De DN (2000). Plant cell vacuoles: An introduction. CSIRO Publishing, Collingwood
- De Temmerman LO, Hoenig M, & Scokart PO (1984). Determination of “normal” levels and upper limit values of trace elements in soils. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 147: 687–694.
- Droppa M, Terry N, & Horvath G (1984). Effects of Cu deficiency on photosynthetic electron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81: 2369–2373
- Duffus JH (2002). “Heavy Metals” - a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74: 793–807
- During HJ (1992). Ecological classifications of bryophytes and lichens. In: Bates JW & Farmer AM (Hrsg.) *Bryophytes and lichens in a changing environment*. Clarendon Press, Oxford, 1–31
- Gang YY, Du GS, Shi DJ, Wang MZ, Li XD & Hua ZL (2003). Establishment of *in vitro* regeneration system of the *Atrichum* mosses. *Acta Botanica Sinica*, 45: 1475–1480
- Gecheva G & Yurukova L (2008). Chlorophyll response of aquatic moss *Fontinalis antipyretica* Hedw. to Cu, Cd and Pb contamination ex situ. *Proceedings of Anniversary Scientific Conference of Ecology*, 1: 293–299.
- Geebelen W, Vangronsveld J, Adriano DC, Van Poucke LC, & Clijsters H (2002). Effects of Pb-EDTA and EDTA on oxidative stress reactions and mineral uptake in *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 115: 377–384
- Gerstmann S (2010). *In vitro* Kultur des Metallophyten *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). Kulturmedien und Applikation toxischer Schwermetalle. *Cell Imaging and Ultrastructure Research*, Dissertation an der Universität Wien, Wien
- Glime JM (2007). *Bryophyte ecology*, Volume 1. *Physiological ecology*. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists, abgerufen am 17.2.2015

- Hörmann D (2001). Schwermetallanalyse bei Kupfermoosen, Über die Elementverteilung in Moospflanzen. Cell Imaging and Ultrastructure Research, Dissertation an der Universität Wien, Wien
- Hus K (2008). Die Aufnahme und Verteilung von Schwermetallen in Kupfermoosen der Schwarzwand/Salzburg, Cell Imaging and Ultrastructure Research, Dissertation an der Universität Wien, Wien
- Jarvis MD & Leung DWM (2001). Chelated lead transport in *Chamaecytisus proliferus* (L.f.) link ssp. *proliferus* var. *palmensis* (H. Christ): an ultrastructural study. *Plant Science*, 161: 433–441
- Jarvis MD & Leung DWM (2002). Chelated lead transport in *Pinus radiata*: an ultrastructural study. *Environmental and Experimental Botany*, 48: 21–32
- Jabs T, Dietrich RA, & Dangl JL (1996). Initiation of runaway cell death in an Arabidopsis mutant by extracellular superoxide, *Science*, 273: 1853–1856
- Kaho H (1933). Das Verhalten der Pflanzenzelle gegen Schwermetallsalze. *Planta* 18: 664–682.
- Kieselbach T, Hagman Å, Andersson B, & Schröder WP (1998). The thylakoid lumen of the chloroplasts: isolation and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 6710–6716
- Klein M, Frommer WB, & Ludewig U (2003). Various ion channels in leaf protoplasts from the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Science*, 164: 657–664
- Krämer U (2010). Metal hyperaccumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 517–534
- Knudson LL, Tibbitts TW, & Edwards GE (1977). Measurement of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration. *Plant Physiology*, 60: 606–608
- Lang I & Wernitznig S (2011). Sequestration at the cell wall and plasmamembrane facilitates zinc tolerance in the moss *Pohlia drummondii*. *Environmental and Experimental Botany*, 74: 186–193
- Leustek T, & Saito K (1999). Update on biochemistry sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiology*, 120: 637–643
- Lichtenthaler HK (1996). Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*, 148: 4–14

- Lichtenthaler HK (1988). *In vivo* chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection in plants. In: Lichtenthaler HK (Hrsg.) Applications of Chlorophyll Fluorescence. Kluwet Academic Publishers, Dordrecht, 129–142
- Lichtenthaler HK (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350–382
- Lidon FC & Henriques FS (1991). Limiting step on photosynthesis of rice plants treated with varying copper levels. *Journal of Plant Physiology*, 138: 115–118
- Lopez J & Carballeira A (1989). a comparative study of pigment contents and response to stress in five species of aquatic bryophytes. *Lindbergia*, 15: 188–194
- MacFarlane GR (2003). Chlorophyll *a* fluorescence as a potential biomarker of zinc stress in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70: 90–96
- Madrid F, Liphadzi MS, & Kirkham MB (2003). Heavy metal displacement in chelate-irrigated soil during phytoremediation. *Journal of Hydrology*, 272: 107–119
- Mishra S & Dubey R (2005). Heavy metal toxicity induced alterations in photosynthetic metabolism in plants. In: Pessaraki M (Hrsg.) *Handbook of Photosynthesis*, Second Edition. Taylor & Francis Group LLC, Florence, 129–142
- Nebel & Philippi (Hrsg.) (2001). *Die Moose Baden-Württembergs*, Bd. 2., Stuttgart: Ulm
- Panou-Filotheou H, Bosabalidis AM, & Karataglis S (2001). Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). *Annals of Botany*, 88: 207–214
- Prasad MNV & Strzałka K (Hrsg.) (2002). *Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht
- Proctor MCF (2008). Mosses and alternative adaptation to life on land. *New Phytologist*, 148: 1–3
- Proctor MCF (2001). Patterns of desiccation tolerance and recovery in bryophytes. *Plant Growth Regulation*, 35: 147–156
- Rausser WE (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 31: 19–48
- Raven JA, Griffiths H, Smith EC, & Vaughn KC (1998). New perspectives in the biophysics and physiology of bryophytes. In: Bates JW, Ashton NW & Duckett JG (Hrsg.) *Bryology in the Twenty-first Century*. Maney Publishing and the British Bryological Society, UK, 261–275

- Rühling Å & Tyler G (1970). Sorption and retention of heavy metals in the woodland moss *Hylocomium splendens* (Hedw.) Br. et Sch. *Oikos*, 21: 92–97
- Ruibal C, Salamó IP, Carballo V, Castro A, Bentancor M, Borsani O, & Vidal S (2012). Differential contribution of individual dehydrin genes from *Physcomitrella patens* to salt and osmotic stress tolerance. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 190: 89–102
- Sassmann S, Adlassnig W, Puschenreiter M, Cadenas EJP, Leyvas M, Lichtscheidl IK, & Lang I (2015). Free metal ion availability is a major factor for tolerance and growth in *Physcomitrella patens*. *Environmental and Experimental Botany*, 110: 1–10
- Sassmann S, Wernitznig S, Lichtscheidl I, & Lang I (2010). Comparing copper resistance in two bryophytes: *Mielichhoferia elongata* Hornsch. versus *Physcomitrella patens* Hedw. *Protoplasma* 246: 119–123
- Scandalios JG (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 101: 7–12
- Schäfer DG & Zrýd JP (2001). The moss *Physcomitrella patens*, now and then. *Plant Physiology*, 127: 1430–1438
- Shakya K, Chettri MK, & Sawidis T (2008). Impact of heavy metals (copper, zinc, and lead) on the chlorophyll content of some mosses. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54: 412–421
- Sharma SS & Dietz KJ (2009). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science*, 14: 43–50
- Shaw AJ (1994). Adaptation to metals in widespread and endemic plants. *Environmental Health Perspectives*, 102: 105–108
- Shaw AJ (1987). Evolution of heavy metal tolerance in bryophytes, II. An ecological and experimental investigation of the “copper moss,” *Scopelophila cataractae*. *American Journal of Botany*, 74: 813–821.
- Shenker M, Plessner OE, & Tel-Or E (2004). Manganese nutrition effects on tomato growth, chlorophyll concentration, and superoxide dismutase activity. *Journal of Plant Physiology*, 161: 197–202
- Sidhu M & Brown DH (1996). A new laboratory technique for studying effects of heavy metals on bryophyte growth. *Annals of Botany*, 78: 711–717
- Sillanpää M & Oikari A (1996). Assessing the impact of complexation by EDTA and DTPA on heavy metal toxicity using Microtox bioassay. *Chemosphere* 32: 1485–1497

- Sissolak M (1984). Ökophysiologische Untersuchungen von Pflanzen an kupferbelasteten und unbelasteten Standorten im Gebiet von Hüttschlag (Salzburg). Cell Imaging and Ultrastructure Research, Dissertation an der Universität Wien, Wien
- Takács Z, Tuba Z, & Smirnoff N (2001). Exaggeration of desiccation stress by heavy metal pollution in *Tortula ruralis*: a pilot study. Plant Growth Regulation, 35: 157–160
- Tanaka K, Takio S, & Satoh T (1995). Inactivation of the cytosolic Cu/Zn-Superoxide Dismutase induced by copper deficiency in suspension-cultured cells of *Marchantia paleacea* var. *diptera*. Journal of Plant Physiology, 146: 361–365
- Terry N (1980). Limiting factors in photosynthesis: I. Use of iron stress to control photochemical capacity in vivo. Plant Physiology, 65: 114–120
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wie Y, & Collinge DB (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. The Plant Journal, 11: 1187–1194
- Tubbing DMJ, Admiraal W, Cleven RFMJ, Iqbal M, van de Meent D, & Verweij W (1994). The contribution of complexed copper to the metabolic inhibition of algae and bacteria in synthetic media and river water. Water Research, 28: 37–44
- Vázquez MD, López J, & 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
- Viljevac M, Krunoslav D, Ines M, Domagoj Š, Rezica S, Zorica J, & Hrvoje L (2013). Chlorophyll content, photosynthetic efficiency and genetic markers in two sour cherry (*Prunus cerasus* L.) genotypes under drought stress. Acta Botanica Croatica, 72: 221–235
- Wernitznig S (2009). Die schwermetalltoleranten Moose *Mielichhoferia elongata* und *Pohlia drummondii* und ihre Reaktion gegenüber Schwermetallstress, Cell Imaging and Ultrastructure Research, Dissertation an der Universität Wien, Wien
- Wu Y, Chen Y, Yi Y, & Shen Z (2009). Responses to copper by the moss *Plagiomnium cuspidatum*: hydrogen peroxide accumulation and the antioxidant defense system. Chemosphere, 74: 1260–1265
- Yurela I, Pueyo JJ, Alonso PJ, & Picorel R (1996). Photoinhibition of photosystem II from higher plants. Effect of copper inhibition. Journal of Biological Chemistry, 271: 27408–27415
- Yurela I (2005). Copper in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology, 17: 145–156

Zhang H, Xia Y, Wang G, & Shen Z (2008). Excess copper induces accumulation of hydrogen peroxide and increases lipid peroxidation and total activity of copper-zinc superoxide dismutase in roots of *Elsholtzia haichowensis*. *Planta*, 227: 465–475

7.1 Abkürzungen

CEC	Kationenaustauschkapazität
Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>
Chl <i>a/b</i>	Chlorophyll <i>a</i> / Chlorophyll <i>b</i>
Chl <i>b</i>	Chlorophyll <i>b</i>
CuEDTA	Kupfer-Ethylendiamintetraessigsäure
DAB	3,3-Diaminobenzidin
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
O₂⁻	Superoxid-Anion
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
REM	Rasterelektronenmikroskop
ROS	reaktive Sauerstoffradikale
SOD	Superoxid-Dismutase

8 Publikationen

8.1 Austrian Society of Plant Biology, Lunz am See

Uptake and localization of copper in three different moss species

Sebastian J. Antreich⁽¹⁾, Stefan Sassmann⁽¹⁾, Marieluise Weidinger⁽¹⁾,

Irene K. Lichtscheidl⁽¹⁾ and Ingeborg Lang⁽¹⁾

(1) Cell Imaging and Ultrastructure Research, The University of Vienna, Althanstraße 14,
A-1090 Vienna, Austria

Higher plants growing on heavy metal contaminated sites can be classified into excluders or accumulators, depending on whether the root serves as a barrier against heavy metal uptake or not. For mosses, this classification is not applicable due to the absence of a root system and the potential uptake of nutrients and water *via* the whole moss surface. In this experiment, the influence of different copper media on the allocation of the metal in three different mosses were compared.

For this purpose, the mosses were grown on agar medium supplemented with 0.1 mM CuCl₂, 0.1 mM CuSO₄, 0.1 mM or 10 mM Cu-ethylenediaminetetraacetate (CuEDTA), respectively. After six weeks the mosses were harvested, dried and the top and bottom parts of the stem were analyzed by means of energy dispersive X-ray microanalysis (EDX). In the CuCl₂ and CuSO₄ treatments, *Pohlia drummondii* and *Mielichhoferia elongata* both showed a strong decrease of copper from the base toward the top parts of the stem, while in contrast *Aphanorhegma patens* presented constant high amounts in both parts. In all three species, treatment with 10 mM CuEDTA resulted in more copper in the top parts of the stem than in the bottom parts. Especially in *P. drummondii*, the amount in the top was significantly higher than in the bottom parts. In this species, the same trend could also be observed in the 0.1 mM CuEDTA treatment, whereas the other two moss species showed no difference.

The copper adapted species *P. drummondii* and *M. elongata* strongly excluded the copper in the CuCl₂ and CuSO₄ treatment from the top parts. This was probably caused by the strong absorbance capacity of the outer cell walls. In contrast, the metal sensitive *A. patens* seemed to not have such a strong exclusion ability, which was supported by the fact that many moss plantlets died before the sixth week. The strong accumulation of copper in the EDTA treatments likely resulted from the shielding of the Cu²⁺ by the EDTA⁴⁻ and therefore its easier penetration into the moss. As the shielded Cu²⁺ could not bind to cell walls, it was transferred into the top parts of the stem together with the water flow.

In conclusion, it was shown that the heavy metal adapted mosses *P. drummondii* and *M. elongata* were able to exclude copper from the sensitive growing bud in contrast to the non-adapted control moss *A. patens*.

Acknowledgement: This study was funded by the ÖAD project APPEAR 43/BIOREM

Uptake and localization of copper in three different moss species

Sebastian J. Antreich, Stefan Sassmann, Marieluise Weidinger, Irene K. Lichtscheidl and Ingeborg Lang

University of Vienna, Core Facility Cell Imaging and Ultrastructure Research, Althanstraße 14, A-1090 Vienna, Austria

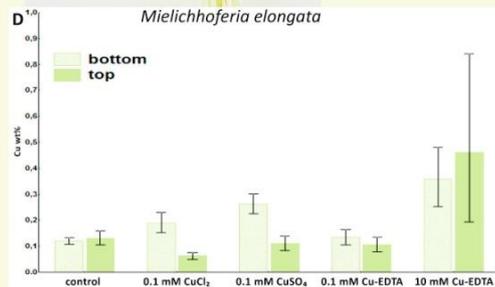
email: sebastian.antreich@univie.ac.at

Introduction

Flowering plants of metal contaminated habitats can be classified into excluders or accumulators, depending on whether the root serves as a barrier against heavy metal uptake or not. For mosses, this classification is not applicable due to the absence of a proper root system; nutrients and water are taken up via the whole moss surface. Specialised mosses are able to grow on heavy metal sites. In this experiment, the allocation of different copper compounds in the moss *Aphanorhegma patens* (syn. *Physcomitrella patens*), a model for many physiologic and genetic questions, was compared with two metal adapted species *Mielichhoferia elongata* and *Pohlia drummondii*.



(C) habitus of the moss *M. elongata* (scale bar: 1 mm)



(D) & (F) EDX results of each treatment in weight percent (wt%) copper, comparing the bottom with the top parts of the moss (error bars: 95% confidence interval)

Discussion

The copper adapted species *P. drummondii* and *M. elongata* strongly excluded the copper from the top parts in the CuCl₂ and CuSO₄ treatments. This indicates a strong absorbance capacity of the outer cell walls which has been already observed for zinc [1]. In contrast, *A. patens* was lacking such effective exclusion ability and showed also high amounts of copper in the top parts. The same concentration of EDTA-complexed copper had

no strong effect on the uptake of the metal. The accumulation of copper in the top parts in the 10 mM Cu-EDTA treatments possibly resulted from the chelation of copper by the EDTA-complex causing easier translocation into the moss. This effect was already shown for flowering plants, where lead chelated with EDTA increased the translocation into the shoot [2]. As the EDTA-complex lowered the binding to cell walls, it was transferred into the top parts of the stem together with the water flow.

Acknowledgement

Many thanks are due to W. Adlassnig. This study was funded by the ÖAD project APPEAR 43/BIOREM.



universität wien



References

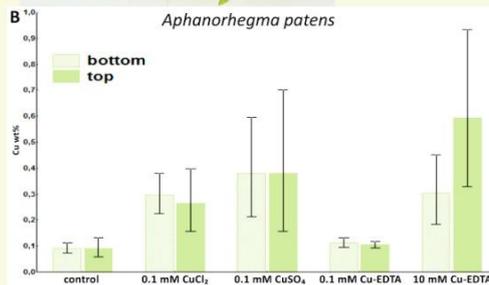
- [1] Lang I & Wernitznig S (2011), Sequestration at the cell wall and plasmamembrane facilitates zinc tolerance in the moss *Pohlia drummondii*. Environmental and Experimental Botany, 74, 186–193
- [2] Jarvis MD & Leung DWM (2002), Chelated lead transport in *Pinus radiata*: an ultrastructural study. Environmental and Experimental Botany, 48, 21–32

Method

The three moss species were grown on agar supplemented with 0.1 mM CuCl₂, 0.1 mM CuSO₄, 0.1 mM or 10 mM Cu-ethylenediaminetetraacetate (Cu-EDTA). After six weeks the mosses were harvested, dried and the top and bottom parts of the stem were analyzed by means of energy dispersive X-ray microanalysis (EDX), n = 8-14. Differences were statistically analysed with Student t-test for significance.



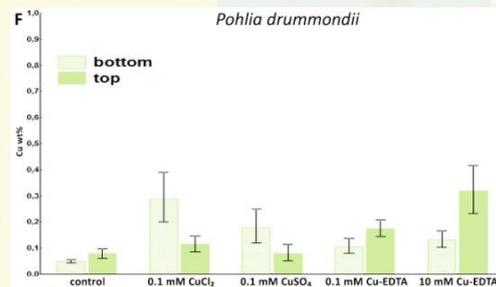
(A) habitus of the moss *A. patens* (scale bar: 1 mm)
(B) EDX results of each treatment in weight percent (wt%) copper, comparing the bottom with the top parts of the moss (error bars: 95% confidence interval)



Conclusion
In contrast to the non-adapted control moss *A. patens* the heavy metal adapted mosses *P. drummondii* and *M. elongata* were able to exclude copper from the sensitive growing bud.



(E) habitus of the moss *P. drummondii* (scale bar: 1 mm)



20th Meeting of the Austrian Society of Plant Biology (ATSPB)
Lunz am See, June 19 – 21, 2014
BEST POSTER AWARD
★ 1st Place ★

8.2 Focus on Microscopy, Sydney

METAL TOLERANCE STRATEGIES OF MOSSES DIFFER AT THE CELLULAR LEVEL

Sebastian Antreich, Stefan Sassmann, Stefan Wernitznig, Marieluise Weidinger, Ingeborg Lang

Cell Imaging and Ultrastructure Research, The University of Vienna, Austria Althanstrasse 14, A-1090 Vienna, Austria

E-mail : ingeborg.lang@univie.ac.at

KEY WORDS: Bryophytes, heavy metal tolerance, living cells, starch, CLSM, fluorescence labelling, polarized light, TEM, x-ray microanalysis

ABSTRACT

Many mosses inhabit ecological niches and have adapted to stress conditions like drought, irradiation, flooding or metal contamination. Our growth data on zinc spiked substrate show a very similar behaviour of *Physcomitrella patens* and *Pohlia drummondii*. However, specific dyes as well as diverse microscopy methods indicate different tolerance strategies at the cellular level. Fluorescence labelling with the zinc-specific dye FluoZin3 shows the retention of the metal in the cell wall of *P. drummondii* which might enable the occurrence of this species at former mining sites [1]. In *P. patens*, normally living at non-contaminated sites, the zinc-specific dye enters the cell and is apparently scavenged in the cytoplasm. Recent x-ray microanalyses confirm this phenomenon: mosses from metal habitats show less uptake than *P. patens*. In a new set of experiments, we are now analysing the influence of metal contamination on the photosynthetic pathway. In control cells, autochthonic starch can be detected at the TEM-level (Fig. 1) as well as by the use of polarized light microscopy or specific dyes like Lugol's iodine and safranin. On copper and zinc spiked media, less autochthonic starch grains are observed in the chloroplasts. Interestingly, the Chl *a/b* ratio remains rather constant in control and metal treated cells over a period of six weeks. Fluorescence data detecting H₂O₂ with 2,7-dichlorofluoresceindiacetate (H₂DCFDA) show a clear localisation of this reactive oxygen species in close vicinity to the chloroplasts, as well as in the nuclear region and the cell wall of metal stressed cells. Further experiments are underway to correlate these fluorescence data with structures in EM micrographs.

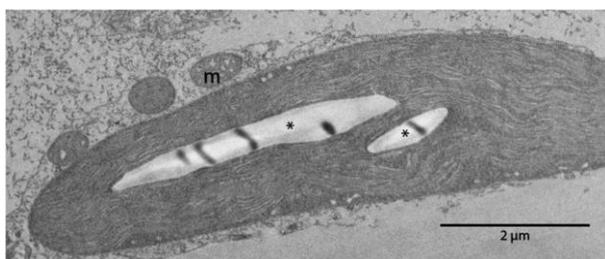


Figure 1: TEM micrograph of a *P. patens* chloroplast with two autochthonous starch grains (*) and associated mitochondria (m).

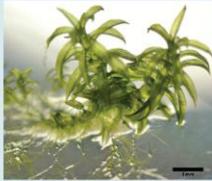
[1] I. Lang, and W. Wernitznig „Sequestration at the cell wall and plasma membrane facilitates zinc tolerance in the moss *Pohlia drummondii*.“ *Environ. Exp. Bot.* **74**, 186– 193 (2011).

ACKNOWLEDGEMENTS: Many thanks to Ursula Lütz-Meindl, the University of Salzburg, Austria, for fruitful discussions and technical support in high pressure freezing and freeze substitution. This work was supported by the Vienna Anniversary Foundation for Higher Education (grant H-1939/2008 to IL and H-2486/2012 to SS).

METAL TOLERANCE STRATEGIES OF MOSSES DIFFER AT THE CELLULAR LEVEL

Sebastian Antreich, Stefan Sassmann, Stefan Wernitznig, Marieluise Weidinger, **Ingeborg Lang**

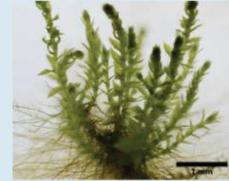
University of Vienna, Cell Imaging and Ultrastructure Research, Althanstrasse 14, A-1090 Vienna, Austria
E-mail : ingeborg.lang@univie.ac.at



Physcomitrella patens

INTRODUCTION

The moss *Physcomitrella patens* (Funariaceae) lives on argillaceous soil whereas *Pohlia drummondii* (Mniaceae) occurs naturally on metal spiked substrate. Growth data of both species show a similar metal tolerance under sterile culture conditions but labelling with the zinc-specific dye FluoZin3 revealed differences and the localisation of zinc to specific compartments [1]. The photosynthetic system is also affected and we observed structural modifications of the chloroplasts as well as changes in the *Chla/Chlb* ratio.



Pohlia drummondii

STRATEGY I: COMPARTMENTATION

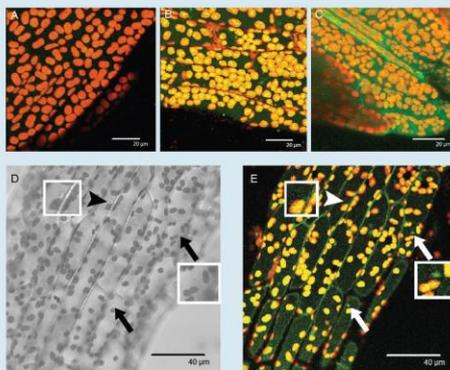


Figure 1: FluoZin3 labelling in *P. patens*: A no labelling in plantlets from control plates; B, C the dye is taken up into the cytoplasm in samples grown on 0.1 mM ZnEDTA and 10 mM ZnEDTA, respectively.

D, E some vesicular structures are labelled (arrows), some are not (arrow head).

STRATEGY II: EXCLUSION

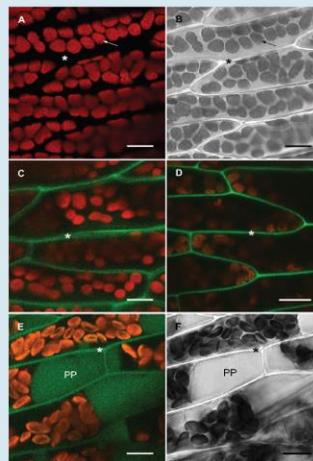


Figure 2: Zinc detection in *P. drummondii* leaf cells after application of the fluorescent dye FluoZin3.

A Control cells without zinc; autofluorescence of chloroplasts with grana thylakoids (arrow). B Corresponding bright field image.

C Sample from 1 mM zinc-spiked agar plate and D from 10 mM zinc-spiked plates; the cell walls are brightly labeled with the zinc-specific dye.

E, F Cells from a gametophyte grown on a 10 mM ZnEDTA plate, staining with FluoZin3 followed by plasmolysis in 0.8 M D-mannitol. E The cell wall and the periplasm (PP) is labeled but not the cytoplasm nor the vacuole. F Corresponding bright field image. Asterisks: cell wall; bar: 10 μ m

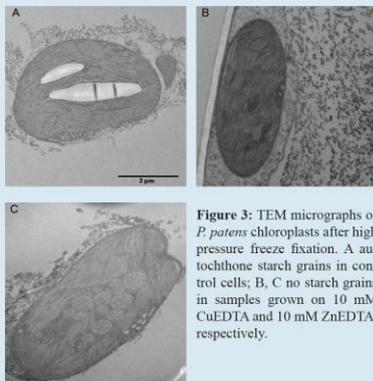


Figure 3: TEM micrographs of *P. patens* chloroplasts after high pressure freeze fixation. A autochthonous starch grains in control cells; B, C no starch grains in samples grown on 10 mM CuEDTA and 10 mM ZnEDTA, respectively.

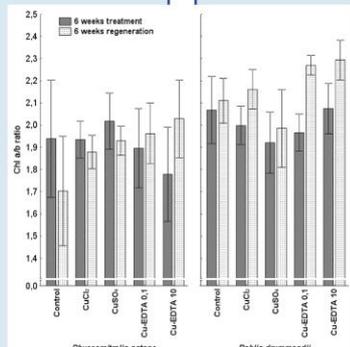


Figure 4: *Chla/Chlb* ratio after 6 weeks of metal treatment (grey) and 6 weeks of regeneration (dotted).

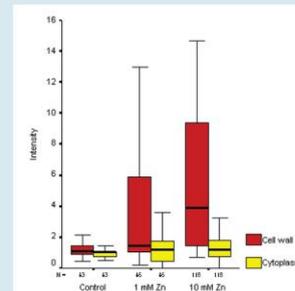


Figure 5: Box plot diagram of fluorescence measurements comparing the fluorescence intensity of the cytoplasm and the cell wall from control, 1 mM ZnEDTA and 10 mM ZnEDTA probes.

CONCLUSION

We propose two tolerance strategies:

I *Physcomitrella patens* is not used to metal contamination but utilizes compartmentation to dispose the excessive metal.

II *Pohlia drummondii* from metal contaminated substrate uses exclusion mechanisms that prevent the entering of the metal into the cells.

In both species, the *Chla/Chlb* ratio is affected by copper and depends on the ligand (-Cl⁻, -SO₄²⁻ or -EDTA⁴⁻, respectively); a regeneration after 6 weeks is more effective in *P. drummondii* than in *P. patens*. TEM micrographs of *P. patens* indicate structural changes of the chloroplasts after metal treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

Many thanks to Ursula Lütz-Meindl, the University of Salzburg, Austria, for fruitful discussions and technical support in high pressure freezing and freeze substitution and to Wolfram Adlassnig for the help in poster design. This work was supported by the Vienna Anniversary Foundation for Higher Education (grant H-1939/2008 to IL and H-2486/2012 to SS).

REFERENCE

[1] I. Lang, and W. Wernitznig „Sequestration at the cell wall and plasma membrane facilitates zinc tolerance in the moss *Pohlia drummondii*”. Environ. Exp. Bot. 74, 186– 193 (2011).



8.3 International Microscopy Congress, Prag

Metal Treatment on *Physcomitrella patens* Compared to two Bryophyte Species Naturally Occurring on Metal Contaminated Sites

Stefan Sassmann, Marieluise Weidinger, Barbara Bock, Sebastian J. Antreich, Wolfram Adlassnig, Ingeborg Lang

**University of Vienna,
Cell Imaging and Ultrastructure Research,
Althanstrasse 14, A-1090**

E-mail: stefan.sassmann@univie.ac.at

KEYWORDS: Metal Uptake, Reactive Oxygen Species, H₂DCFDA, EDX-SEM, Moss

Bryophytes inhabit extremely different habitats, ranging from dry fallen river banks (e.g. *Physcomitrella patens*) to metal contaminated sites (e.g. *Pohlia drummondii* and *Mielichhoferia elongata*). Therefore, some bryophyte species are considered stress tolerant, and even the supposedly metal sensitive moss *P. patens* showed increased tolerance to CuEDTA in earlier studies.

For the present experiments, the bryophytes were cultivated on sterile agar plates and tested for zinc (as Zn-EDTA, ZnCl₂ and ZnSO₄) and copper (as CuEDTA, CuCl₂ and CuSO₄) over a period of five weeks (Fig. 1).

Despite of the high tolerance towards CuEDTA of *P. patens*, we measured changes in growth and metal uptake analyzed by X-ray microanalysis in a scanning electron microscope (Fig.2) if the metal is offered with different anions. Here, especially the uptake of EDTA chelated metals was significantly lower compared to metal offered as ionic salt. Modelling of ion availability explained most of the differences in toxicity.

Changes in the cellular content of reactive oxygen species (ROS) after staining with 2,7-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA) were analyzed in a confocal scanning microscope (Fig.3) and the three different bryophyte species compared. *P. patens* showed only low H₂DCFDA fluorescence in control cells, in contrast to metal treated cells were increased ROS could be detected for chloroplast associated mitochondria, the nuclear region and the cell wall region.

Further investigation of cellular localization of metal deposition was performed using FluoZin-3 and is ongoing in transmission electron microscopy studies.

This research was supported by the Vienna Anniversary Foundation for Higher Education (grant H-2486/2012 to S.S.) and the CEAD (*Appear-43/BIOREM*). Many thanks are due to Irene Lichtscheidl, University of Vienna.

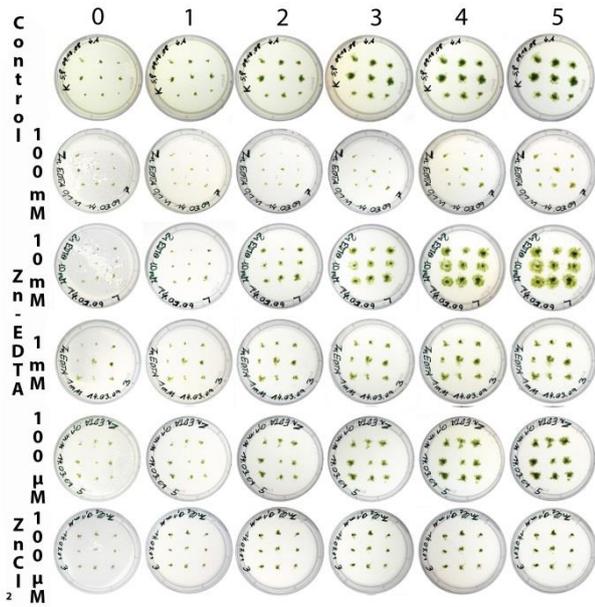


Fig. 1: *P. patens* plants grown on control and zinc spiked media over a period of 5 weeks.



Fig. 2: Scanning electron microscope micrograph of *P. patens* leafy gametophyte (scale bar = 1 mm).

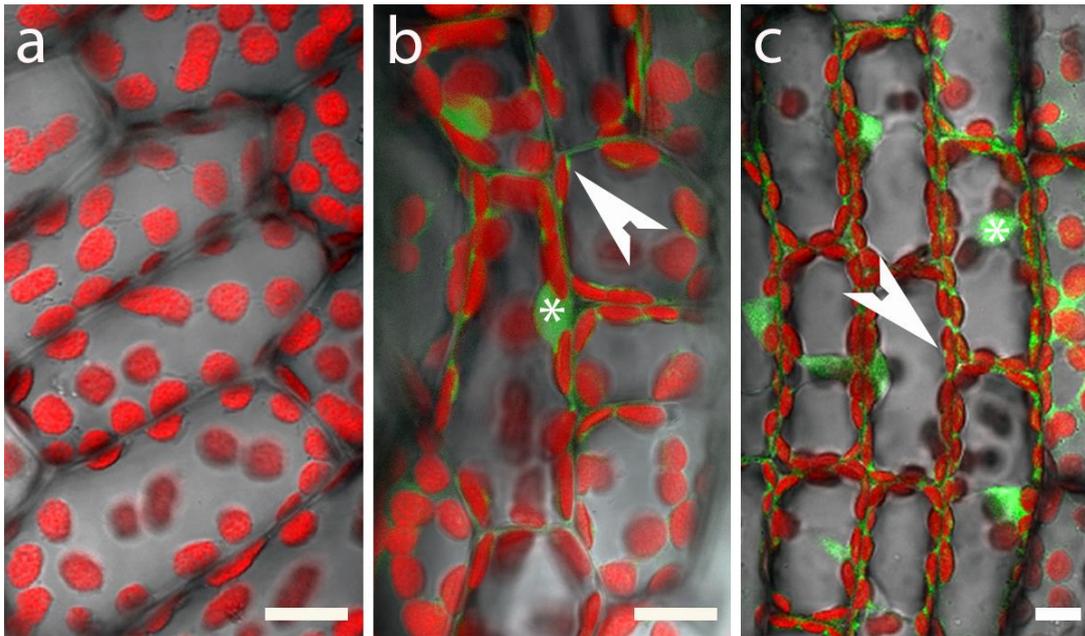


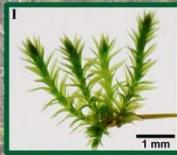
Fig. 3: *P. patens* leaf cells stained with H₂DCFDA for H₂O₂ detection. a, Control cells; b, Plants grown on 1 mM ZnCl₂ and c, plants grown on 0.1 mM CuSO₄ show increased fluorescence in close vicinity of the chloroplast, in the nuclear region (*), mitochondria (arrowhead) and the cell wall (scale bar = 10 μm).

Metal Treatment on *Physcomitrella patens* Compared to two Bryophyte Species Naturally Occurring on Metal Contaminated Sites

Stefan Sassmann, Marieluise Weidinger, Barbara Bock, Sebastian J. Antreich, Wolfram Adlassnig, Ingeborg Lang

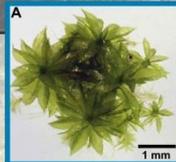
University of Vienna, Cell Imaging and Ultrastructure Research, Althanstrasse 14, A-1090 Vienna, Austria; Email: stefan.sassmann@univie.ac.at

Mielichhoferia elongata



Introduction

Mosses inhabit extremely different habitats, ranging from dry fallen river banks (e.g. *Physcomitrella patens* A) to metal contaminated sites (e.g. *Mielichhoferia elongata* I and *Pohlia drummondii* 1; Schwarzwand, Austria). Therefore, some bryophyte species are considered stress tolerant, and even the supposedly metal sensitive moss *P. patens* showed considerable tolerance to Cu-EDTA in earlier studies. For the present experiments,

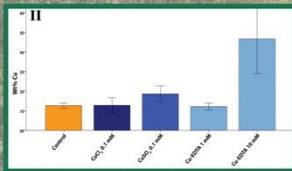


the mosses were cultivated on sterile agar plates and tested for zinc (as Zn-EDTA, ZnCl₂ and ZnSO₄) and copper (as Cu-EDTA, CuCl₂ and CuSO₄) over a period of five weeks. Metal uptake was measured by X-ray microanalysis in a scanning electron microscope (SEM-EDX). Intracellular reactive oxygen species (ROS) were stained with 2,7-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA) and analyzed in a confocal scanning microscope (Leica TCS SP5).

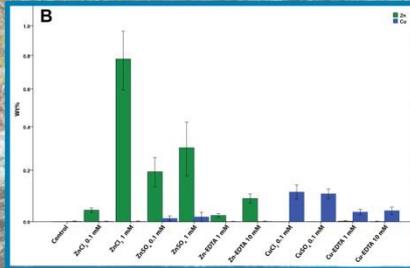
Pohlia drummondii



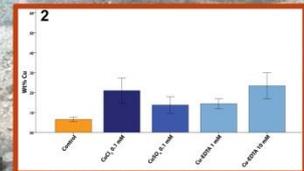
SEM - EDX



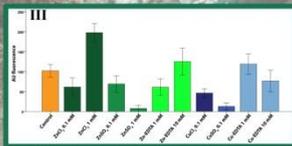
SEM - EDX



SEM - EDX



ROS - Fluorescence

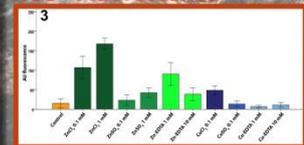


Results & Conclusions

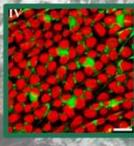
Despite the high tolerance towards Cu-EDTA in *P. patens*, we measured changes in growth and metal uptake analyzed by SEM-EDX if the metal was offered with different anions (B). Here, especially the uptake of EDTA chelated metals was significantly lower in *P. patens* compared to metal offered as ionic salt. Interestingly we did not find such difference for *P. drummondii* (2) and even found increased uptake for *M. elongata* for Cu-EDTA (II). Staining for ROS with H₂DCFDA in the three different bryophyte species (III; C; 3) showed only low fluorescence in control cells of *P. patens* (D) and *P. drummondii* (4), but the control of the "copper moss" *M. elongata* (IV) showed increased ROS fluorescence compared to metal treated cells. While ZnSO₄ (VI) induces less ROS than ZnCl₂ (6; E) in all three species, no such difference could be found for copper in *P. patens* (F). While *P. drummondii* showed fluorescence near control level on CuSO₄ (5; F) and Cu-EDTA, *M. elongata* showed higher growth rates and less ROS fluorescence if grown on CuSO₄ (V) and ZnSO₄ (VI) spiked media.

Thus the sensitive moss *P. patens* suffers significantly under metal exposition whereas the facultative metalophyte *P. drummondii* shows little stress and the obligatory metalophyte *M. elongata* even benefits.

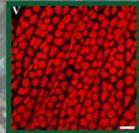
ROS - Fluorescence



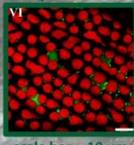
Control



CuSO₄ 0.1 mM

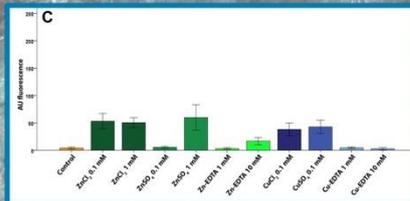


ZnSO₄ 0.1 mM

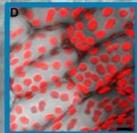


scale bar = 10 μm

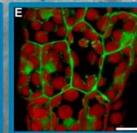
ROS - Fluorescence



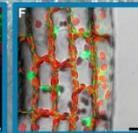
Control



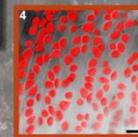
ZnCl₂ 1 mM



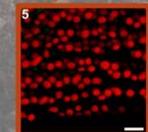
CuSO₄ 0.1 mM



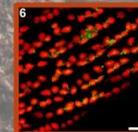
Control



CuSO₄ 0.1 mM



ZnCl₂ 0.1 mM



Acknowledgements

This research was supported by the Vienna Anniversary Foundation for Higher Education (grant H-2486/2012 to S.S.) and the CEAD (Appear-43/BIOREM). Many thanks are due to Irene Lichtscheidl, University of Vienna.

universität wien

8.4 4th Biorem Meeting, Krakau

Geology of Nicaragua

Sebastian J. Antreich¹

¹ Universität Wien, Core Facility Cell Imaging and Ultrastructure
Research, Althanstrasse 14, A-1090 Vienna, Austria

Nicaragua is geologically seen a very diverse land in Central America, because it provides as a border between the geologically older part of Central America in the north and the younger part in the south (Weyl 1980). To understand this we have to take a look on the formation history of Central America (Rogers 2003). In the Late Jurassic (165 Ma) North and South America became separated and started to drift apart. At the same time detached the Chortis Block (today's Honduras and El Salvador) from the southwest coast of Mexico. From the west approached the Farallon Plate, which pushed the Mezcalera Plate under the American plates. At the subduction zone of the two oceanic plates arose a volcanic island chain, the Guerrero-Caribbean Arc, which consisted Cuba, Jamaica and Siune Terrane (part of Nicaragua). In the Late Cretaceous (90-72 Ma) the Mezcalera Plate disappeared completely and the southern part of the Guerrero-Caribbean Arc reached the hot spot of Galapagos, where a plateau of submarine volcanoes (CLIP) and volcanic islands, the Chorotega Block (today's Costa Rica) was formed. Meanwhile the Farallon plate drifts further into the proto-Caribbean opening and brings the rest of the Caribbean Arc to its today position. Thereby the Siune Terrane collided with the Chortis Block. At the end of the Late Cretaceous (72 Ma) the Chorotega Block collided also with the Siune Terrane/Chortis Block. Until the Eocene (42 Ma) the Caribbean part of the Farallon Plate comes to a hold and a new subduction zone gets established before the coast of the Chortis and Chorotega Blocks, which pushed them to the east to its today position.

Nicaragua can be classified into four physiographic units. The Central Highland is the largest unit and range from the northern border with Honduras southeastward to the Caribbean Sea. The basement is mainly formed by volcanic rocks (like Andesite, Basalt, Rhyolite) and Ignimbrites (pyroclastic deposits) from the Eocene to the Pliocene (Tertiary). Beside this, there are areas at the border to Honduras which consist of metamorphic and plutonic rocks (like Granite, Diorite, Tonalite) from the Cretaceous or older (Hradecký 2011). From the Central Highland eastward run the second unit, the Caribbean Coastal Plain. It consist of Sediments of the Quaternary and recent Alluvium. This are mostly belong to the Siune Terrane. Those two units belong to the older northern part of Central America. The southern part is presented by the Pacific Coastal Plain. This area is manly formed by sedimentary rocks (like Limestone, Sandstone, Siltstone) from the Eocene to the Miocene and belongs more to the younger Chorotega Block. The fourth unit is the Nicaraguan Depression, which runs from the border to Costa Rica to the northern Pacific Coast of Nicaragua and contains the two lakes

and a chain of active and inactive volcanoes. So it consists of recent and quaternary volcanic rocks, pyroclastic and alluvial deposits.

Until now exists the subduction zone of the Cocos Plate along the west coast, which reveals through active volcanism. Along the Nicaraguan Depression exists a continuous chain of volcanoes from the Gulf of Fonseca to the Lake Nicaragua, of which some are still active. Like the Cerro Negro, which erupted six times between 1850 and 1971, or the Concepción, which spit the last time lava in 1957. This chain of volcanoes belongs to the Central American Volcanic Arc (CAVA), which extend along the Middle American trench from Mexico to Costa Rica. Beside the active volcanism it occurs also to increased strong earthquakes along this trench. At the one hand they are generated in high depths through the subduction of the Cocos Plate and occur less frequent. On the other hand there are more frequent shallow earthquakes (less than 50km) due to the volcanism and the faulting of the crust (Funk *et al.* 2009). One of these earthquakes destroyed on 23. December 1972 $\frac{3}{4}$ of Managua and causes up to 11.000 deaths and costs of around 500Mio Dollar.

Selected References

- Funk J, Mann P, McIntosh K, Stephens J (2009) Cenozoic tectonics of the Nicaraguan depression, Nicaragua, and Median Trough, El Salvador, based on seismic-reflection profiling and remote-sensing data, GSA Bulletin, vol. 121, no. 11/12, p. 1491-1521
- Hradecký P (2011) Introduction to the special volume “Subduction-related igneous activity in Central America – its nature, causes and consequences”, Journal of Geosciences, vol. 56, 1-7
- Rogers RD (2003) Jurassic-Recent tectonic and stratigraphic history of the Chortis block of Honduras and Nicaragua (northern Central America), The University of Texas at Austin, Ph. D. dissertation, p. 289
- Weyl R (1980) Geology of Central America, 2nd ed., Borntraeger, Berlin

9 *Curriculum vitae*

Sebastian Antreich, BSc

Staatsbürgerschaft: Österreich

Email: sebastian.antreich@univie.ac.at



Ausbildung:

- Seit 2010: Masterstudium Ökologie
Spezialisierung: Ökophysiologie
Universität Wien
- 01/06/2010: Abschluss Bachelorstudium
Universität Wien
- 2006 – 2010: Bachelorstudium Biologie
Spezialisierung: Ökologie
Universität Wien
- 2005 – 2006: Präsenzdienst
Jägerbataillon 23, 2. JgKp, Landeck
- 24/06/2005: Reifeprüfung
Bundesgymnasium Lustenau
- 1997 – 2005: Bundesgymnasium Lustenau

Wissenschaftliche Publikationen:

- 09/2014: Poster: International Microscopy
Congress Prag
- 06/2014: Poster: Austrian Society of Plant
Biology
Lunz am See
- 04/2014: Poster: Focus on Microscopy
Sydney
- 11/2013: *Abstract*: 4th Biorem Meeting
Krakau

Akademische Erfahrungen:

- seit 2012: Tutorien: Universität Wien
- UE „Analoge und Digitale
Fotografie zur
wissenschaftlichen
Dokumentation“
- SE+UE „Licht- und
Videomikroskopie in Theorie
und Praxis“
- UE „Bryologischer Fachkurs -
Übungen zur
Moosbestimmung“
- UE „Kenntnis mitteleurop.
Lebensgemeinschaften“
- PP „Spezielle Techniken in der
Elektronenmikroskopie und
Ultrastrukturforschung“