

GYMNASIUM GRAFING

OBERSTUFE 2017/2019

Wissenschaftspropädeutisches Seminar

Phytomedizin: Chemie und Magie der Pflanzenheilkunde für Mensch und Umwelt

Leitfach: Biologie/Chemie

Thema der Seminararbeit

Brassica-Arten als Hyperakkumulatoren: ein Vergleich

Verfasserin: Melissa Schubbert

Seminarleiterin: OStRin Dörte Weidner

Abgabetermin: **06.11.2018**

Bewertung		Note	Notenstufe in Worten	Punkte		Punkte
Schriftliche Arbeit					x 3	
Abschlusspräsentation					x 1	
Summe:						
Gesamtleistung nach § 29 (7) GSO = Summe : 2 (gerundet)						

Unterschrift der Seminarleitung:

.....

Gliederung

1. Grundgedanke der Seminararbeit – Einführung.....	4
2. Vorstellung der Phytosanierung und des Phytomining.....	
2.1. Definition des Begriffs „Phytosanierung“ und „Phytomining“.....	
2.2. Geschichte der Phytosanierung und Forschung.....	
3. Material und Methoden.....	
3.1. Verwendete Materialien und Pflanzen und einzubeziehende Tierarten.....	
3.1.1. Vorstellung der verwendeten Pflanzenarten.....	
3.1.1.1. Brauner Senf – <i>Brassica juncea</i>	
3.1.1.2. Schwarzer Senf – <i>Brassica nigra</i>	
3.1.1.3. Äthiopischer Senf – <i>Brassica carinata</i>	
3.1.2. Material zum Anbauen der Pflanzen.....	
3.1.3. Vorstellung der einzubeziehenden Tierarten.....	
3.1.3.1. Großer Kohlweißling – <i>Pieris brassicae</i>	
3.1.3.2. Kohleule – <i>Mamestra brassicae</i>	
3.1.4. Extraktionsmaterialien.....	
3.1.5. Photometer.....	
3.2. Verwendete Methoden.....	
3.2.1. Ascorbinsäure/ Oxalat-Extraktion mit Reaktionsmechanismus.....	
3.2.2. Messung mit dem Photometer.....	
3.2.3. Nachweis mit gelbem Blutlaugensalz.....	
3.2.4. Extraktion der RNA und Messung der Genexpression.....	
4. Versuchsdurchführungen.....	
4.1. Vorversuch 1 – Vergleich der Wirkung von Metallionen bei Zugabe vor bzw. nach der Keimung.....	
4.1.1. Versuchsaufbau.....	
4.1.2. Beobachtungen.....	
4.1.2.1. Wachstums- & Keimungsverhalten.....	
4.1.2.2. Sonstige Beobachtungen.....	
4.1.3. Erklärungen & Fehlerdiskussion.....	
4.1.4. Schlussfolgerungen.....	
4.2. Vorversuch 2 – Anpassung der Ionenmenge an Pflanzen und Erdvolumen.....	

4.2.1.	Versuchsaufbau.....
4.2.2.	Beobachtungen.....
4.2.3.	Erklärungen & Fehlerdiskussion.....
4.2.4.	Schlussfolgerungen.....
4.3.	Hauptversuch – Vergleich dreier Brassica-Arten in der Aufnahme von Kupfer- und Zink Ionen aus dem Boden und in der Genexpression unter Einfluss der Ionen.....
4.3.1.	Versuchsaufbau.....
4.3.2.	Beobachtung des Wachstums.....
4.3.3.	Beobachtung des Fraßes durch Kohlweißling und Kohleule.....
4.3.4.	Messung der Aufgenommenen Menge mit dem Photometer.....
4.3.4.1.	Analyse der Ergebnisse.....
4.3.5.	Messung der Expression ausgewählter Gene mittels RNA-Extraktion und Realtime-PCR.....
4.3.5.1.	Beobachtungen während dem Pflanzenwachstum.....
4.3.5.2.	Extraktion der RNA und Messungen.....
4.3.5.3.	Analyse der Ergebnisse.....
5.	Diskussion der Ergebnisse.....
6.	Fehlerdiskussion.....
7.	Zusammenfassung.....
8.	Anhang.....
8.1.	Literatur- & Bildverzeichnis.....
8.1.1.	Literaturverzeichnis.....
8.1.2.	Bildverzeichnis.....
8.2.	Anleitung zur Benutzung des Photometers.....
8.3.	Gefährdungsbeurteilung.....
9.	Danksagung.....
10.	Ehrenwörtliche Erklärung.....

1. Grundgedanke – Einführung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Heavy-Metal-Fans unter den Pflanzen. Die Rede ist nicht etwa von besonders musikbegeisterten Pflanzen, sondern von Pflanzen, die Schwermetalle (engl. heavy metals) wie ein Staubsauger aus dem Boden saugen und speichern können. Aufgrund dieser Fähigkeit sind diese Pflanzen, sogenannte Hyperakkumulatoren, immer weiter in den Fokus der Forschung gerückt. Die Hoffnung ist, dass viele der heutzutage mit Schwermetallen belasteten Böden mit Hilfe dieser Pflanzen wieder benutzbar gemacht werden können. Vor allem stillgelegte Minen, alte Schießstände, auf denen mit Bleikugeln geschossen wurde, Industriegebiete und Häfen haben zu großen Teilen verschiedenste Schwermetalle im Boden. Die meisten Schwermetalle sind bereits in sehr geringen Mengen, andere in hohen Mengen toxisch für Tiere und Pflanzen. Somit können belastete Böden nicht genutzt werden, oft werden diese Gelände auch abgesperrt, da der längere Aufenthalt für Menschen und Tiere in diesen Gebieten gesundheitsgefährdend wäre.

Bisherige chemische Verfahren zur Reinigung der Böden sind äußerst zeit- und kostenintensiv. Die Hoffnung ist, in diesen Metall-akkumulierenden Pflanzen eine effizientere und umweltschonende Alternative zu finden, die sogenannte Phytosanierung.

Doch es gibt auch noch andere Möglichkeiten, sich diese Pflanzen zu Nutze zu machen. Beispielsweise im Abbau gefragter Metalle. Bisherige Methoden, Metalle aus Erzen zu gewinnen sind umweltschädigend und funktionieren erst ab einer gewissen Metallkonzentration im Boden. Hier wird also daran geforscht, mit Hilfe der metallziehenden Pflanzen eine umweltschonendere Alternative zum bisherigen Bergbau zu finden, die bereits bei kleinen Metallmengen im Boden möglich ist. Die Metallgewinnung mittels Pflanzen nennt sich Phytomining.

Aus diesen Gründen bilden die metalltoleranten Pflanzen ein breites und vielversprechendes Forschungsgebiet.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, zunächst einen Überblick über die Anwendung von Hyperakkumulatoren zu verschaffen und im Anschluss in einem in verschiedene Einzelversuche gegliederten Versuch drei Senfarten in ihrer Metalltoleranz bezüglich Kupfer und Zink zu vergleichen und zu schauen, welche Gene an der Metallaufnahme beteiligt sind.

2. Vorstellung der Phytosanierung und des Phytomining

2.1. Definition der Begriffe „Phytosanierung“ und „Phytomining“

Grundsätzlich bezeichnet die Phytosanierung Verfahren, bei denen Böden oder Gewässer von Schadstoffen wie beispielsweise Schwermetallen oder Kohlenwasserstoffen, mit Hilfe von Pflanzen gereinigt werden. Verwendet werden entweder von Natur aus Metall ziehende Arten oder gentechnisch so veränderte Pflanzen, dass diese größere Mengen an Metallionen aufnehmen können. Solche metalltoleranten Pflanzen nennt man Hyperakkumulatoren. Das Wort Hyperakkumulator heißt wörtlich übersetzt „Über-Speicher“. Dieses Verfahren ist sehr vielversprechend, da es eine umweltfreundliche und relativ effiziente Alternative zur chemischen Säuberung kontaminierter Böden darstellt. Außerdem können die wertvollen Metalle, nachdem sie aus dem Boden gezogen und in den Pflanzen gespeichert wurden, mittels spezieller Verfahren wieder aus den Pflanzen extrahiert und wiederverwendet werden. Dieser Prozess wird Phytomining genannt.

Es herrscht ein hoher Bedarf an diesen Schwermetallen, da sie in der Industrie in verschiedenster Weise Verwendung finden. Hinzu kommt, dass sich aus getrockneten metallhaltigen Pflanzen hergestellte Pulver als pflanzliche Katalysatoren verwenden lassen, die beispielsweise bei der Herstellung vieler Alltagsgegenstände genutzt werden.^{1,2}

Es gibt verschiedene Unterbegriffe der Phytosanierung. Die eine ist die Phytoextraktion, die vor allem bei der Sanierung mit Metall belasteter Böden Anwendung findet. Hierfür werden Pflanzen verwendet, die die Metallionen aufnehmen, in ihre Blätter transportieren und dort in hohen Konzentrationen speichern (Vgl. Abb. 1). Als Phytodegradation hingegen wird eine Methode bezeichnet, bei der die Schadstoffe nicht von der Pflanze aufgenommen, sondern in deren Wurzelwerk zerstört werden. Die Pflanze saugt in diesem Fall die Schadstoffe an, und konzentriert sie somit im Wurzelwerk. Im Boden beheimatete Mikroorganismen können sich so von ihnen ernähren, sie in andere Substanzen umsetzen und so weniger schädlich bis unschädlich machen (Vgl. Abb. 2).³

¹ Vgl. Spektrum

² Vgl. Arte - Futuremag

³ Vgl. Arte - Futuremag

2.2. Geschichte der Phytosanierung und Forschung

Die Idee der Phytosanierung gab es schon früh, bereits vor über 45 Jahren begann der damalige Student Alan Baker seine Forschung an Hyperakkumulatoren, nachdem er bei einem Spaziergang durch ein ehemaliges Bergwerk auf Pflanzen gestoßen war, die trotz des dort stark belasteten Bodens wuchsen und sogar blühten. Er begann diese Pflanzen zu erforschen und fand heraus, dass diese Pflanzen eben nicht nur auf dem verseuchten Gelände wuchsen, sondern dort auch die toxischen Schwermetalle aus dem Boden zogen. Die Beobachtung, dass einige der Pflanzen, auf die er stieß beinahe unglaublich hohe Mengen an Metallionen aus dem Boden ziehen können, glaubten ihm nur sehr wenige und hielten seine Ergebnisse für einen Rechenfehler. Der amerikanische Agrarwissenschaftler Rufus



Abbildung 3: Alan Baker, Pionier des Phytomining

Chaney aber glaubt ihm, die beiden forschten gemeinsam weiter. Obwohl sich schnell gezeigt hat, dass der Einsatz von Hyperakkumulatoren nicht nur einen ökologischen sondern auch einen ökonomischen Nutzen hat, da sich auf diese Weise seltene, teure Metalle aus dem Boden ziehen lassen, hatten die Forscher eine lange Zeit Probleme damit, Investoren für ihr Projekt zu finden. Lediglich eine Investmentfirma bot ihre finanzielle Unterstützung an, wenn sie dafür die Rechte an sämtlichen Patenten von eventuellen Erfindungen erhielt: Viridian Environmental. Die Forscher hatten durch die finanzielle Unterstützung die Möglichkeit, Ende der 90er Jahre einen groß angelegten Versuch in Oregon durchzuführen, der ihnen äußerst positive Ergebnisse liefert. Ihre Berechnungen zeigen, dass Phytomining ein gewinnbringendes Geschäft ist. Allerdings brach Viridian den gesamten Kontakt ab, sowohl zu den Forschern als auch zu Konzernen, die eine Zusammenarbeit wünschten.

Die Forschung kam so zum Erliegen, da Viridian alle Patentrechte an den Techniken besaß und jede kommerzielle Nutzung ausgeschlossen hatte. Somit gerieten Phytosanierung und Phytomining in Vergessenheit. Nur sehr wenige Forscher forschten weiter an den akkumulierenden Pflanzen, da die Pflanzen selber nicht patentiert werden konnten.

2015 ist die 20-jährige Gültigkeit der entscheidenden Patente abgelaufen. Seitdem erfährt die Forschung im Bereich der Phytosanierung und des Phytomining einen großen

Aufschwung. Mittlerweile gibt es weit über die Welt verteilt Gruppen von Forschern, die sich mit den Metallaufnahmefähigkeiten von Pflanzen beschäftigen.^{4,5}

Ein Beispiel hierfür ist die französische Chemikerin Claude Grison, die in den Cevennen auf einem stillgelegten Zink-Minengelände Sanierungsversuche durchführt. Auf dem Gelände ist die Blei-, Cadmium- und Zinkbelastung bis zu 800-mal höher als die erlaubten EU-Normen. Heutzutage ist dieses Gebiet weitflächig abgesperrt, dennoch tragen Wind und Regen die Giftstoffe in die Umwelt; es wurden bei Kindern in der Anwohnerschaft auch schon Bleivergiftungen festgestellt. Der Anbau von Lebensmitteln ist dort gänzlich ausgeschlossen. Es herrscht also dringender Bedarf, den Boden in diesem Gebiet zu sanieren. Ein Grund mehr, dort mit verschiedenen Metallakkumulierenden Pflanzen zu arbeiten und zu forschen. Außerdem arbeitet Grison viel mit pflanzlichen Katalysatoren aus Hyperakkumulatoren. Eines ihrer Ziele ist beispielsweise manganhaltige Katalysatoren herzustellen, die in Afrika vor Ort zur Herstellung eines Medikamentes gegen Malaria verwendet werden können.^{6,7}

Auch gibt es über die Forschung hinaus bereits Projekte, die die erforschten Techniken tatsächlich umsetzen.

Ein Beispiel dafür ist die Renaturierung des Umfelds großer Nickel-Minen in Neukaledonien. Dort werden Hyperakkumulatoren zur Wiederbepflanzung der Gelände rund um die Minen verwendet, die sehr stark mit Nickel belastet sind, welches auf die meisten Lebewesen eine stark toxische Wirkung hat. Die Pflanzen bilden hier einen Erosionsschutz da der ansonsten kahle Boden sonst jeglichen klimatischen Einwirkungen schutzlos ausgeliefert ist. Die Pflanzen dort haben aber noch einen zweiten Nutzen: erntet, trocknet und verbrennt man die Pflanzen, so erhält man Asche mit hohem Anteil an Nickel, welches sich relativ einfach daraus extrahieren lässt. Die Pflanzen bilden hier also eine bodenschonende Alternative zum bisherigen Metallabbau.

Ein anderes Projekt nutzt Phytomining bereits wirtschaftlich. Rund um das Ufer des Ohridsees in Albanien sind die Böden ebenfalls stark mit Nickel belastet. Hier werden nun Felder mit dem dort bisher als Unkraut bekanntem Mauer-Steinkraut von den einheimischen Bauern bewirtschaftet. Sie nutzen Methoden, die sie bisher für den landwirtschaftlichen Ackerbau verwendet haben, um die Pflanzen auf den „Nickel-

⁴ Vgl. Krause, Till

⁵ Vgl. Westram, Heike

⁶ Vgl. Arte - Futuremag

⁷ Vgl. Neubauer, Michael

Feldern“ noch besser gedeihen zu lassen. Die dort geernteten und getrockneten Pflanzen werden an die französische Universität Nancy exportiert, wo der Agrarwissenschaftler Guillaume Echevarria Nickelsalze und -oxide aus ihnen extrahiert und verwertet. Die Bauern können so mit dem „Unkraut“ Mauer-Steinkraut Geld verdienen und nachhaltig ihre Böden nutzen.⁸

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Pflanzen und einzubeziehende Tierarten

3.1.1. Vorstellung der verwendeten Pflanzenarten

Die drei verwendeten Senfarten gehören alle zur Klasse der Zweikeimblättrigen (Dikotyledoneae), zur Ordnung der Kreuzblütlerartigen (Brassicales), zur Familie der Kreuzblütler (Brassicaceae) und zur Gattung der Kohlpflanzen (Brassica).⁹ Die im Folgenden genauer vorgestellten Arten werden gewählt, da sie in bisherigen Versuchen als Hyperakkumulatoren aufgefallen sind und zusätzlich leicht zu erwerben sind. Um feinere Unterschiede zeigen zu können, werden drei Arten der gleichen Gattung gewählt, diese ähneln sich in Aufbau, Anforderungen an den Boden und das Klima sowie in ihrem Stoffwechsel.

3.1.1.1. Brauner Senf – *Brassica juncea*

Der braune Senf ist eine einjährige, krautige Pflanze, die vor allem in Asien, aber auch in anderen Teilen der Welt, hauptsächlich in den warmgemäßigten bis subtropischen Klimaregionen, beheimatet ist.

In Europa, Nordamerika, Asien und Indien wird er als Speisesenf, zur Speiseölgewinnung, in Asien auch als Blattgemüse genutzt und angebaut.

Er hat eine Wuchshöhe von 30 bis 100 cm, blüht von März bis Juni, Früchte findet man zwischen April und Juli, je nach Zeitpunkt der Aussaat.

Die Blüten des braunen Senfes sind gelb, vierblättrig und endständig. Die Blätter sind im unteren Bereich des Sprosses rundlich und werden nach oben hin schmaler.^{10,11}



Abbildung 4:
grafische
Darstellung des
braunen Senfes

⁸ Vgl. Westram, Heike

⁹ Vgl. Wikipedia

¹⁰ Vgl. transGEN Datenbank

¹¹ Vgl. Wikipedia

Die Aussaat ist von März bis August im Freiland möglich, allerdings sollte er vor Anfang Mai ausgesät werden, wenn man Früchte ernten möchte. Möchte man nur Blätter ernten, so ist eine ganzjährige Aussaat möglich, je nach Temperatur und Jahreszeit, im Freiland oder in Saatschalen auf der Fensterbank.¹²

3.1.1.2. Schwarzer Senf – *Brassica nigra*

Der schwarze Senf ist eine einjährige Pflanze, die in warmgemäßigten bis subtropischen Klimaregionen angebaut wird.

Verwendet wird er vor allem zur Herstellung von Speisesenf, Senföl und Senfmehl, aber auch als Heilpflanze findet er Anwendung. Beispielsweise fördern Senfpflaster die Durchblutung, auch wird er bei Verdauungsschwäche und Rheuma verwendet, da er eine anregende, antibakterielle, krampflösende und schmerzstillende Wirkung hat.

Er kann eine Wuchshöhe von 150 cm erreichen, seine Blütezeit liegt zwischen Juni und August, bis zum Herbst entwickeln sich aus den Blüten schwarzbraune Samen in schmalen Schoten.

Die Blüten sind gelb und vierblättrig, sie sind endständig. Die Blätter sind behaart, auch beim schwarzen Senf werden die Blätter vom Boden zur Spitze der Pflanze hin schmaler.^{13,14,15}

Die Aussaat ist von März bis August im Freiland möglich, allerdings sollte er vor Anfang Mai ausgesät werden, wenn man Früchte ernten möchte. Möchte man nur Blätter ernten, so ist eine ganzjährige Aussaat möglich, je nach Temperatur und Jahreszeit, im Freiland oder in Saatschalen auf der Fensterbank.¹⁶

3.1.1.3. Äthiopischer Senf – *Brassica carinata*

Wie der Name dieser einjährigen Senf Art bereits verrät, stammt der äthiopische Senf aus Äthiopien, lässt sich aber dennoch auch in anderen Teilen kultivieren, wie beispielsweise Nordamerika und Süd- bis Mitteleuropa. Dank ihrer Herkunft kommt diese Art sehr gut mit Hitze und Trockenheit zurecht.



Abbildung 5:
Grafische
Darstellung des
schwarzen Senfes

¹² Vgl. Saatgutverpackung Brauner Senf

¹³ Vgl. transGEN Datenbank

¹⁴ Vgl. Wikipedia

¹⁵ Vgl. Heilkräuter-Seiten

¹⁶ Vgl. Saatgutverpackung Schwarzer Senf

Der äthiopische Senf ist ein Hybrid aus dem Schwarzen Senf (*Brassica nigra*) und dem Gemüsekohl (*Brassica oleracea*).

Die vierblättrigen Blüten des äthiopischen Senfes sind gelb. Er hat mit den bereits vorgestellten Arten verglichen, relativ große Blätter, auch hier haben die Blätter unten eine rundere Form als weiter oben an der Pflanze; dort werden die Blätter länglicher. Der Spross hat eine grüne bis violette Farbe, auch vor allem junge Blätter haben eine leicht violette Färbung.



Abbildung 6:
Äthiopischer Senf

Verwendung findet er vor allem als Blattgemüse oder Würzung in verschiedenen Gerichten, vor allem Salat. Er hat einen dem Brokkoli ähnlichen Geschmack. Die Samen werden zur Herstellung von Senf und Öl verwendet.

Aussäen sollte man die Samen des äthiopischen Senfes zwischen April und August, eine Ernte ist nach bereits nach 6 Wochen möglich. Zieht man ihn in Töpfen an, ist eine ganzjährige Ernte der Blätter möglich.^{17,18}

Der äthiopische Senf spielt zudem eine Rolle in der Entwicklung erneuerbarer Energiequellen, da er zur Herstellung von Bio-Treibstoff für Flugzeuge verwendet werden kann und er somit eine Alternative zu Petrol-basiertem Flugzeug-Treibstoff darstellt. Am 29. Oktober 2012 startete der erste Testflug eines mit 100% Bio-Treibstoff angetriebenen Flugzeugs in Kanada. Die geplante Strecke konnte erfolgreich geflogen werden, der aus äthiopischem Senf hergestellte Treibstoff funktioniert also.¹⁹

3.1.2. Vorstellung der einzubeziehenden Tierarten

3.1.2.1. Großer Kohlweißling – *Pieris brassicae*

Der Große Kohlweißling (*Pieris brassicae*) gehört zur Klasse der Insekten (Insecta), zur Ordnung der Schmetterlinge (Lepidoptera), zur Familie der Weißlinge (Pieridae) und zur Gattung *Pieris*.²⁰

Der Kohlweißling ist tagaktiv und ist in Nordafrika und in Europa bis Fennoskandinavien beheimatet, da er wenige spezifische Anforderungen an seinen Lebensraum stellt. Wichtig ist, dass genug Futterpflanzen für die Raupen und genug Nektarpflanzen zu finden sind. Die Raupen fressen bevorzugt Kohlpflanzen (Pflanzen der Gattung *Brassica*) und generell Kreuzblütengewächse (Brassicaceae), auch werden

¹⁷ Vgl. Fordham, R.; Hadley P.

¹⁸ Vgl. Rühlemann's

¹⁹ Vgl. Fougeres, Sophie

²⁰ Vgl. Wikipedia

vermehrt Raupen auf der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus*) gefunden. Aus diesen Pflanzen nehmen die Raupen Schwefelverbindungen, sogenannte Isothiocyanate, auf. Da die Raupen in großem Ausmaße Kohl fressen und so auch die Ernte extrem dezimieren können, gelten sie in der Landwirtschaft als Schädlinge.

Als besuchte Nektarpflanzen der ausgewachsenen Schmetterlinge gelten beispielsweise Disteln (*Cirsium* und *Carduus*), Wiesen-Schaumkraut (*Cardamine pratensis*) oder Schmetterlingsflieder (*Buddleja davidii*).

Der große Kohlweißling hat eine Flügelspannweite von etwa 6 cm.

Die Innenseite der Flügel hat eine weiße Grundfarbe mit grauen Spitzen und je einem dunkelgrauen Fleck auf dem oberen Flügelpaar. Die Außenseite der Flügel ist überwiegend weiß mit einem leichten Gelbton.

Die Raupen können eine Länge von 4,5 cm erreichen.

Sie haben eine unterschiedliche Färbung je nach Entwicklungsstadium, junge Raupen sind hellgelb bis gelbgrün mit braunem Kopf, im Verlauf werden die

Raupen dunkler, nach einigen Häutungen haben sie auf der grünlichen Grundfarbe in Reihen angeordnete schwarze Flecken.

Die Raupen sind in der Natur von März bis Ende Oktober zu finden, die letzte Generation des Jahres überwintert als Puppe.²¹



Abbildung 7: äußere Erscheinung des großen Kohlweißlings

3.1.2.2. Kohleule – *Mamestra brassicae*

Die Kohleule (*Mamestra brassicae*) gehört zur Klasse der Insekten (Insecta), zur Ordnung der Schmetterlinge (Lepidoptera), zur Familie der Eulenfalter (Noctuidae) und zur Gattung *Mamestra*.

Als Eulenfalter ist die Kohleule nachtaktiv, sie ist vor allem in Europa verbreitet und lebt auf Waldlichtungen, am Waldrand, Gemüsegeldern und Gärten. Als Nahrungspflanzen der Raupen der Kohleule gelten verschiedene Kohlarten, aber auch beispielsweise niedere Pflanzen, Paprika, Salat oder Spinat. Deshalb gilt die Kohleule wie der Kohlweißling als Schädling, Schlupfwespen der Gattung *Microplitis* oder *Trichogramma*, die manchmal Larven oder Eier parasitisch befällt, gelten als Nützlichling. Die ausgewachsenen Falter sind graubraun mit einer wellenartigen Musterung und haben eine Flügelspannweite von 4 bis 5 cm.

²¹ Vgl. Website des NABU

Die Raupen erreichen eine Länge von bis zu 5 cm. Ihre Färbung variiert je nach Entwicklungsstadium, zu Beginn sind die Raupen grün gefärbt, mit der Zeit nehmen sie eine bräunliche Färbung mit hellgelben Streifen an der Seite an. Pro Jahr bildet die Kohleule zwei Generationen aus, die Raupen der ersten Generation sind von Mai bis Juli, die der zweiten Generation von Mitte August bis Oktober zu finden



Abbildung 8: Äußere Erscheinung der Kohleule

(Vgl. Abb. 9). Die letzte Generation pro Jahr überwintert als Puppe im Boden.^{22,23,24}

3.2. Verwendete Methoden

3.2.1. Ascorbinsäure/ Oxalat-Extraktion mit Reaktionsmechanismus

Um eine Ascorbinsäure/Oxalat-Extraktion von Metallkationen aus Pflanzen durchzuführen werden eine Extraktionslösung aus 0,1 M Ascorbinsäure; 0,2 M Di-Ammoniumoxalat-Monohydrat und 0,2 M Oxalsäure-Dihydrat (pH 3,25) und eine Waschlösung aus 0,2 M Di-Ammoniumoxalat-Monohydrat und 0,2 M Oxalsäure-Dihydrat hergestellt.

Die Extraktion wird in einer Doppelbestimmung durchgeführt, jeweils 2 g Boden bzw. Substrat werden in einem Zentrifugenglas mit 50 ml der Extraktionslösung versetzt. Nachdem sie von Hand geschüttelt wurden, werden die Lösungen in den unverschlossenen Gläsern im Wasserbad für 30 Minuten bei 96°C gekocht. Anschließend werden die Lösungen für 10 Minuten zentrifugiert und filtriert. Verbliebene Rückstände in den Zentrifugengläsern werden mit 25 ml der Waschlösung versetzt, per Hand und für 10 Minuten mittels Überkopfschüttler geschüttelt, erneut zentrifugiert und filtriert, um verbliebene Ionen noch aus den Rückständen zu extrahieren.²⁵

3.2.2. Messung mit dem Photometer

Die Messung der aufgenommenen Kupferionen mit dem Photometer wird entsprechend der Bedienungsanleitung des WINLAB Data Line Photometer unter Verwendung der entsprechenden Reagenzien von Windaus durchgeführt (Vgl. Abb. 10).

²² Vgl. Hortipendium

²³ Vgl. Insektenbox

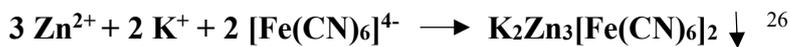
²⁴ Vgl. Oekolandbau

²⁵ Vgl. Diekmann, Joana S. 30

3.2.3. Nachweis mit gelbem Blutlaugensalz

Der Kaliumhexacyanoferrat-Nachweis von Zink ist eine Fällungsreaktion. Die Reaktion findet in neutralem Milieu, also bei einem pH von 7 statt. Unter richtigen Bedingungen bildet sich ein schmutzig weißer Niederschlag, der sich wieder löst, wenn man konzentrierte Salzsäure oder verdünnte Natronlauge hinzugibt (Vgl. Abb. 11).

Der Reaktionsmechanismus der Reaktion ist folgender:



Mit Kupfer reagiert Kaliumhexacyanoferrat zu einem braunroten Niederschlag (Vgl. Abb. 12). Es handelt sich dabei um eine Komplexbildungsreaktion.

Folgende Reaktionsgleichung beschreibt den Mechanismus dieses Nachweises:



Diese Nachweisreaktion kann somit sowohl zur Überprüfung der Zink- als auch der Kupferaufnahme der Pflanzen verwendet werden.²⁷

3.2.4. Extraktion der RNA und Messung der Genexpression

Zur Extraktion der RNA aus den Blättern wird das NucleoSpin[®] RNA Extraktions-Kit für Pflanzen und Pilze von Macherey-Nagel verwendet. Es wird die Option B aus dem entsprechenden User Manual mit den Mengen für Blätter von *Arabidopsis* verwendet, da diese, wie die Versuchspflanzen, zur Familie der Kreuzblütler (Brassicacea) gehört (Vgl. Abb. 13-18).

Für die Umwandlung der RNA in cDNA wird das GoScript[™] Reverse Transcription System Kit von Promega verwendet. Die einzelnen Schritte werden gemäß der Vorschrift durchgeführt. Für eine maximale cDNA-Ausbeute werden jeweils 4 µl des RNA Extraktes und somit 1 µl Oligo Primer verwendet, um wie angegeben ein Reaktionsvolumen von 5µl zu erhalten. Der Reverse-Transcriptions-Reaktions-Mix wird in der 25-fachen Menge hergestellt, damit genug für 22 Proben, die gemessen werden, vorhanden ist (Vgl. Abb. 19).

Um die Häufigkeiten der einzelnen Genexpressionen zu messen, wird eine Real Time PCR (PCR = Polymerase-Ketten-Reaktion, engl. **P**olymerase **C**hain **R**eaction) durchgeführt.

Die PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von DNA, die sich in drei Schritte unterteilen lässt. Der erste Schritt ist die Denaturierung, sie erfolgt bei 95°C und beschreibt das Lösen der Wasserstoffbrücken und somit die Trennung der Einzelstränge

²⁶ Vgl. Wikibooks

²⁷ Vgl. Wikibooks

der DNA (Vgl. Abb. 20). Im zweiten Schritt erfolgt bei 60°C die Primerbindung; hier lagern sich künstlich hergestellte Primer an die wieder abgekühlten DNA-Stränge an (Vgl. Abb. 21). Im dritten und letzten Schritt, der Synthese, synthetisiert das hitzebeständige Enzym Taq-Polymerase aus zugefügten Nukleotiden den jeweiligen komplementären Strang (Vgl. Abb. 22). Diese Schritte werden in sogenannten Thermocyclern wiederholt, pro Zyklus verdoppelt sich die DNA, beispielsweise hätte man nach 30 Zyklen 1 Milliarde Kopien.

Die Real-Time PCR wird mit einem PCR-Kit, genannt Mastermix, von Bioline und dem LightCycler 480II von Roche durchgeführt. Das Gerät misst die Fluoreszenz in der Probe. Das im Mastermix enthaltene SYBRGreen ist ein fluoreszierender Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Je mehr doppelsträngige DNA vorhanden ist, desto mehr SybrGreen kann sich binden; je mehr gebunden ist, desto stärker leuchtet es und desto mehr Fluoreszenz wird gemessen. Da sich die cDNA pro PCR-Zyklus verdoppelt, bedeutet ein einen Zyklus früher gemessenes Signal eine doppelt so große Menge an cDNA, somit ein doppelt so oft exprimiertes Gen.

3.3. Verwendete Materialien

3.3.1. Vorstellung der verwendeten Schwermetalle

Das Wort „Schwermetall“ wird oft direkt mit der Eigenschaft „toxisch“ in Verbindung gebracht. Jedoch ist das nicht zwingend der Fall. Schwermetalle definieren sich allein durch ihre physikalischen Eigenschaften: beträgt die Dichte eines Metalls mehr als 5 g/cm³, so gilt es als Schwermetall. Dennoch haben die meisten Schwermetalle eine toxische Wirkung auf verschiedene Lebewesen.²⁸

Es werden zwei Schwermetalle ausgewählt, deren Toxizität für den Menschen gering genug ist, um ein unbedenkliches Arbeiten möglich zu machen, die aber dennoch in der Natur ab gewissen Konzentrationen ein eingeschränktes Pflanzenwachstum und somit ein Problem hervorrufen. Die Wahl fällt auf Kupfer und Zink.

3.3.1.1. Kupfer

Kupfer gehört auf Grund seiner relativ schwachen Reaktivität zu den Halb-Edelmetallen und auf Grund seiner Dichte von 8,92 g/cm³ zu den Schwermetallen. Sein lateinischer Name „cuprum“ leitet sich von „aes cyprium“ ab, was „Erz von der Insel Zypern“ bedeutet und sich darauf zurückführen lässt, dass dort im Altertum vermehrt Kupfer gewonnen wurde. Da es ein Bestandteil verschiedener Legierungen für beispielsweise

²⁸ Vgl. VMZinc

Münzen darstellt und als sehr guter Wärme- und Stromleiter Verwendung findet, wird Kupfer auch heute noch in verschiedenen Ländern rund um die Welt gefördert.

Zudem gehört es zu den lebensnotwendigen Spurenelementen, da es ein Bestandteil vieler Enzyme höherer Lebewesen und ein Bestandteil des Blutfarbstoffs Hämocyanin ist, der dem Sauerstofftransport vieler Weichtiere und Gliederfüßer dient.

Jedoch haben gelöste Kupferionen in größeren Mengen eine toxische Wirkung auf Lebewesen, da sie, durch Binden an Thiol-Gruppen von Proteinen und Peroxidieren von Lipiden der Zellmembran, die DNA und Zellmembranen schädigen, weil es zur Bildung freier Radikale kommt.

Lagern sich Kupferionen also in großen Mengen im Boden an, so ist der Boden unbrauchbar, da er für die meisten Lebewesen keinen geeigneten Lebensraum mehr darstellt und somit eine landwirtschaftliche Nutzung ausgeschlossen ist.

Für den Menschen ist Kupfer nur relativ schwach giftig, es können bis zu 0,04 Gramm Kupfer täglich aufgenommen werden ohne Schäden zu verursachen. Lediglich wenn es durch die sehr seltene Erbkrankheit Morbus Wilson bedingt zur vermehrten Kupferanlagerung im Körper kommt, werden die Organe geschädigt. Der tägliche Bedarf eines erwachsenen Menschen an Kupfer liegt bei ca. 2 mg. Bei einem Kupfermangel oder bei einem deutlich zu hohen Kupferanteil können schwere gesundheitliche Beeinträchtigungen entstehen.^{29,30}

3.3.1.2. Zink

Zink ist ein Übergangsmetall, das aber in seinen Eigenschaften eher den Erdalkalimetallen ähnelt, zu denen beispielsweise Magnesium und Calcium zählen. Mit einer Dichte von $7,19 \text{ g/cm}^3$ zählt auch Zink zu den Schwermetallen. Auf Grund seiner zackenförmigen Erstarrung, leitet sich der Name Zink von Zinke/Zind (=Zahn, Zacke) ab.

Das recht spröde Metall wird beispielsweise zum Verzinken von Eisen- und Stahlteilen, in Batterien, im Bauwesen sowie zur Münzprägung verwendet.

Zink ist für alle Lebewesen lebensnotwendig, da es ein Bestandteil vieler Enzyme ist.

Es muss allerdings in der richtigen Menge aufgenommen werden. Laut WHO (=World Health Organization), liegt die für einen Erwachsenen empfohlene Tageszufuhr bei 12 bis 15 mg. Eine Aufnahme von mehr als 200 mg am Tag können Übelkeit, Erbrechen oder Durchfall hervorrufen, ab einer Zinkzufuhr von ungefähr einem Gramm treten beim

²⁹ Vgl. Chemie.de

³⁰ Vgl. Deutsches Kupferinstitut

Menschen akute Vergiftungserscheinungen auf. Umgekehrt kann ein Zinkmangel zu einem verminderten Geruchs- und Geschmacksinn, Hautproblemen, geistiger Trägheit, verschlechterter Wundheilung und verminderter Fruchtbarkeit führen. Für den Menschen ist also eine kontinuierliche Zinkaufnahme äußerst wichtig, es gibt allerdings auch Lebewesen, beispielsweise bestimmte Papageienarten, für die die regelmäßige Aufnahme kleiner Mengen bereits eine toxische Wirkung haben kann. So kommt beim Menschen äußerst selten ein zu hoher Zinkspiegel, aber häufiger ein Zinkmangel vor, in Ökosystemen hingegen ist ein Zinkmangel selten, ein zu hoher Zinkgehalt aber häufiger. Häufig sind die Lebewesen so an ihre Lebensräume angepasst, dass sie Schwankungen des dortigen Zinkgehalts bis zu einem gewissen Grad ausgleichen können, auch da die ökologische Toleranz für Zink meist recht breit ist. Jedoch kommt es bei zu radikalen Änderungen im Zinkgehalt zu einer Beeinträchtigung der dort beheimateten Lebewesen.^{31,32}

3.3.2. Material zum Anbauen der Pflanzen

Für die Anzucht der Pflanzen werden Anzuchtkästen verwendet, für die Vorversuche werden die Pflanzen in kleine einzelne Töpfe gesetzt, die in Pflanztrays gestellt werden, für den Hauptversuch in entsprechenden Pflanzgruppen in lange Pflanzkästen.

Es wird eine einfache Blumenerde ohne zusätzlichen Dünger gewählt. Die verwendete Erde ist eine torf reduzierte Mischung mit Humusanteilen und hat einen pH-Wert von 6,4. Die Inhaltsstoffe finden sich in einer Tabelle im Anhang (Vgl. Abb. 23).

Gegossen werden die Pflanzen mit in einer Regentonne gesammeltem Regenwasser. Um die Kupfer- und Zinkionen in der Erde zu einzulagern, werden CuSO_4 und ZnSO_4 jeweils in der entsprechenden abgewogenen Menge in destilliertem Wasser gelöst.

3.3.3. Materialien zur Extraktion der Metallionen

Für die Extraktion werden die in der Versuchsvorschrift genannten Stoffe, Ascorbinsäure, Di-Ammoniumoxalat-Monohydrat und Oxalsäure-Dihydrat verwendet. Außerdem wird eine entsprechende Anzahl an Reagenz- und Zentrifugengläsern, Filterpapier, eine Herdplatte und ein Becherglas für das Wasserbad und eine Zentrifuge benötigt.

3.3.4. Material zur Messung mit dem Photometer und mittels Hexacyanoferrat

Für die quantitative Bestimmung der aufgenommenen Metallionen wird das WinLab Dataline Photometer von Windaus verwendet (Vgl. Abb. 24). Um die Aufnahme damit

³¹ Vgl. VMZinc

³² Vgl. Chemie.de

messen zu können, werden bestimmte Reagenzien benötigt. Die entsprechenden Reagenzien für Kupfer werden verwendet, außerdem werden die dem Photometer entsprechenden Küvetten benutzt.

Die für eine Messung der Zinkaufnahme werden nicht mehr verkauft, somit kann die Aufnahme an Zinkionen nicht quantitativ bestimmt werden.

Hierfür wird der chemische Nachweis mittels Hexacyanoferrat, auch gelbes Blutlaugensalz genannt, gewählt. Dafür werden Natronlauge zur Neutralisation der Extrakte und Hexacyanoferrat für den eigentlichen Nachweis verwendet.

3.3.5. Material zur Extraktion und Messung der RNA

Für die Extraktion der RNA werden das NucleoSpin® RNA Extraktions-Kit für Pflanzen und Pilze von Macherey-Nagel, eine entsprechende Anzahl der beschriebenen Bead Tubes und Reaktionsgefäße, ein Homogenisator (Abb. 25), ein Heizschüttler (Abb. 26) sowie eine Zentrifuge (Abb. 27) verwendet.

Für den Umschrieb der RNA in cDNA wird das GoScript™ Reverse Transcription System Kit von Promega, ein Thermocycler und eine entsprechende Anzahl Reaktionsgefäße verwendet.

Um die Messung der cDNA durchzuführen, werden der Mastermix von Bioline, eine Multiwell Plate (Abb. 28) und ein LightCycler 480 II von Roche (Abb. 29) verwendet.

3.3.6. Auswahl der zu messenden Gene

Das Ziel ist, aus bisherigen Forschungsergebnissen heraus, Gene auszuwählen, die vielversprechend sind, an der Hyperakkumulation beteiligt zu sein.

Das erste gewählte Gen codiert COPT, ein Carrierprotein, das in Forschungen an *Arabidopsis thaliana* dem Transport von Kupferionen ins Innere der Zelle diene (Vgl. Abb. 30).

Ein weiteres Gen codiert RAN1, das in Versuchen an *Arabidopsis thaliana* dazu diene, Kupferionen in das Innere des Golgi-Apparates zu transportieren (Vgl. Abb. 30).³³

Außerdem wird MTP1 gewählt, welches dem Transport von Zink (und möglicherweise auch Kupfer) in die Vakuolen der Zellen dient, was Forschungen an *Arabidopsis halleri* zeigten (Vgl. Abb. 31).³⁴

Das Gen für PAA wird gewählt, da es, nach Forschungen an Pflanzen der Gattung *Arabidopsis*, unter Einwirkung von Kupfer geringer exprimiert wird als unter normalen

³³Vgl. Peñarrubia, Lola et al.

³⁴ Vgl. Merlot, Sylvain et al.

Gegebenheiten. Es ist für den Transport von Kupferionen in die Chloroplasten zuständig.³⁵

Das letzte gewählte Gen, APX, bildet ein Enzym, das häufig unter Einfluss von abiotischen Stressfaktoren für die Pflanze, wie etwa Trockenheit, Salz-Stress, grellem Licht, besonders hohen oder niedrigen Temperaturen oder Krankheitserregern verhäuft exprimiert wird.³⁶ Da auch der Einfluss von Schwermetallen einen Stressfaktor darstellt, wird APX möglicherweise auch unter dem Einfluss von Kupfer und Zink vermehrt gebildet.

Außerdem werden die Haushaltsgene GAPDH (abgekürzt GAP) und TIP41 (abgekürzt T41) verwendet. Als Haushaltsgene werden Gene bezeichnet, die in allen zu vergleichenden Proben in etwa gleich stark exprimiert werden und somit als Kontrolle verwendet werden können, mit denen die Werte der anderen gemessenen Gene verglichen werden können. Dadurch können eventuelle Unterschiede unter den Massen der von den jeweiligen Pflanzen entnommenen Teilproben ausgeglichen werden. GAP und T41 sind in einer Vergleichsanalyse als die Gene aufgefallen, die insgesamt unter verschiedenen Stressfaktoren in den beobachteten Pflanzen am gleichförmigsten exprimiert worden sind.³⁷

Für die PCR wurden die jeweiligen entsprechenden Primer verwendet. Eine detaillierte Tabelle hierzu befindet sich im Anhang.

4. Versuchsdurchführungen

4.1. Vorversuch 1 – Vergleich der Wirkung von Metallionen bei Zugabe vor bzw. nach der Keimung

Das Ziel des ersten Vorversuchs ist es, zunächst einmal festzustellen, ob der Zeitpunkt der Ionengabe entscheidend ist. Also konkret, ob es einen sichtbaren Unterschied gibt, je nachdem ob die Metallionen-Lösung vor oder nach der Keimung in die Erde gegeben wird.

4.1.1. Versuchsaufbau

In zwei Pflanztrays für jeweils 10 Töpfe werden am 15. Februar 2018 in kleinen Blumentöpfen von 6 cm Höhe je 3 Samen von *Brassica juncea* var. *rugosa* gesät. Die Erde der Pflanzen im ersten Tray wird mit gelöstem CuSO₄, die im zweiten mit gelöstem

³⁵ Vgl. Sudo, Emi et al.

³⁶ Vgl. Caverzan, Andréja et al.

³⁷ Vgl. Sheng, X.G. et al.

ZnSO₄ versetzt. Je eine Reihe mit 5 Töpfen wird direkt nach der Aussaat mit der Metalllösung in 5 verschiedenen Konzentrationen gegossen. Als Mengen werden 0g; 0,5g; 5g; 10g; 25g CuSO₄ bzw. ZnSO₄ gewählt, die in jeweils der gleichen Menge Wasser gelöst werden. Es wird jeweils ein Topf mit einer gesamten Lösung gegossen.

4.1.2. Beobachtungen

4.1.2.1. Wachstums- & Keimungsverhalten

Zunächst ist zu beobachten, dass zwei Pflanzen in den beiden Reihen, die noch keine Metallionen in der Erde gelöst haben, nach ungefähr einer Woche zu keimen beginnen. In der Reihe mit Metallgabe vor der Keimung keimen keine Pflanzen. (Vgl. Abb. 32) Nach ein paar Tagen keimen noch fünf weitere der unbehandelten Pflanzen (Vgl. Abb. 33).

Nach circa vier Wochen zeigen die gekeimten Pflanzen ähnliche Symptome wie beim Vertrocknen trotz regelmäßiger ausreichender Bewässerung (Vgl. Abb. 34). Nach einer weiteren Woche sind alle Pflanzen komplett abgestorben, obwohl sie nur mit Leitungswasser gegossen werden und noch keine Metalllösungen hinzugegeben wurden.

4.1.2.2. Sonstige Beobachtungen

Nach knapp zwei Wochen bilden sich unterschiedlich starke bläuliche bzw. weiße Krusten auf der Erde in den Töpfen, in die bereits Metalllösung gegeben wurde. Am stärksten sind die Krusten bei den jeweils größten Mengen ausgeprägt, am schwächsten bei den niedrigsten (Vgl. Abb. 35).

4.1.3. Erklärungen & Fehlerdiskussion

Es ist sehr wahrscheinlich, dass sich die Krusten bilden, weil die Kupfer- bzw. Zinkmenge für das Erdvolumen deutlich zu hoch ist.

Dass die Pflanzen auf Grund von Wassermangel austrocknen, ist unwahrscheinlich, da die Pflanzen ausreichend gegossen werden. Es ist wahrscheinlicher, dass Kupfer- bzw. Zink Ionen in die Erde der entsprechenden Pflanzen gelangen, da immer zwei oder drei Mulden des Trays miteinander verbunden sind und das Gießwasser nebeneinanderstehender Töpfe sich vermischt und auch in den Verbindungen zwischen den Mulden blaue bzw. weiße Ablagerungen sichtbar werden (Abb. 36).

4.1.4. Schlussfolgerungen

Insgesamt kann man sehen, dass die Schwermetall Ionen die Keimung und auch das Pflanzenwachstum ab einer gewissen Konzentration extrem einschränken. Ist die

Konzentration in der Erde zu hoch, so haben die Ionen eine toxische Wirkung auf die Pflanzen, obwohl diese Art als Hyperakkumulator bekannt ist.

Deshalb wird versucht die Menge an das Erdvolumen und die Pflanzen anzupassen und geringere Mengen zu wählen.

Außerdem haben CuSO_4 und ZnSO_4 nicht dieselbe molare Masse, also werden zum besseren Vergleich fünf Stoffmengen an Stelle von fünf Mengen in Gramm gewählt.

4.2. Vorversuch 2 – Anpassung der Ionenmenge an Pflanzen und Erdvolumen

Aufgrund der Beobachtungen aus Vorversuch 1 wurden dieses Mal kleinere Mengen gewählt. Das Ziel des zweiten Vorversuchs ist es, die Schwermetallmenge an das Versuchsumfeld anzupassen und zu schauen, ob es einen sichtbaren Unterschied zwischen den jeweiligen Pflanzen nach Gabe unterschiedlicher Ionenmengen gibt.

4.2.1. Versuchsaufbau

Der zweite Vorversuch wird am 11. März 2018 begonnen.

Die übrigen Samen von *Brassica juncea* var. *rugosa* werden in zwei Aussaatwannen ausgesät. Nachdem sie eine Höhe von ungefähr 5 cm erreicht haben, werden sie in Töpfe der gleichen Größe, wie in Vorversuch 1 verwendet, umgetopft (Vgl. Abb. 37) und anschließend in einer Doppelbestimmung mit fünf verschiedenen Stoffmengen an gelöstem CuSO_4 bzw. ZnSO_4 gegossen. Dieses Mal wurden als Mengen 0,003 mol; 0,005 mol; 0,01 mol und 0,02 mol gewählt.

4.2.2. Beobachtungen

Die Pflanzen wachsen zunächst weiter, nach ungefähr einer Woche zeigen sich leichte Ablagerungen bei den Töpfen mit 0,02 mol und sehr schwache Ablagerungen bei den Töpfen mit 0,01 mol CuSO_4 bzw. ZnSO_4 . Nach zwei Wochen sterben die Pflanzen in beiden Töpfen mit der höchsten Kupferkonzentration und in einem der Töpfe mit der höchsten Zinkkonzentration (Vgl. Abb. 38). Nach drei Wochen geht eine der Pflanzen mit 0,005 mol Kupfer ein, am Spross ist eine kleine blaue Ablagerung zu sehen. Auch dieses Mal zeigen die Pflanzen wieder ähnliche Symptome wie beim Vertrocknen, bevor sie eingehen. Bei diesem Versuch ist gut zu beobachten, dass das Austrocknen der Pflanzen nicht wie gewöhnlich mit dem Austrocknen und anschließendem Abfallen der Blätter beginnt und sich anschließend auf den Spross ausweitet, sondern mit dem Austrocknen der unteren Hälfte des Sprosses beginnt und sich nach oben hin ausweitet (Vgl. Abb. 39).

Die übrigen Pflanzen zeigen noch ein leichtes Wachstum, wachsen allerdings nur noch gering in die Höhe, am größten sind die Pflanzen ohne und mit der niedrigsten Metallionengabe.

4.2.3. Erklärungen & Fehlerdiskussion

Auch dieses Mal ist die höchste Konzentration wahrscheinlich noch immer zu hoch für das Erdvolumen, weshalb sich Krusten auf der Erdoberfläche bilden und der Großteil der Pflanzen mit dieser Menge abstirbt.

Es ist gut möglich, dass die Pflanze mit 0,005 mol Kupfer gestorben ist, weil ein Teil der Lösung beim Gießen direkt auf die Pflanze gelangt sein könnte bzw. zu viel Lösung zu konzentriert in der nächsten Umgebung der Pflanze gelandet sein könnte oder die Pflanze aus irgendeinem Grund besonders viel Cu^{2+} Ionen aufgenommen hat, diese nicht in dieser Menge verwerten konnte und deshalb an bestimmten Stelle eine zu hohe Konzentration an Kupfer hatte, was die Ablagerung am Spross erklären würde.

4.2.4. Schlussfolgerungen

Für den Hauptversuch müssen die Schwermetall-Konzentrationen noch einmal überdacht und verringert werden, so dass möglichst keine Pflanzen durch eine zu große Ionenmenge eingehen. Außerdem muss beim Gießen der Metalllösung darauf geachtet werden, dass die Lösung in die Erde geht und nicht von vornherein direkt an die oberirdischen Pflanzenteile gelangt.

4.3. Hauptversuch – Vergleich dreier Brassica-Arten in der Aufnahme von Kupfer- und Zink-Ionen aus dem Boden und in der Genexpression unter Einfluss der Ionen

Das Ziel des Versuchs ist, durch Beobachtungen und Messungen die Wirkung von Kupfer und Zink auf drei verschiedene Senfarten zu untersuchen und sie in ihrer Aufnahme der Schwermetallionen zu vergleichen.

4.3.1. Versuchsaufbau

Am 13. Mai 2018 wird der Hauptversuch begonnen.

Zunächst werden *Brassica juncea*, *Brassica nigra* und *Brassica carinata* in Anzuchtkästen ausgesät und wachsen gelassen (Vgl. Abb. 40). Nach fünf einhalb Wochen werden die Pflanzen umgetopft in Pflanzkästen mit den Maßen 15cm x 15cm x 120cm und ins Freie gestellt. Pro Kasten werden jeweils fünf Pflanzen jeder Art gesetzt, zwischen den Arten wird zur besseren Übersicht ein Abstand gelassen (Vgl. Abb. 41).

Kupfer- und Zinksulfat werden in den Mengen 0,003 mol; 0,005 mol; 0,01 mol; 0,02 mol abgewogen (Vgl. Abb. 42) und in jeweils der gleichen Menge Wasser gelöst. Zwei

Wochen nach dem Umtopfen werden die jeweiligen Lösungen einer bestimmten Konzentration auf jeweils fünf Pflanzen einer Art verteilt, die drei Pflanzengruppen innerhalb eines Kastens bekommen alle die gleiche Konzentration. Die Mengen aus dem letzten Vorversuch werden auf jeweils fünf Pflanzen aufgeteilt, da die Konzentrationen zum Teil noch deutlich zu hoch waren und es selbst mit einer Feinwaage schwierig ist noch geringere Mengen einzuwiegen und das Risiko besteht, dass, wenn die unterschiedlichen Mengen zu ähnlich sind, keine Unterschiede sicht- oder messbar sind.

Anschließend wird das Wachstum der Pflanzen und sonstige Auffälligkeiten beobachtet und nach vier einhalb Wochen werden die Pflanzen geerntet, in Blätter und Früchte und Wurzeln aufgeteilt und getrocknet. Aus dem getrockneten Pflanzenmaterial werden nach dem bestimmen der Trockenmassen die Cu^{2+} bzw. die Zn^{2+} Ionen extrahiert. Mittels Photometer und Kaliumhexacyanoferrat (II)-Nachweis (auch: Nachweis mit gelbem Blutlaugensalz) wird die Aufnahme an Metallionen gemessen.

4.3.2. Wachstum

4.3.2.1. Beobachtung des Wachstums

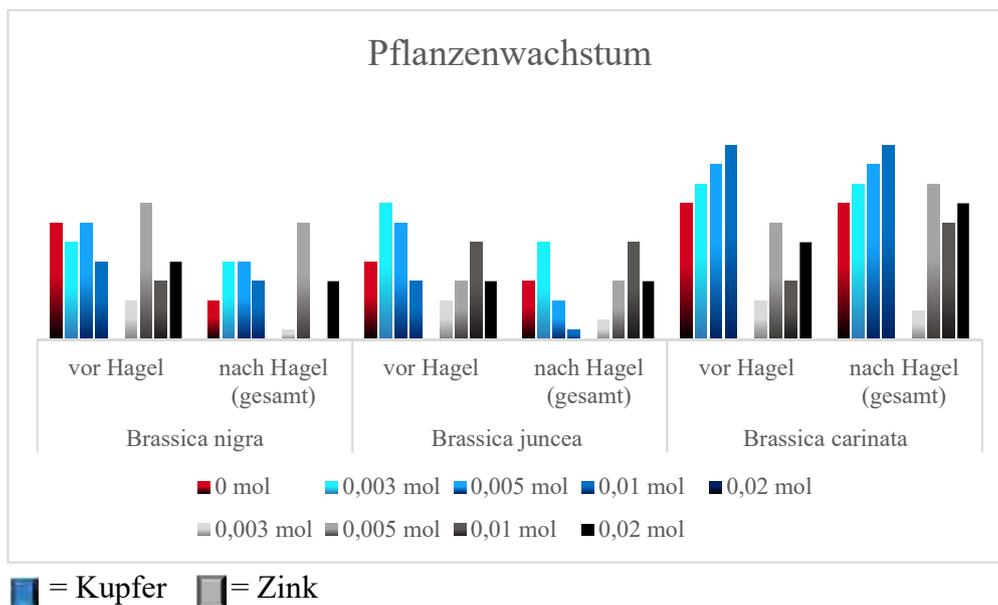
Zunächst ist ein stetiges Wachstum aller Pflanzen zu beobachten, allerdings sind deutliche Unterschiede in der Stärke des Wachstums festzustellen (Vgl. Abb. 43).

Nach drei Tagen beginnen alle Pflanzen mit der höchsten Konzentration Cu^{2+} Ionen in der Erde einzugehen. Auch dieses Mal zeigen sich zuerst Vertrocknungserscheinungen am unteren Teil des Sprosses, die sich innerhalb von zwei Tagen von unten nach oben auf die gesamte Pflanze ausweiten. Einen Tag später beginnt ein Teil der Pflanzen von *Brassica juncea* mit der zweithöchsten Konzentration Cu^{2+} Ionen auf die gleiche Art einzugehen (Vgl. Abb. 44).

Knapp eine Woche nach der Ionengabe wird ein Teil der Pflanzen durch einen Hagelschauer beschädigt (Vgl. Abb. 45), die Pflanzen erholen sich unterschiedlich gut von den Folgen des Hagels, die Pflanzen von *Brassica nigra* mit 0,01 mol Zinkionen in der Erde sind stark beschädigt und stellen das Wachstum ein. Bei den übrigen Pflanzen kann weiterhin ein verschieden starkes, stetiges Wachstum beobachtet werden (Vgl. Abb. 46). Das Wachstum wird im Folgenden in einer Tabelle zusammengefasst, wobei die unterschiedlichen Größen der Pflanzen untereinander verglichen und auf einer Skala von 0 bis 5 bewertet werden. Hierbei steht 0 für das kleinste und 5 für das größte Wachstum.

	<i>Brassica nigra</i>		<i>Brassica juncea</i>		<i>Brassica carinata</i>	
	vor Hagel	nach Hagel (gesamt)	vor Hagel	nach Hagel (gesamt)	vor Hagel	nach Hagel (gesamt)
0 mol	3	1	2	1,5	3,5	3,5
0,003 mol	2,5	2	3,5	2,5	4	4
0,005 mol	3	2	3	1	4,5	4,5
0,01 mol	2	1,5	1,5	0,25	5	5
0,02 mol	0	0	0	0	0	0
0,003 mol	1	0,25	1	0,5	1	0,75
0,005 mol	3,5	3	1,5	1,5	3	4
0,01 mol	1,5	0	2,5	2,5	1,5	3
0,02 mol	2	1,5	1,5	1,5	2,5	3,5

Zur besseren Übersicht werden die Ergebnisse im Folgenden grafisch dargestellt:



Auffällig ist auch, dass die meisten der Pflanzen mit Metallionengabe merkbar kräftiger sind als die ohne. Betrachtet man die verschiedenen Arten und Konzentrationen zusammengefasst, so lässt sich insgesamt sagen, dass die Pflanzen auf mit Kupferionen versetztem Boden den massivsten Spross ausbilden, anschließend kommen die mit Zinkionen behandelten Pflanzen und den dünnsten Spross findet man bei den Pflanzen auf unbehandeltem Boden (Vgl. Abb. 47).

4.3.2.2. Analyse der Beobachtungen

Eine erste Erkenntnis ist, dass sich die Metallionen im Boden deutlich auf das Wachstum auswirken. Bei allen Arten ist das Gesamtwachstum der Pflanzen auf un behandelter Erde geringer als bei mindestens einer der jeweiligen Metallkonzentrationen, sowohl bei Zink- als auch bei Kupfergabe. Auch waren diese Pflanzen kräftiger. Daraus lässt sich schließen, dass die Metallionen das Wachstum in diesen Pflanzen anregen, möglicherweise, weil die Pflanze diese Stoffe in irgendeiner

Weise nutzen kann, vielleicht ist es aber auch eine Schutzreaktion der Pflanze auf die Schwermetallbelastung.

Von den Pflanzen mit der höchsten Kupferkonzentration und denen des braunen Senfes mit der zweithöchsten Kupferkonzentration abgesehen, waren keine Schäden an den Pflanzen zu sehen, was zeigt, dass die Metallionen auf diese Pflanzen nicht dieselbe toxische Wirkung haben wie auf die meisten anderen Pflanzen.

Auch lässt sich feststellen, dass der braune Senf eine geringere Kupfertoleranz hat als die anderen beiden Arten, nachdem hier auch die zweithöchste Konzentration zu einem Eingehen der Pflanzen geführt hat. Der äthiopische Senf, der grundsätzlich die größte Biomasse-Produktion der drei Arten hat, kommt unter den verglichenen Arten am besten mit den Schwermetallionen klar. Er bildet die kräftigsten Pflanzen, im Gegensatz zu den anderen Arten ist bei dieser Art das Wachstum bei der höchsten Kupferkonzentration insgesamt am größten.

4.3.3. Fraß durch Raupen des Kohlweißlings und der Kohleule

4.3.3.1. Beobachtung des Fraßes

Kurze Zeit nachdem die Pflanzen nach draußen gestellt wurden, sind Fraßspuren an den Pflanzen zu sehen. Schnecken können als Konsumenten ausgeschlossen werden, da der Tisch, auf dem die Pflanzkästen stehen, zum Schutz vor Schnecken an den Beinen mit Kupferband versehen ist. Darüber kriechen Schnecken nicht, da ihr Schleim chemisch mit Kupfer reagiert und einen unangenehmen elektrischen Reiz auslöst. Des Weiteren sind weder auf dem Tisch noch auf den Pflanzen Schleimspuren zu sehen.

Deutlich wahrscheinlicher ist es, dass die Pflanzen von den Raupen gefressen werden. Auffällig ist, dass viele weiße Schmetterlinge, vermutlich Kohlweißlinge, rund um die Pflanzen zu sehen sind und verschiedene bräunliche, grüne und verpuppte Raupen auf den Blättern zu finden sind (Vgl. Abb. 48-50). Zusätzlich werden auf zwei der Pflanzen mit der niedrigsten Zinkkonzentration zwei verschiedene Eiablagen gefunden und ein weißer Schmetterling, auf

den die Beschreibung des Kohlweißlings passt, dabei beobachtet, wie er Eier auf einer der Pflanzen ablegt, die aussehen wie eine der beiden gefundenen Ablagen.

Um festzustellen, von welchen Tierarten die Eier stammen, werden sie in einem Genetiklabor untersucht. Bei den gelben, länglicheren Eiern (Abb. 51) handelt es sich um die Eiablage eines Kohlweißlings (*Pieris brassicae*), bei den rundlicheren Eiern (Abb. 52) um die der Kohleule (*Mamestra brassicae*), die zum Teil von einer parasitären Schlupfwespe (*Trichogramma evanescens*) befallen sind.



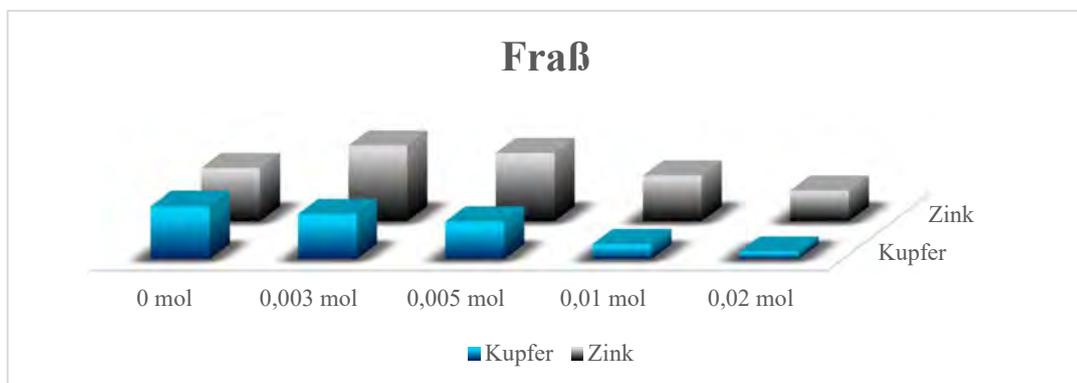
Abbildung 51: Eiablage des großen Kohlweißlings

Die Stärke der Fraßspuren wird ebenfalls miteinander verglichen und auf einer Skala von 0 bis 5 bewertet. Bei der höchsten Kupferkonzentration kann nur der Fraß betrachtet werden, der zu sehen war, bevor die Pflanzen eingingen. Die Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch und graphisch zusammengefasst.



Abbildung 52: Eiablage der Kohleule

	0 mol	0,003 mol	0,005 mol	0,01 mol	0,02 mol
Kupfer	3,5	3	2,5	1	0,5
Zink	3,5	5	4,5	3	2



4.3.3.2. Analyse der Beobachtungen

Es ist deutlich zu sehen, dass vor allem diejenigen Pflanzen, die auf Kupferhaltigem Boden wachsen, aber auch die Pflanzen, die eine hohe Konzentration an Zinkionen im Boden haben, weniger von den Raupen gefressen werden, als die Pflanzen, die auf unbehandeltem Boden wachsen.

Das legt die Vermutung nahe, dass die Metallionen die Pflanze vor Fressfeinden schützen, da die Raupen Metallionen meiden oder sie durch die toxische Wirkung absterben.

Dieser Fraßschutz ist eine mögliche Erklärung dafür, warum die Pflanzen die für sie eigentlich toxischen Metalle aus dem Boden ziehen und in ihren Zellen speichern.

4.3.4. Messung der Aufgenommenen Menge an Metallionen

4.3.4.1. Bestimmung der Trockenmassen

Zunächst werden die getrockneten Pflanzenteile aufgeteilt, die mit Kupfer behandelten Pflanzenteile in je zwei Portionen für eine Doppelbestimmung mit dem Photometer und eine kleinere Portion für einen qualitativen Kupfernachweis, die mit Zink behandelten Pflanzenteile in je zwei Portionen für eine Doppelbestimmung mit einem qualitativen Zinknachweis. Anschließend werden die jeweiligen Trockenmassen bestimmt, die in der folgenden Übersicht zusammengestellt sind:

Die Mengen in den folgenden Tabellen und Graphiken sind jeweils in Gramm angegeben, bei den Pflanzen, die eingegangen waren, werden die gesamten Pflanzenreste in drei (Kupfer) beziehungsweise zwei (Zink) Portionen aufgeteilt und gewogen, in der Tabelle sind an den entsprechenden Stellen die Zellen zusammengefügt. Die Kontrollpflanzen werden nicht in Portionen aufgeteilt, sondern jeweils die Blätter und Wurzeln als gesamte Portion gewogen.

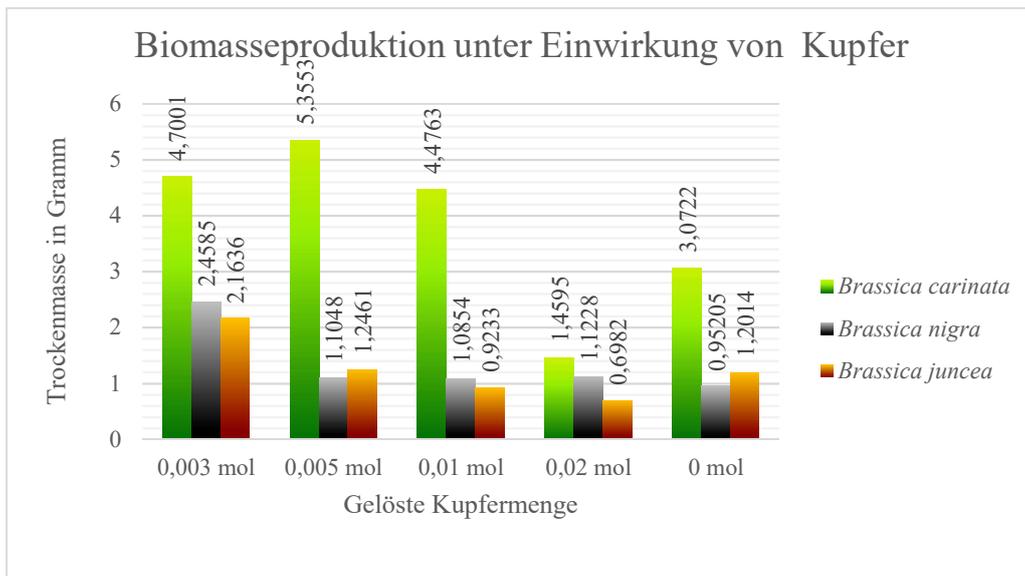
Kupfer:

Menge an gelösten Metallionen	<i>Brassica carinata</i>						
	Blätter und Früchte			Wurzeln			Gesamt
0,003 mol	1,673	0,5843	0,4067	1,2452	0,6526	0,1383	4,7001
0,005 mol	1,9309	1,3415	0,4497	0,7061	0,587	0,3401	5,3553
0,01 mol	1,7956	0,8334	0,5725	0,7416	0,4352	0,098	4,4763
0,02 mol	0,6581		0,6069		0,1945		1,4595
0 mol	1,5602			1,512			3,0722

Menge an gelösten Metallionen	<i>Brassica nigra</i>						
	Blätter und Früchte			Wurzeln			Gesamt
0,003 mol	0,7627	0,8275	0,1872	0,2864	0,3448	0,0499	2,4585
0,005 mol	0,5177	0,3441	0,123	0,0688	0,032	0,0192	1,1048
0,01 mol	0,448	0,2698	0,0796	0,2196	0,0478	0,0206	1,0854
0,02 mol	0,507		0,4915		0,1243		1,1228
0 mol	0,66455			0,2875			0,95205

Menge an gelösten Metallionen	<i>Brassica juncea</i>						
	Blätter und Früchte			Blätter und Früchte			Gesamt
0,003 mol	1,0176	0,4965	0,2485	0,198	0,1253	0,0777	2,1636
0,005 mol	0,5275	0,3096	0,1533	0,1388	0,0869	0,03	1,2461
0,01 mol	0,3514	0,3243	0,144	0,0566	0,0372	0,0098	0,9233
0,02 mol	0,308		0,2922		0,098		0,6982
0 mol	0,8011			0,4003			1,2014

Im Folgenden sind die Trockenmassen der Übersicht halber zum besseren Vergleich graphisch dargestellt. Hierbei muss beachtet werden, dass es sich um die Trockenmasse der Blätter und Wurzeln zusammen, aber nicht um die gesamten Pflanzen handelt, der Spross wird nicht berücksichtigt, da die Metallkonzentration in Blättern und Wurzeln gemessen und verglichen werden soll.

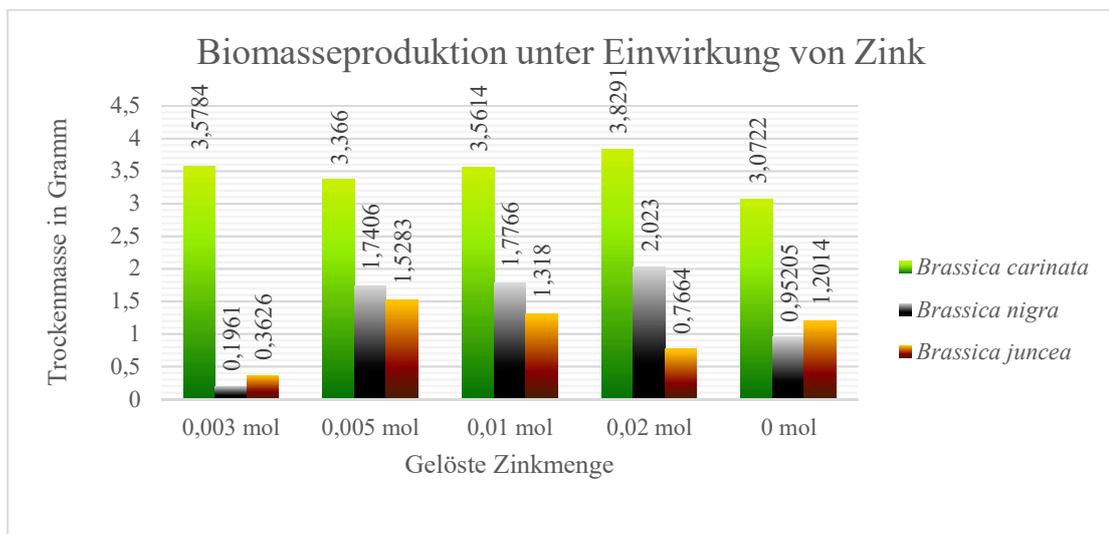


Zink:

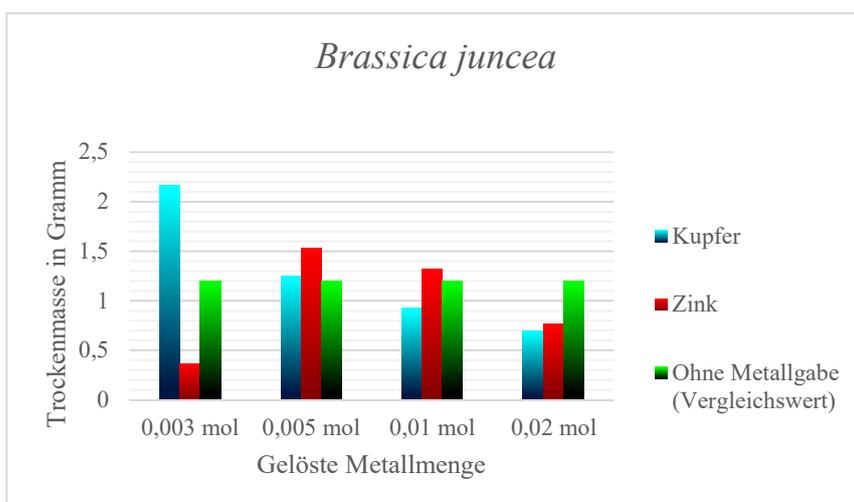
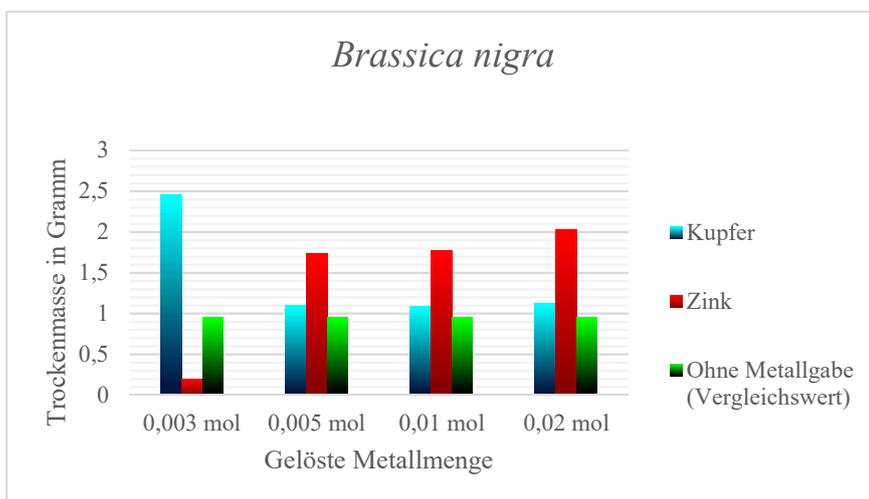
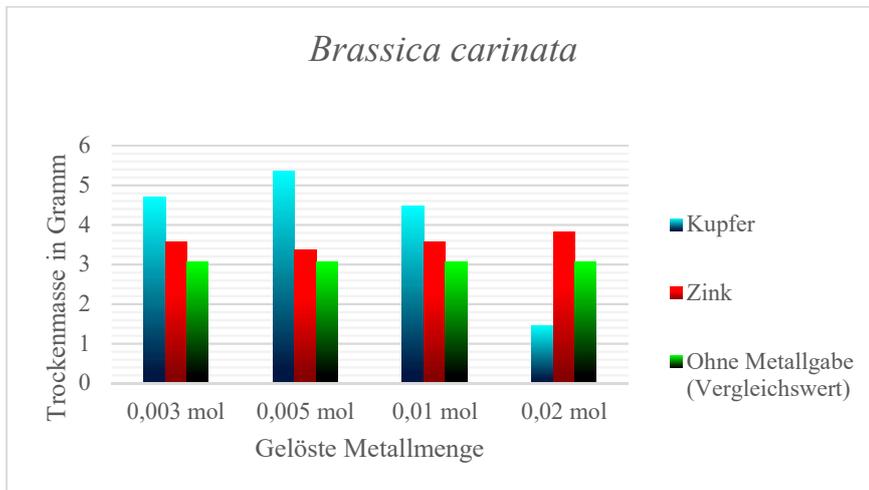
Menge an gelösten Metallionen	<i>Brassica carinata</i>				
	Blätter und Früchte		Wurzeln		Gesamt
0,003 mol	1,3135	0,6062	0,8222	0,8365	3,5784
0,005 mol	0,709	0,6615	1,4204	0,5751	3,366
0,01 mol	1,2635	0,8245	0,8527	0,6207	3,5614
0,02 mol	1,3346	1,2269	0,8564	0,4112	3,8291
0 mol	1,5602		1,512		3,0722

Menge an gelösten Metallionen	<i>Brassica nigra</i>				
	Blätter und Früchte		Wurzeln		Gesamt
0,003 mol	0,0653	0,0769	0,0378	0,0161	0,1961
0,005 mol	0,526	0,397	0,4609	0,3567	1,7406
0,01 mol	1,1158		0,6608		1,7766
0,02 mol	0,981	0,674	0,1998	0,1682	2,023
0 mol	0,66455		0,2875		0,95205

Menge an gelösten Metallionen	<i>Brassica juncea</i>				
	Blätter und Früchte		Wurzeln		Gesamt
0,003 mol	0,1141	0,0967	0,0818	0,07	0,3626
0,005 mol	0,3755	0,5211	0,2594	0,3723	1,5283
0,01 mol	0,5855	0,3773	0,209	0,1462	1,318
0,02 mol	0,3231	0,2502	0,1069	0,0862	0,7664
0 mol	0,8011		0,4003		1,2014



Die folgenden Diagramme zeigen die Trockenmassen der einzelnen Pflanzenarten unter Einwirkung von Kupfer und Zink im Vergleich zur Masseproduktion ohne Zugabe von Metallionen:



4.3.4.2. Extraktion

Um die aufgenommene Metallionenmenge messen zu können werden die Zn^{2+} bzw. Cu^{2+} Ionen mittels Oxalat-/Ascorbinsäure-Extraktion aus den Pflanzen extrahiert.

Aufgrund der geringen Trockenmassen werden anstatt 50 ml wie in der Versuchsanweisung angegeben nur 25 ml Extraktionslösung verwendet. Auf die Waschlösung wird verzichtet, da die zusätzliche Flüssigkeit die Metallkonzentration in der Lösung weiter verringert und dadurch das Risiko besteht, dass die Konzentrationen nicht mehr mit dem Photometer messbar sind, da sie unterhalb der messbaren Grenze von 0,1 mg/l liegen.

Da die Extraktion sehr zeitaufwändig ist, wird entschieden, sich nur auf eine Versuchsreihe zu beschränken, da es nicht möglich ist, aus allen 115 Portionen in einer vertretbaren und machbaren Zeit die Metallionen zu extrahieren. Die Wahl fällt auf die Blätter & Früchte von *Brassica carinata*, da diese Art unter den drei Arten am besten gewachsen ist. Es werden die Blätter und nicht die Wurzeln gewählt, da man bei den Wurzeln große Messungenauigkeiten hat, weil die Erde nicht komplett von den Wurzeln abzuwaschen ist.

Die einzelnen Portionen werden in Reagenzgläser gegeben, mit der Extraktionslösung versetzt und der Anweisung nach im Wasserbad aufgekocht. Für die Zentrifugation wird jeweils eine Lösung auf zwei Zentrifugengläser aufgeteilt, da die Gläser ein zu kleines Volumen für die gesamten Lösungen haben (Vgl. Abb. 53). Zwei Gläser zerspringen während dem Zentrifugieren und werden in neuen Gläsern erneut zentrifugiert. Es handelt sich dabei um je eines der Zentrifugengläser zweier Teilproben der höchsten Kupferkonzentration.

Nach der Zentrifugation werden die Lösungen filtriert (Vgl. Abb. 54). Hierbei fällt auf, dass die Lösungen sich unterschiedlich gut filtrieren lassen. Bei der ersten und der dritten Portion mit 0,01 mol Kupfer, der zweiten Portion mit 0,003 mol Kupfer und der zweiten Portion mit 0,02 mol Zink, muss die Filtration abgebrochen werden, obwohl noch nicht die gesamte Lösung gefiltert wurde, da trotz mehrfachem Filterwechsel der Filter weiterhin so schnell verstopft, dass nichts mehr von der Flüssigkeit durchfließen kann. Es fällt auf, dass sich bei manchen Lösungen beim Zentrifugieren ein Schleim bildet, dies ist bei einem Teil der Nullprobe, 0,01 mol Kupfer Teilprobe 1 und einem Teil von 0,01 mol Kupfer Teilprobe 2 der Fall. Insgesamt ist zu bemerken, dass sich die Extrakte, in denen mehr Pflanzenmaterial vorhanden ist schwerer filtrieren lassen und eher Schleim bilden.

Bis zur weiteren Verwendung werden die Extrakte in den Kühlschrank gestellt.

4.3.4.3. Messungen mit dem Photometer

Da die Zink-Reagenzien für das verwendete Photometer nicht mehr verkauft werden, muss auf die Messung der aufgenommenen Zn^{2+} Ionen mittels Photometer verzichtet werden.

Die Kupferlösungen werden entsprechend der Gebrauchsanweisung mit den zugehörigen Reagenzien versetzt und gemessen. Das Photometer kann Konzentrationen von 0,1-12 mg/l messen. Da nicht alle Extrakte das notwendige Volumen von 5 ml haben, muss ein Teil mit destilliertem Wasser gestreckt werden. 0,003 mol Kupfer Teilprobe 1 wird im Verhältnis 1:1; 0,005 mol Kupfer Teilprobe 2 im Verhältnis 2:3; 0,01 mol Kupfer Teilprobe 2 im Verhältnis 4:1 und 0,02 mol Kupfer Teilprobe 1 im Verhältnis 3:5 mit destilliertem Wasser gemischt, wobei die erste Zahl jeweils für das Extrakt, die zweite Zahl für das Wasser steht.

Bis auf 0,02 mol Kupfer Teilprobe 2 ist der Kupfergehalt in allen Lösungen unterhalb der Messgrenze.

Bei 0,02 mol Kupfer Teilprobe 2 wird eine Konzentration von 0,12 mg/l gemessen. Gerechnet auf die zugehörige Trockenmasse von 0,6069 g entspricht das einer Aufnahme von ca. 0,0049 mg pro Gramm Trockenmasse der Pflanze.

4.3.4.4. Nachweis mit Kaliumhexacyanoferrat (II)

Um einen qualitativen bis ansatzweise quantitativen Messwert zu bekommen, wird der Nachweis mittels Kaliumhexacyanoferrat (II), auch gelbes Blutlaugensalz genannt, verwendet. Dieser Nachweis funktioniert sowohl mit Kupfer als auch mit Zink und ist unkompliziert durchzuführen.

Die Reaktion funktioniert der Versuchsanweisung nach nur bei einem pH-Wert von 7. Die Extrakte haben einen mit pH-Papier bestimmten pH-Wert zwischen 2 und 3 und werden unter Zugabe von Natronlauge neutralisiert. Begonnen wird mit der ersten Zinkreihe, es wird jeweils die gleiche Menge, zwei Spatelspitzen, des Kaliumhexacyanoferrats hinzugegeben. Nach einer kurzen Trübung ist die Lösung allerdings wieder klar, es bildet sich kein weißer Niederschlag.

Anschließend wird die Kupferreihe getestet. Auch hier zeigt sich bei den ersten beiden versuchten Lösungen nicht der zu erwartende rot-bräunliche Niederschlag, dafür allerdings eine bleibende Trübung. Versuchsweise wird weiter Natronlauge hinzugegeben, bei einem gemessenen pH-Wert von 8 bildet sich ein rot-brauner

Niederschlag (Vgl. Abb. 55). Die restlichen Extrakte werden auch auf einen pH-Wert von 8 gebracht und mit Kaliumhexacyanoferrat versetzt.

Bei allen Lösungen bildet sich ein unterschiedlich starker rot-brauner Niederschlag, aufgrund der unterschiedlichen Farbtöne und Trübungen der Extrakte, ist es schwierig, die Stärke der einzelnen Niederschläge exakt miteinander zu vergleichen. Grundsätzlich lässt sich aber sagen, dass bei der niedrigsten der schwächste und bei der höchsten der stärkste Niederschlag zu sehen ist (Vgl. Abb. 55-57).



Abbildung 57: Niederschlag beim Extrakt der mit 0,02 mol Kupfer behandelten Pflanzen (rechts)

Der Nachweis bei der zweiten Zinkreihe wird auch bei einem pH von 8 durchgeführt. Diesmal ist ein Niederschlag in Form einer helleren Trübung zu sehen, auch hier ist bei der niedrigsten die schwächste und bei der höchsten die stärkste Trübung sichtbar (Vgl. Abb. 58-61). Auch die Kontrolllösung wird mit Kaliumhexacyanoferrat versetzt, nach einer kurzen Trübung beim Vermischen wird die Lösung wieder klar (Vgl. Abb. 62).



Abbildung 61: Niederschlag beim Extrakt der mit 0,02 mol Zink behandelten Pflanzen (rechts)

4.3.4.5. Analyse der Ergebnisse

Es konnte nachgewiesen werden, dass alle mit Schwermetallionen behandelten Pflanzen auch Schwermetallionen aufgenommen haben. Bei der Messung an *Brassica carinata* kann man sehen, dass die Pflanzen, die eine größere Menge Metall im Boden zur Verfügung hatten auch mehr aufgenommen haben.

Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem Wachstum, so kann man sehen, dass die Pflanzen grundsätzlich bei einer höheren Metallaufnahme besser gewachsen sind, bei einer zu hohen Metallaufnahme das Wachstum allerdings massiv eingeschränkt wurde und die Pflanzen teilweise sogar eingegangen sind.

Auch passt das mit den Beobachtungen des Fraßes zusammen, je mehr Metall im Boden war, je mehr Metall die Pflanze also aufgenommen hat, desto weniger wird sie gefressen. Lediglich die Pflanzen mit den niedrigeren Zinkkonzentrationen bilden eine Ausnahme, sie wurden sogar stärker gefressen als die unbehandelten Pflanzen.

4.3.5. Messung der Expression ausgewählter Gene mittels RNA-Extraktion und Realtime-PCR

4.3.5.1. Beobachtungen während dem Pflanzenwachstum

Da die Pflanzen aus dem ersten Teil des Versuches bereits zu alt für die Messung der Genexpression waren, wurden sie komplett geerntet und getrocknet und für die Messung der Metallkonzentration verwendet. Für die Genexpressionsmessung werden Ende August erneut Pflanzen ausgesät. Ungefähr drei Wochen nach dem Aussähen gehen die noch sehr kleinen Pflanzen nach einem Wetterumschwung ein. Die Pflanzen werden erneut ausgesät. Es keimen weniger der Pflanzen als bei den vorangegangenen Aussaaten, weshalb entschieden wird, jeweils drei Pflanzen mit einer Metalllösung zu behandeln. Die gelöste Menge an Kupfer bzw. Zink pro Lösung sind 0,005 mol, was der zweitniedrigsten Menge aus dem ersten Teil des Versuches entspricht. Allerdings wird sie dieses Mal auf zwei Pflanzen weniger aufgeteilt.

Die Pflanzen werden mit einer Wuchshöhe von ungefähr 5 bis 10 cm am 30. September in Pflanzkästen der gleichen Größe wie im ersten Teil des Versuches umgesetzt und die entsprechenden Pflanzengruppen mit den Metalllösungen gegossen.

Von Anfang an sind auffällig viele Raupen auf den Pflanzen zu finden (Vgl. Abb. 63-65). Nachdem die meisten anderen Kohlpflanzen im Garten auf Grund der Kälte bereits eingegangen sind, ist es verständlich, dass mehr Raupen auf den Senfpflanzen zu finden sind als beim ersten Teil des Versuchs, als zusätzlich im Garten auch Kohlrabi, Brokkoli (beides Variationen von *Brassica oleracea*) und Kapuzinerkresse wuchsen, die auch als Futterpflanzen von den Raupen genutzt wurden.

Um genug lebendiges Pflanzenmaterial für die Messung zu erhalten, werden täglich Eiablagen und Raupen von den Pflanzen gesammelt, damit diese nicht die Pflanzen fressen können.

Auffällig ist, dass ungefähr eine Woche nach Umsetzen der Pflanzen und Behandlung mit den gelösten Cu^{2+} und Zn^{2+} Ionen noch auf allen Pflanzen Eier, allerdings nur noch auf den unbehandelten Pflanzen auch Raupen zu finden sind. Das belegt die Folgerungen aus den vorhergehenden Beobachtungen zum Fraß, dass die Aufnahme von Schwermetallionen Raupen vom Fraß der Pflanze abhält und somit einen Schutz vor Fressfeinden darstellt.

Auch fällt auf, dass hauptsächlich grüne und nur zweimal braune Raupen zu finden sind. Das Wachstum ist schwer zu beurteilen, da von den unbehandelten Pflanzen, trotz des Absammeln der Raupen, Vieles weggefressen ist. Allerdings ist gut zu sehen, dass die

mit Zink und Kupfer behandelten Pflanzen von *Brassica nigra* und *Brassica carinata* am kräftigsten sind, auch die mit Zink behandelten Pflanzen sind kräftiger als die unbehandelten Pflanzen (Vgl. Abb. 66). Zwei der mit Kupfer behandelten Pflanzen der Art *Brassica juncea* beginnen eine halbe Woche nach Gabe der Metallionen, einzugehen, die dritte wird sehr schwach und wächst nicht weiter (Vgl. Abb. 67).

Drei Wochen nach der Ionengabe wird die Messung der Genexpression durchgeführt.

4.3.5.2. Extraktion der RNA und Messungen

Die Extraktion der RNA und die Umwandlung dieser in cDNA wird entsprechend der Versuchsvorgabe durchgeführt (Vgl. Abb. 68-75). Anschließend werden die entsprechenden Primer für die ausgewählten Gene mit dem Mega-Mix für die Realtime-PCR gemischt und in eine Reaktionsplatte für den Light Cycler gegeben. Die RNA-Extrakte werden hinzugefügt und die Messung mit dem Light Cycler durchgeführt (Vgl. Abb. 76-79).

Gemessen werden die Haushaltsgene GAP und T41 und die Gene COPT, APX, MPT1, RAN1 und PAA.

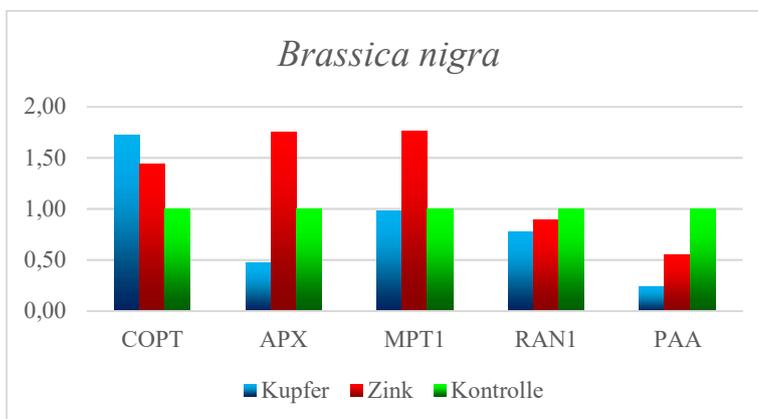
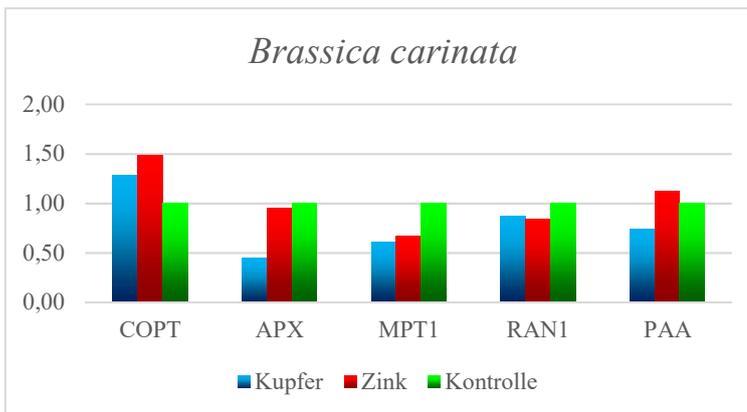
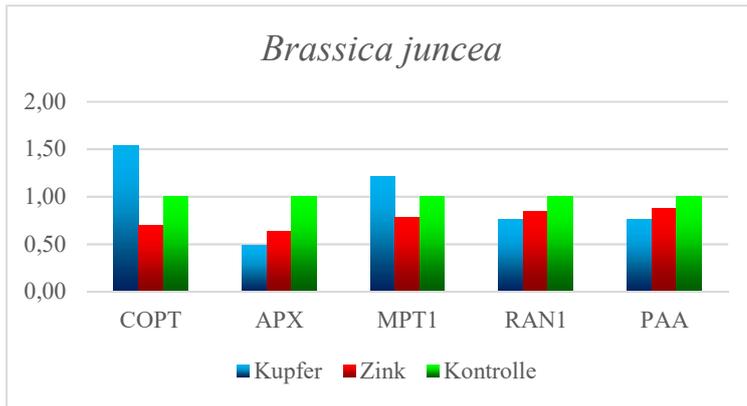
Das Kontrollgen GAP wird als Vergleichswert verwendet, da sich hier die gemessenen Werte deutlich vom Hintergrund abheben im Vergleich zu T41.

Zunächst wird die Differenz aus den gemessenen Werten für die relevanten Gene und den Werten für das Kontrollgen bestimmt und die Werte so umgerechnet, dass ein um eins höherer Wert einer Verdopplung des Wertes entspricht, da einberechnet werden muss, dass sich die Menge der DNA pro Zyklus verdoppelt.

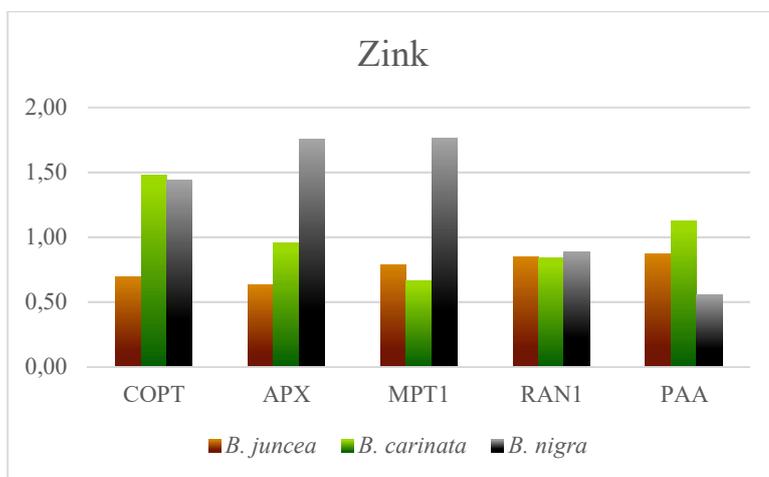
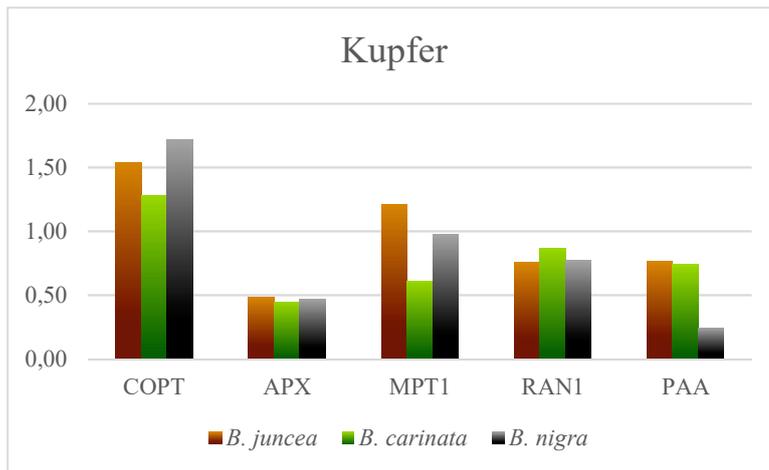
Es wird also $2^{(\text{Wert des Kontrollgens} - \text{Wert des betrachteten Gens})}$ gerechnet.

Bei diesen Werten wird dann jeweils der Wert der Kontrollprobe gleich 1 gesetzt und die Werte der behandelten Pflanzen durch den Wert der Kontrollprobe geteilt, um eine Relation zwischen den Werten der behandelten und der unbehandelten Pflanzen zu erhalten.

Der Übersicht halber werden im Folgenden die daraus resultierenden Ergebnisse in Diagrammen dargestellt, zugehörige Tabellen befinden sich im Anhang (Vgl. Abb. 80-81). Zunächst werden die unterschiedlichen Genexpressionen zwischen den unterschiedlichen Behandlungen innerhalb einer Art verglichen.



Außerdem werden noch die verschiedenen Werte der einzelnen Arten innerhalb der Behandlung mit Cu^{2+} bzw. Zn^{2+} Ionen verglichen. Auch hier entspricht der Wert 1 dem der Kontrollprobe.



4.3.5.3. Analyse der Ergebnisse

Insgesamt muss gesagt werden, dass die Werte lediglich einen Vergleich darstellen und nicht exakte Angaben über die Häufigkeit der Expression eines Gens innerhalb einer bestimmten Pflanze darstellen, da sie nur in Relation zu bestimmten Größen gesehen werden können. Man kann also lediglich sehen, ob bestimmte Gene prozentual häufiger oder weniger häufiger in den behandelten Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle exprimiert wurden, man erhält keine absoluten Werte. Zudem kann es Ungenauigkeiten in der Messung durch unterschiedliches Alter der Blätter und aus welchen Bereichen der Blätter die, für die Messung entnommenen, Teilproben stammen, geben.

Aus den gemessenen Werten lässt sich schließen, dass das Gen COPT auf alle Fälle an der Aufnahme von Schwermetallionen beteiligt ist. Abgesehen von den mit Kupfer behandelten Pflanzen von *Brassica juncea* wurde dieses Gen bei allen gemessenen behandelten Pflanzen stärker exprimiert als bei den unbehandelten Pflanzen.

APX wurde bei allen mit Kupfer behandelten Pflanzen deutlich schwächer exprimiert als bei der Kontrolle. Auch bei der Behandlung mit Zink wurde dieses Gen, von *Brassica nigra* abgesehen, schwächer exprimiert als ohne Metallzugabe.

Bei MPT1 sind die Ergebnisse sehr unterschiedlich. Bei *Brassica carinata* wurde es in beiden Fällen schwächer exprimiert, bei *Brassica juncea* unter Einwirkung von Kupfer stärker, unter Einwirkung von Zink hingegen schwächer als bei der Kontrolle. Bei *Brassica nigra* ist das Ergebnis genau umgekehrt; hier wurde MPT1 unter Einwirkung von Kupfer ein wenig schwächer, dafür unter der Einwirkung von Zink deutlich stärker exprimiert.

RAN1 wurde von allen drei Pflanzenarten unter der Einwirkung von Schwermetallen schwächer exprimiert.

Von den mit Zink behandelten Pflanzen, von *Brassica carinata* abgesehen, wurde PAA bei allen behandelten Pflanzen seltener exprimiert als bei der jeweiligen Kontrolle.

5. Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass alle drei Arten höchstwahrscheinlich in der Lage sind, sowohl Zink als auch Kupfer aufzunehmen, da bei allen Arten eine Reaktion sichtbar war. Bei *Brassica carinata* konnte bewiesen werden, dass die Pflanzen Metallionen aufgenommen haben. Oft sind die Biomasseproduktion und das Wachstum sogar größer als bei der unbehandelten Kontrolle. Es zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede unter den Arten, was die Toleranz und die Biomasseproduktion betreffen. *Brassica juncea* hat in beiden Versuchsansätzen eine schwächere Kupfertoleranz gezeigt als die beiden anderen Arten. Auch hatte *Brassica juncea* die geringste Biomasse produziert. Möglicherweise ist dies ein Grund, warum er bei den gleichen Metallmengen in einem zu den anderen beiden Arten vergleichsweise schlechten Zustand war. Bei einer höheren Biomasseproduktion sinkt bei gleicher Metallionenmenge logischerweise die Konzentration des Metalls in der Pflanze. Dies ist aber nur der Fall, wenn tatsächlich alle Pflanzen trotz unterschiedlicher Größe gleich viel Metall aufnehmen. Hinzu kommt, dass bei *Brassica carinata* bei höheren Kupferkonzentrationen auch ein größeres Wachstum zu sehen war. Somit hängt die Biomasseproduktion nicht allein davon ab, ob die Art von vornherein größer wird, sondern auch davon, wie metalltolerant die Art ist und ob sie einen Nutzen aus den Metallen ziehen kann. Es ist also schwierig zu sagen, ob die geringere Toleranz tatsächlich mit der kleineren Größe, einer geringeren Aufnahmefähigkeit oder aber auch einer höheren Aufnahmefähigkeit

aber damit verbundener zu hoher Konzentration des Kupfers in den Zellen zusammenhängt. Es ist wahrscheinlich, dass nicht nur einer, sondern das Zusammenspiel verschiedener Faktoren die Metalltoleranz der Pflanzen ausmacht.

Obwohl *Brassica juncea* eine niedrige Metalltoleranz im Vergleich zu den anderen Arten gezeigt hat, war dennoch deutlich zu sehen, dass er unter gewissen Metalleinflüssen eine größere Biomasseproduktion gezeigt hat als die Kontrolle. In einem ähnlichen Vergleichsversuch³⁸ fielen die Ergebnisse deutlich anders aus. Dort wurde das Trockengewicht jeweils von Spross und Wurzeln dreier *Brassica*-Arten, in dem Fall *Brassica juncea*, *Brassica rapa* und *Brassica napus*, unter dem Einfluss von Zn^{2+} -Ionen, Cu^{2+} -Ionen und Zn^{2+} - und Cu^{2+} -Ionen miteinander verglichen. Bei allen drei Arten war das Trockengewicht der mit Metall behandelten Pflanzen sowohl was Wurzeln als auch was Spross anging, deutlich geringer als das der Kontrollpflanzen. Allerdings wurde bei dem Vergleich nur eine Konzentration getestet, möglicherweise war diese bereits sehr hoch gewählt, so dass das Pflanzenwachstum dadurch eingeschränkt wurde. Um diesen Versuch mit dem Durchgeführten vergleichen zu können, finden sich die nach Wurzeln und Blättern bzw. nach Wurzeln und Spross aufgeteilten Diagramme im Anhang (Vgl. Abb. 82-83).

Aus den Versuchsergebnissen heraus lassen sich auch Schlussfolgerungen ziehen, aus welchen Gründen die Pflanzen die Metallionen aufnehmen. Die Beobachtungen des Fraßes an den Pflanzen legen die Vermutung nahe, dass die Pflanzen dies als Schutz vor Fressfeinden tun. Dieses Ergebnis bestätigt eine weitverbreitete These der Forscher, dass Hyperakkumulatoren die Metalle als Fraßschutz einlagern.

Da nur bei einer Art gemessen werden konnte, ob und wie stark Metallionen aufgenommen wurden, ist der Vergleich unter den verschiedenen Arten bezüglich ihrer Aufnahmefähigkeit nicht möglich. Es konnte gezeigt werden, dass *Brassica carinata* Schwermetallionen aufgenommen hat, allerdings war eine quantitative Bestimmung der aufgenommenen Zinkionen nicht möglich, die meisten aufgenommenen Kupferkonzentrationen waren zu niedrig, um sie zu messen.

Die Messung der Genexpression hat gezeigt, dass die Expression einiger der Gene in den untersuchten *Brassica*-Arten ähnlich durch die Einwirkung von Kupfer und Zink beeinflusst wird wie aus Forschungen an Arten der Gattung *Arabidopsis* bekannt.

COPT, das Gen, welches für den Transport der Kupferionen ins Zellinnere zuständig ist, wurde auch bei den beobachteten *Brassica*-Arten vermehrt exprimiert. Die

³⁸ Vgl. S.D. Ebbs und L.V. Kochian

Ergebnisse legen nahe, dass dieses Protein nicht nur für die Einschleusung von Kupfer-, sondern auch für die von Zinkionen zuständig ist.

Da APX von einer Ausnahme abgesehen unter Metalleinfluss deutlich schwächer exprimiert wurde, ist es wahrscheinlich, dass dieses Gen, welches häufig als Reaktion auf Stressfaktoren vermehrt exprimiert wird, diese Reaktion bei Stress durch Schwermetalle nicht zeigt. Allerdings bleibt ungeklärt, warum es unter Schwermetall-Stress sogar schwächer exprimiert wird als unter „normalen“ Bedingungen. Es lässt sich zudem darauf schließen, dass auf die getestete Pflanze von mit Zink behandelte *Brassica nigra* aus einem nicht feststellbaren Grund einer oder mehrere Stressfaktoren eingewirkt haben oder diese Art einen anderen Stoffwechsel hat als die anderen beiden Arten.

Aus den Ergebnissen der Messungen von MPT1 können sich keine eindeutigen Schlüsse ziehen, da die Ergebnisse sehr unterschiedlich ausfielen. Da aber sowohl bei Zink als auch bei Kupfer vereinzelt erhöhte Werte gemessen wurden, ist es gut möglich, dass das Gen nicht nur für den Transport von Zink sondern auch für den von Kupfer in das Innere der Vakuolen zuständig ist.

Dass RAN1 in allen Fällen schwächer exprimiert wurde als bei der Kontrolle, würde dagegen sprechen, dass dieses Gen auch in Arten der Gattung *Brassica* zum Transport der Metallionen in den Golgi-Apparat genutzt wird oder aber auch, dass die Pflanzen aus einem nicht bekannten Grund die Ionen nicht in den Golgi-Apparat transportieren. Das Gen PAA wurde, von einer Ausnahme abgesehen, bei allen mit Metall behandelten Pflanzen seltener exprimiert als bei der Kontrolle. Dies stimmt mit der Expression in *Arabidopsis*-Arten überein. Es ist somit wahrscheinlich, dass die Pflanze das Gen, das für den Kupfer-Transport zu den Chloroplasten zuständig ist, bei einer zu hohen Konzentration hemmt, um eine toxisch hohe Konzentration in den wichtigen Zellen mit vielen Chloroplasten zu verhindern.

6. Fehlerdiskussion

Da die Pflanzen nicht unter genau kontrollierbaren Laborbedingungen, sondern im Freien unter verschiedenen Wettereinflüssen aufgezogen wurden, dürfen eventuelle Störfaktoren nicht außer Acht gelassen werden.

Der Hagelschauer, der einen Teil der Pflanzen beschädigt hatte, hat in das Pflanzenwachstum mit hineingespielt. Zudem ist es durch den unterschiedlich starken

Fraß durch die Raupen schwierig, die gewogenen Trockenmassen der Blätter miteinander zu vergleichen.

Auch wenn versucht wurde, für die Messung der Genexpression möglichst gleichaltrige Blätter zu verwenden und durch das Errechnen des Mittelwertes der Ergebnisse zweier Blätter pro getesteter Pflanzgruppe versucht wurde, eventuelle Schwankungen auszugleichen, ist es dennoch möglich, dass die Blätter unterschiedlich alt waren, was das Messergebnis verfälscht haben könnte.

7. Zusammenfassung

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Arten in der Lage sind, Kupfer und Zink zu akkumulieren. Ob sie tatsächlich in der industriellen Phytosanierung geeignet wären, bleibt offen, da es aktuellen Forschungsergebnissen zufolge Pflanzenarten gibt, die in der Lage sind, deutlich größere Mengen an Metallionen aufzunehmen und zu speichern.

Das Ziel der Arbeit, einen Überblick über den Einsatz von Hyperakkumulatoren zu verschaffen und drei Arten der Gattung *Brassica* in ihren Eigenschaften als Hyperakkumulatoren zu vergleichen, wurde erreicht. Hinzu kommt, dass durch die Durchführung der Experimente unter natürlichen Bedingungen auch Ergebnisse bezüglich des Fraßschutzes der Pflanzen durch Metallaufnahme gesammelt und ausgewertet werden konnten.

Ich hoffe sehr, dass diese interessanten und komplexen Pflanzen auch in Zukunft mit großem Interesse der Wissenschaft weiter erforscht werden. Hyperakkumulatoren können in Zukunft eine große Rolle im nachhaltigen und umweltfreundlichen Umgang mit Rohstoffen spielen. Sie bilden eine Möglichkeit, mit Metall belastete Böden zu reinigen und auf Dauer wieder nutzbar zu machen. Hinzu kommt, dass sie, wie in verschiedenen Quellen beschrieben, als Mittel gegen Armut eingesetzt werden können, da sie in bisher nicht für herkömmliche Metallgewinnungsverfahren geeigneten Gebieten eingesetzt werden können. Einheimische Bauern in verschiedenen Ländern könnten in Zukunft Hyperakkumulatoren auf metallhaltigem Gelände angebaut und nach der Aufnahme des Metalls geerntet und getrocknet und schließlich exportiert werden. Auf Grund der aktuellen Rohstoffpreise wäre das Verfahren bereits ab geringen Metallkonzentrationen im Boden rentabel. Die Menschen könnten sich mit dem Abbau von Metallen ihren Lebensunterhalt sichern. Des Weiteren können mit der durch die

Verbrennung der Pflanzen zur Metallextraktion freigesetzten Energie Maschinen betrieben werden, die der Weiterverarbeitung der Extrakte dienen.

Hyperakkumulatoren könnten in Zukunft für einen bewussteren und nachhaltigeren Umgang mit Mensch und Umwelt in der Rohstoffindustrie sorgen.

Aus diesen Gründen ist es wichtig, diese Pflanzen zu erforschen und Entwürfe für entsprechende Projekte zu entwerfen und diese schließlich umzusetzen.

8. Anhang

8.1. Abbildungen

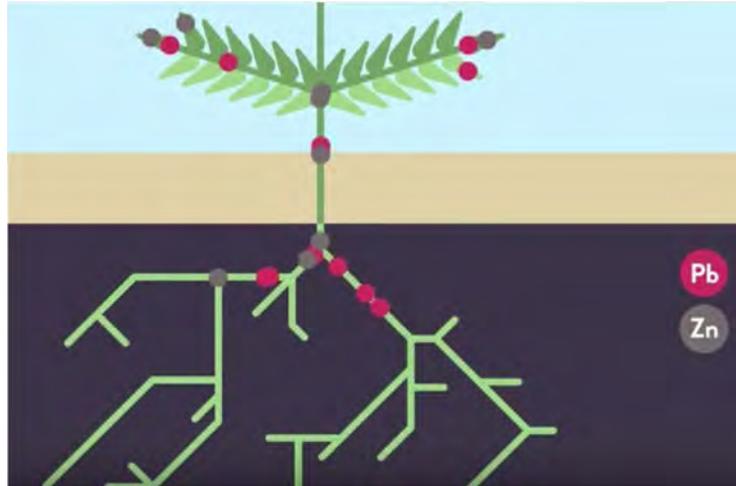


Abbildung 1: Schema zur Metallaufnahme eines Hyperakkumulators

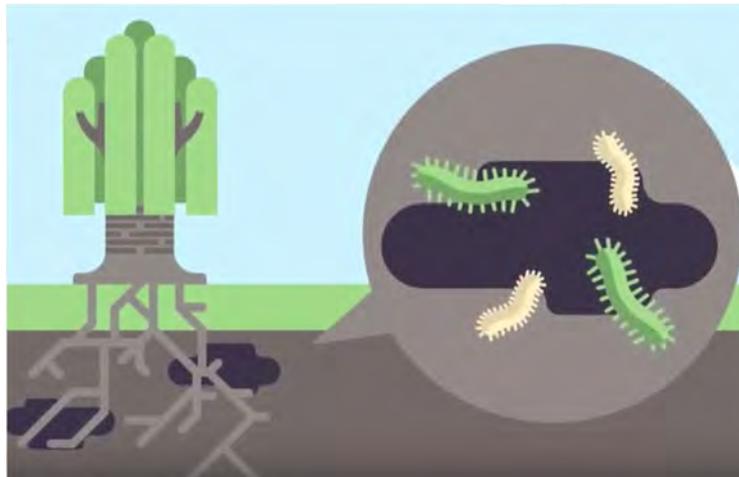


Abbildung 2: Schema zur Phytodegradation

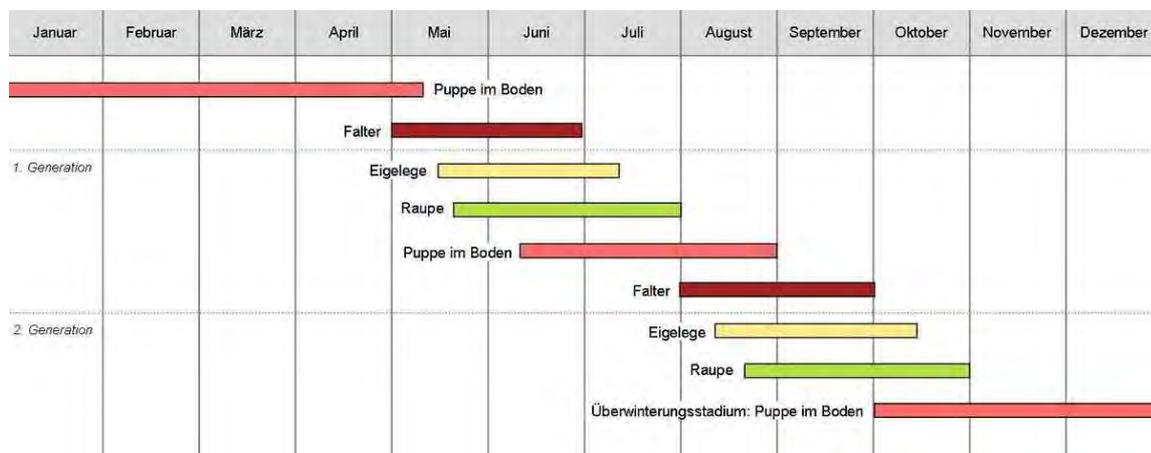


Abbildung 9: Jährliche Generationen der Kohleule

Kupfer

WINLAB®- Reagenz

Windaus Bestell-Nr.: 8003 20203

Messbereich	0,1-12,0 mg/l Cu ²⁺
Wellenlänge der Messung	560 nm
Absorptionsmax. der Reaktion	595 nm

Durchführung:

- 1.) Etwa 5 ml Wasserprobe in eine Küvette geben. Dies ist die Blindprobe.
- 2.) 5 ml Wasserprobe in eine weitere Küvette geben.
- 3.) Das Probenwasser ist ggf. zunächst mit verd. Salzsäure bzw. Natronlauge auf einen pH – Wert von 6–8 einzustellen.
- 4.) 10 Tropfen Reagenz 1 in die andere Küvette geben, verschließen und mischen.
- 5.) Küvette öffnen, 10 Tropfen Reagenz 2 in die Küvette geben, verschließen und mischen.
- 6.) Küvette erneut öffnen, 10 Tropfen Reagenz 2 in die Küvette geben, verschließen, mischen und 10 Minute stehen lassen.
- 7.) WinLab Data Line Photometer mit beliebiger Taste anschalten.
- 8.) Mittels Pfeiltasten „Kupfer WinLab“ anwählen. Anzeige „BLINDPROBE“ erscheint.
- 9.) Die Blindprobe mit der unter Punkt 1 vorbereiteten Küvette mit der Taste „0,0“ durchführen.
- 10.) Die Blindprobe nach dem Nullabgleich aus dem Küvettenschacht nehmen.
- 11.) Die Küvette mit der Probe in den Küvettenschacht stellen, den Deckel schließen und die Taste mg/l drücken.
- 12.) Im Display erscheint das Messergebnis (Konzentration Ihrer Probe) in mg/l Cu²⁺.

Abbildung 10: Bedienungsanleitung WINLAB Data Line Photometer – Kupfernachweis



Abbildung 11: Weißer Niederschlag von Zink in gelbem Blutlaugensalz (rechts)



Abbildung 12: Rot-brauner Niederschlag von Kupfer in gelbem Blutlaugensalz (ganz rechts)

1 Components

1.1 Kit contents

NucleoSpin® RNA Plant			
REF	20 preps 740949.20	50 preps 740949.50	250 preps 740949.250
Lysis Buffer RA1	10 mL	25 mL	125 mL
Lysis Buffer RAP	10 mL	25 mL	125 mL
Wash Buffer RA2	15 mL	15 mL	80 mL
Wash Buffer RA3 (Concentrate)*	5 mL	12.5 mL	3 x 25 mL
Membrane Desalting Buffer MDB	10 mL	25 mL	125 mL
Reaction Buffer for rDNase	3 mL	7 mL	30 mL
rDNase, RNase-free (lyophilized)*	1 vial (size C)	1 vial (size D)	5 vials (size D)
RNase-free H ₂ O	5 mL	15 mL	65 mL
NucleoSpin® Filters (violet rings)	20	50	250
NucleoSpin® RNA Plant Columns (light blue rings – plus Collection Tubes)	20	50	250
Collection Tubes (2 mL)	60	150	750
Collection Tubes (1.5 mL)	20	50	250
User manual	1	1	1

Abbildung 13

1.2 Reagents, consumables, and equipment to be supplied by user

Reagents

- 96–100 % ethanol (for preparation of Buffer PFW2)
- Neutralization Buffer PFN for processing acidic samples (see section 6.3 for ordering information)

Consumables

- Disposable pipette tips
- NucleoSpin® Bead Tubes Type G (optional, see section 6.3 for ordering information)

Equipment

- Manual pipettes
- Centrifuge for microcentrifuge tubes
- Equipment for sample disruption and homogenization (see section 2.4)
- Personal protection equipment (lab coat, gloves, goggles)

1.3 About this user manual

It is strongly recommended for first time users to read the detailed protocol sections of the **NucleoSpin® RNA Plant and Fungi** kit before using this product. Experienced users, however, may refer to the Protocol-at-a-glance instead. The Protocol-at-a-glance is designed to be used only as a supplemental tool for quick referencing while performing the purification procedure.

All technical literature is available online at www.mn-net.com.

Please contact Technical Service regarding information about any changes to the current user manual compared with previous revisions.

Abbildung 14

5 Protocols

Please refer to Table 2 for choosing the optimal protocol, sample amount and buffer volumes.

Table 2: Recommendations for different sample types

	Sample amount per preparation	Buffer PFR	Buffer PFB	Recommended protocol
Samples rich in secondary metabolites				
Grape vine leaf	100 mg	50 µL	500 µL	5.1
Noble fir	50 mg	20 µL	500 µL	5.1
Spruce needle	50 mg	20 µL	500 µL	5.1
Ginger rhizome	500 mg	50 µL	500 µL	5.1
Fruit tissue				
Kiwi	500 mg	20 µL	750 µL	5.2
Citrus fruit	500 mg	20 µL	750 µL	5.2
Apple	500 mg	10 µL	750 µL	5.2
Grape berry	500 mg	50 µL	750 µL	5.1
Blueberry	500 mg	20 µL	500 µL	5.2
Tomato	500 mg	20 µL	750 µL	5.1
Leaves				
Tobacco	100 mg	50 µL	500 µL	5.1
Wheat	100 mg	20 µL	500 µL	5.1
Maize	100 mg	20 µL	500 µL	5.1
<i>Arabidopsis</i>	100 mg	20 µL	500 µL	5.1
Samples with high starch content				
Maize kernel	100 mg	50 µL	500 µL	5.1
Wheat kernel	90 mg	20 µL	500 µL	5.1
Potato tuber	50 mg	50 µL	500 µL	5.1

Option B: Bead Tubes (not provided)

Add **500 µL Buffer PFL** into NucleoSpin® Bead Tubes Type G.



500 µL PFL
10–50 µL PFR

Add **10–50 µL Buffer PFR** to the tube. See table 2 for optimal volume of Buffer PFR.

Transfer sample

Transfer sample to the NucleoSpin® Bead Tube Type G. For optimal sample input, follow the recommendations given in table 2.

Place the Bead Tube into a swing-mill and **agitate twice** for **30 s** at 30 Hz with intermediate position change (please refer to the manufacturers' instructions for proper use of the instrument).



Agitate
2 x 30 s

Incubate NucleoSpin® Bead Tube Type G for **5 min** at **56 °C**.

56 °C, 5 min

Note: Do not perform this heat incubation for samples with high starch content, e.g., potato tubers or wheat kernel.

Remove steel balls from the Bead Tube.



Attention: Removal of steel balls is necessary in order to avoid tube damage during subsequent centrifugation.

Centrifuge for **1 min** at **14,000 x g** in order to sediment cell debris.



14,000 x g,
1 min

Note: If the cell debris pellet is not sufficiently solid, centrifuge for a longer time (e.g. 3 min) and/or at 20,000 x g.

Continue with the clear supernatant.

Abbildung 16

2 Filtrate Lysate

Insert a **NucleoSpin® RNA Plant and Fungi Filter Column** (green ring) into a Collection Tube (2 mL, provided).

Note: Alternatively use a 2 mL microcentrifuge tube with lid (not provided). This facilitates mixing by vortexing in step 3.

Load the clear **lysate** from step 1 onto the column.

Centrifuge for **1 min** at **14,000 x g**.

Note: In some cases a small pellet will form. This pellet does not have to be removed and can be processed together with the supernatant.

Note: If the sample does not pass the column completely, centrifuge at 20,000 x g for additional 3 min.



Load lysate



**14,000 x g,
30 s**

3 Adjust RNA binding conditions

Add **500 µL Buffer PFB** to the flow-through and mix by pipetting.

Note: Please refer to Table 2 for recommendations on Buffer PFB increase for certain sample types.

Incubate for **5 min** at **room temperature**.



500 µL PFB

RT, 5 min

4 Bind RNA

For each preparation take one **NucleoSpin® RNA Plant and Fungi Column** (light blue ring) preassembled with a Collection Tube.

Load 650 µL of the sample onto the NucleoSpin® RNA Plant and Fungi column.

Centrifuge for **30 s** at **14,000 x g**.

Discard the flow-through and reuse the collection tube.

Load the residual sample volume (approx. 200 µL) onto the column.

Centrifuge for **30 s** at **14,000 x g**.

Discard collection tube with flow-through and insert the column into a fresh Collection Tube (2 mL, provided).



**Load 650 µL
sample**



**14,000 x g,
30 s**



**Load residual
sample**



**14,000 x g,
30 s**

Abbildung 17

5 Wash and dry silica membrane

1st wash

Add **500 µL Buffer PFW1** onto the column.

Centrifuge for **1 min** at **14,000 x g**.

Discard collection tube with flow-through and insert column into a fresh Collection Tube (2 mL, provided).



500 µL PFW1



14,000 x g,
1 min

2nd wash

Add **500 µL Buffer PFW2** onto the column.

Centrifuge for **1 min** at **14,000 x g**.

Discard flow-through and reuse collection tube.



500 µL PFW2



14,000 x g,
1 min

3rd wash

Add **500 µL Buffer PFW2** onto the column.

Centrifuge for **1 min** at **14,000 x g**.

Discard flow-through and discard collection tube unless the following additional wash step is included.



500 µL PFW2



14,000 x g,
1 min

Optional: For some samples an additional wash step is recommended. These samples cause a discoloring of the silica or the eluate after the 3rd washing step. Such samples are e.g., conifer needles, blueberry fruits, and grape leaves.

Add 500 µL Wash Buffer PFW2 onto the column.

Centrifuge for **1 min** at **14,000 x g**.

Discard collection tube with flow-through.

6 Elute RNA

Insert column into a fresh Collection Tube (1.5 mL, provided).

Add **50 µL RNase-free H₂O** onto the column.

Incubate for approximately **1 min** at **room temperature**.

Centrifuge for **1 min** at **14,000 x g**.

If higher RNA concentrations are desired, elution can be done with 40 µL. Overall yield, however, will decrease when using smaller volumes.



50 µL RNase-free H₂O
RT, 1 min



14,000 x g,
1 min

For further alternative elution procedures see section 2.5.

Abbildung 18

Abbildung 13-18: User Manual NucleoSpin® RNA Plant and Fungi

GoScript™ Reverse Transcription System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A5000 AND A5001.

**Quick
PROTOCOL**

First-Strand cDNA Synthesis

The following procedure can be used to convert up to 5µg of total RNA or up to 500ng of poly(A) RNA into first-strand cDNA.

- Mix and briefly centrifuge each component before use. Combine the following:

Component	Volume
Experimental RNA (up to 5µg/reaction)	Xµl
Primer [Oligo(dT) ₁₅ (0.5µg/reaction) and/or Random Primer (0.5µg/reaction) or gene-specific primer (10–20pmol/reaction)]	Xµl
Nuclease-Free Water	Xµl
Final volume	5µl

- Heat in a 70°C heat block for 5 minutes. Immediately chill in ice water for at least 5 minutes. Centrifuge 10 seconds in a microcentrifuge. Store on ice until reverse transcription mix is added.
- Prepare the reverse transcription reaction mix, 15µl for each cDNA reaction. Combine on ice, in the order listed.

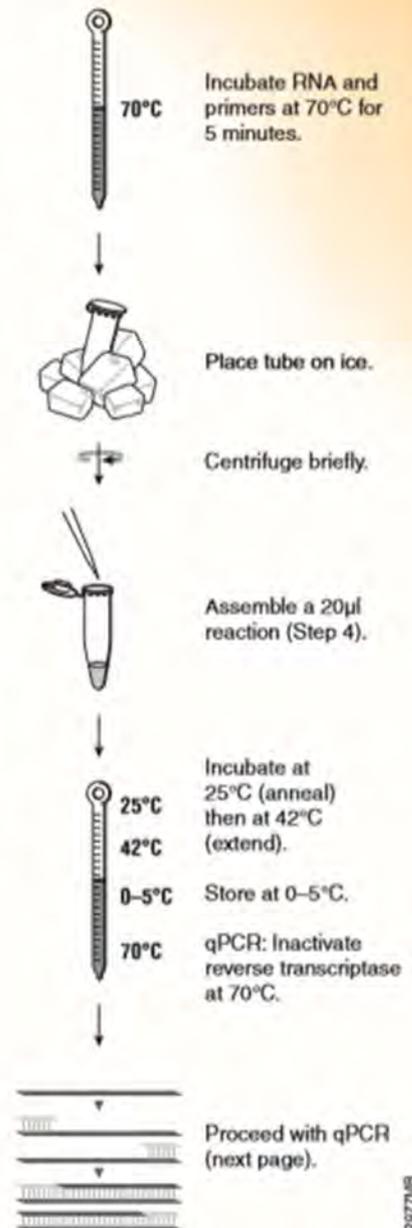
Component	Volume
GoScript™ 5X Reaction Buffer	4.0µl
MgCl ₂ (final concentration 1.5–5.0mM) ¹	1.2–6.4µl
PCR Nucleotide Mix (final concentration 0.5mM each dNTP) ²	1.0µl
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (optional)	20units
GoScript™ Reverse Transcriptase	1.0µl
Nuclease-Free Water (to a final volume of 15µl)	Xµl
Final volume	15µl

¹Mg²⁺ concentration should be optimized to 1.5–5.0mM (MgCl₂ provided at 25mM).

²If isotopic or nonisotopic incorporation is desired for monitoring first-strand cDNA synthesis, α[³²P]-dCTP or other modified nucleotides may be supplemented into the PCR Nucleotide Mix. See Section 4.D, TM316, for analysis suggestions.

- Combine 15µl of reverse transcription mix with 5µl of RNA and primer mix.
- Anneal in a heat block at 25°C for 5 minutes.
- Extend in a heat block at 42°C for up to one hour.
Reactions can be stopped at this point for analysis of the cDNA or may be frozen for long-term storage.
- Inactivate Reverse Transcriptase: Before proceeding with qPCR, inactivate the reverse transcriptase in a heat block at 70°C for 15 minutes.

(continued)



ORDERING/TECHNICAL INFORMATION:

www.promega.com • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601

©2010 Promega Corporation. All Rights Reserved.
Prices and specifications subject to change without prior notice.



Promega

Printed in USA 3/10
Part #9FB114

Abbildung 19: Vorschrift zur Umwandlung von RNA in cDNA

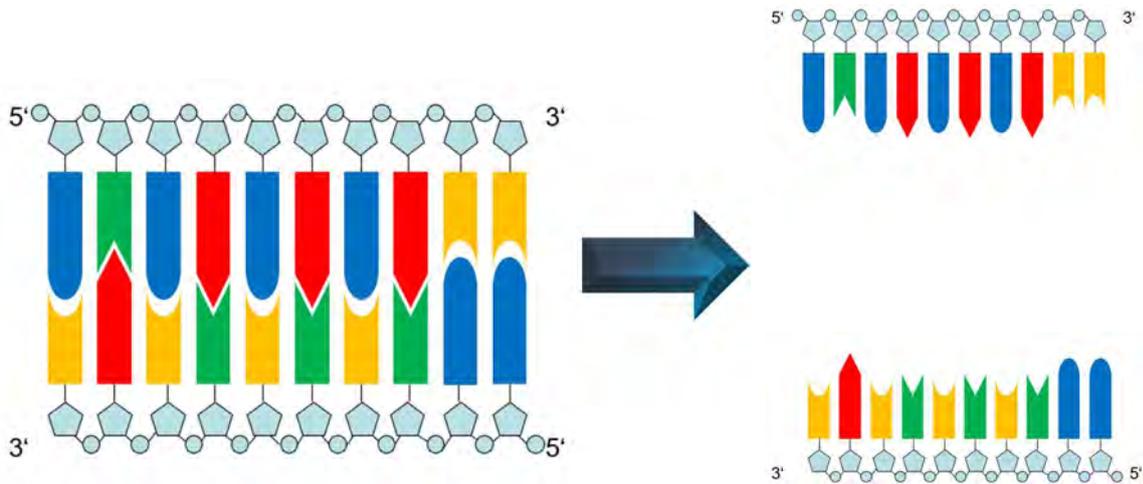


Abbildung 20: Denaturierung der DNA

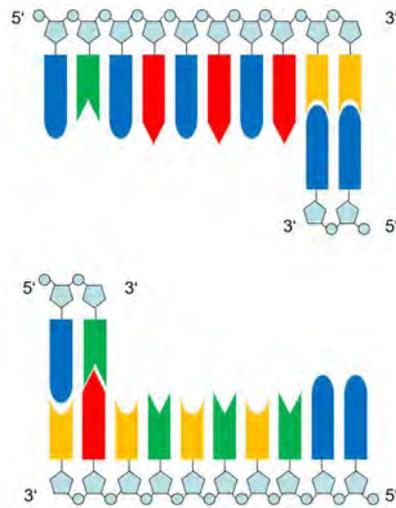


Abbildung 21: Primerbindung

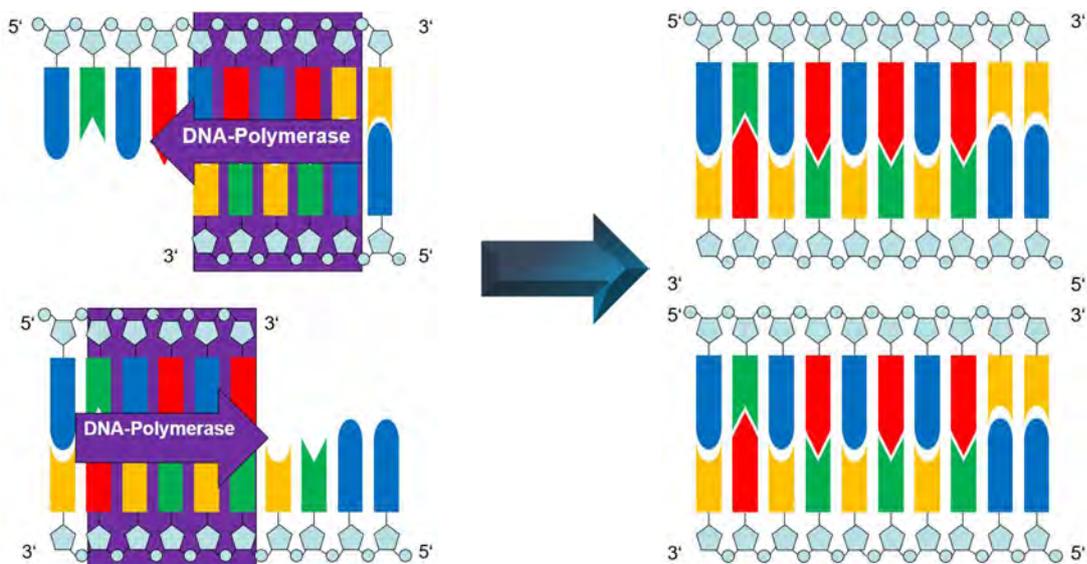


Abbildung 22: Synthese der DNA



Abbildung 23: Inhaltsstoffe der verwendeten Erde



Abbildung 24: WINLAB® Data Line Photometer



Abbildung 25: Homogenisator



Abbildung 26: Heizschüttler



Abbildung 27: Geschlossene Zentrifuge

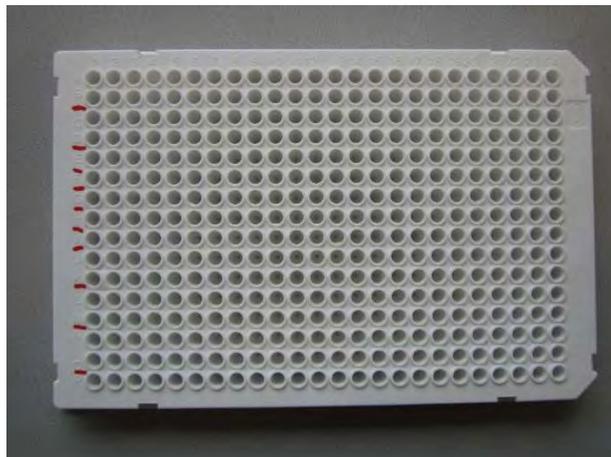


Abbildung 28: Multiwell Plate/Reaktionsplatte