

Institut für Bodenökologie  
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

# **Translokation von Fremdstoff-Metaboliten und ihr Einfluß auf die Rhizosphäre**

Frauke Diekmann

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

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. F. Elstner i. R.

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. P. Schröder

2. Univ.-Prof. Dr. B. Hock

Die Dissertation wurde am 13.01.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 14.03.2005 angenommen.



Meinen Eltern



## Veröffentlichungen

Diekmann F, Nepovim A, Schröder P (2004) Influence of *Serratia liquefaciens* and a xenobiotic glutathione conjugate on the detoxification enzymes in a hairy root culture of horse radish (*A Armoracia rusticana*). J Appl Bot 78 64-67

Nepovim A, Schröder P, Diekmann F (2004) Transient effect of *Serratia liquefaciens* on GST activity in horse radish hairy root culture under xenobiotic stress. Chem. In Vorbereitung.



## Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung .....	12
1	Entgiftung und Metabolismus von Herbiziden .....	13
2	Transportprozesse in pflanzlichen Geweben.....	15
3	Die Rhizosphäre und ihre Beeinflussung durch Wurzelexudate.....	17
4	Ziel .....	19
II	Material und Methoden .....	20
1	Pflanzenmaterial und biologische Kulturen .....	20
2	Synthese der Konjugate.....	22
2.1	Enzymatische Herstellung der Konjugate .....	22
2.2	Nicht-enzymatische Synthese der Xenobiotika-Konjugate.....	22
2.3	Aufreinigung der thiolischen Konjugate .....	25
2.4	Dünnschicht-Chromatographie (DC) .....	26
2.5	HPLC.....	26
2.6	Kapillar-Elektrophorese (CE) .....	27
3	Transport-Studien.....	29
4	Pflanzen.....	32
4.1	Einfluß von Thiol-Konjugaten und <i>Serratia liquefaciens</i> auf transformierte Meerrettichwurzeln ( <i>Armoracia rusticana</i> ).....	32
4.2	Entgiftungsenzyme in mykorrhizierten Pflanzen.....	33
4.2.1	Extraktion pflanzlicher Entgiftungsenzyme.....	33
4.2.2	Ammoniumsulfat-Fällung .....	33
4.3	Charakterisierung der Entgiftungsenzyme in Pflanzen und Pilzen.....	34
4.3.1	Glutathion-S-Transferasen (GST).....	34
4.3.2	Glutathion-Reduktase (GR).....	35
4.3.3	Peroxidasen (POX).....	35
4.3.4	Bestimmung des Proteingehalts .....	35
4.3.5	Berechnung der Enzymaktivität .....	36
5	Mikroorganismen .....	37
5.1	Pilzliches Wachstum auf festem Medium.....	37
5.2	Entgiftungsenzyme in Pilzen.....	37
5.3	Bakterielles Wachstum in Flüssigkultur unter Konjugat-Einfluß .....	38

5.4	BIOLOG.....	38
5.4.1	BIOLOG mit Bodenbakterien (Kontrollplatten).....	39
5.4.2	BIOLOG mit thiolischen Konjugaten („Parent Mix“ ).....	41
5.5	BIOLOG mit Thiolen.....	41
5.6	BIOLOG mit Modell-Xenobiotika.....	42
5.7	BIOLOG mit aufgereinigtem GS-DNB.....	42
5.8	Auswertung und Darstellung der BIOLOG®-Ergebnisse.....	43
5.8.1	Klassische Auswertung.....	43
5.8.2	Modifizierte Auswertung.....	44
6	Toxintest mit Tomaten.....	44
III	Ergebnisse.....	46
1	Synthese.....	46
1.1	Einfluß des pH-Wertes auf die Konjugation.....	46
1.2	Einfluß von NH <sub>3</sub> -Lösung und Natronlauge auf die Konjugation.....	48
1.3	Extinktionen der SPE-Fractionen.....	50
1.4	Dünnschichtchromatographie der SPE-Fractionen.....	52
1.5	HPLC der SPE-Fractionen.....	54
1.5.1	GS-DNB.....	54
1.5.2	γGC-DNB.....	57
1.5.3	Cys-DNB.....	60
1.6	Analyse des Cystein-Konjugates mit Hilfe der CE.....	63
1.7	Zusammenfassung.....	65
1.8	Saubere Konjugate für ausgewählte Versuche.....	67
2	Transportstudien mit pflanzlichem Gewebe.....	68
2.1	Transport von GSH-Konjugat und Cys-Konjugat durch verschiedene Gewebe von Gerstenkeimlingen von der Wurzelbasis zur Wurzelspitze.....	68
2.2	Transport von 1,5 mM GSH-Konjugat.....	70
2.3	Transport von GSH-Konjugat von der Wurzelspitze zur Wurzelbasis.....	71
2.4	Transportgeschwindigkeiten durch die verschiedenen Gewebe.....	72
2.5	BUNSEN´ches Effusionsgesetz.....	73
2.6	Hemmung des Transportes.....	75
3	Wirkungen auf Glutathion-S-Transferasen (GSTs) in Pflanzen.....	76
3.1	Entgiftungskapazitäten von Meerrettich-Wurzelkulturen.....	76



3.1.1	Zugabe von GS-X.....	76
3.1.2	Zugabe von $\gamma$ GC-X .....	78
3.1.3	Zugabe von Cys-X .....	80
3.1.4	Peroxidase-Aktivität in Meerrettich-Wurzelkulturen.....	82
3.2	GST-Aktivitäten in mykorrhizierten Pflanzen .....	84
3.2.1	Gerste ( <i>Hordeum vulgare</i> L.).....	84
3.2.2	Spitzwegerich ( <i>Plantago lanceolata</i> L.) .....	86
3.2.3	Blauschwingel ( <i>Festuca glauca</i> L.) .....	88
3.2.4	Peroxidase-Aktivität.....	89
4	Wirkungen auf GSTs in Bodenpilzen .....	90
4.1	Einfluß des GSH-Konjugates auf den radialen Zuwachs.....	90
4.2	GSTs in den Bodenpilzen <i>Chaetomium (globosum)</i> und <i>Trichoderma</i> spp.....	91
4.2.1	Zugabe von GS-X.....	91
4.2.2	Zugabe von Cys-X .....	93
4.2.3	Zugabe von CDNB.....	95
5	Wirkungen auf Bodenbakterien .....	97
5.1	Bakterielles Wachstum in Flüssigkultur .....	97
5.2	BIOLOG-Versuch .....	98
5.2.1	<i>Serratia liquefaciens</i> .....	99
5.2.2	<i>Burkholderia cepacia</i> .....	108
5.2.3	<i>Burkholderia sacchari</i> .....	116
6	Toxintest.....	124
6.1	Visuelle Symptome .....	124
6.2	Entgiftungskapazität von Tomatenpflanzen nach Induktion mit Fremdstoff-Metaboliten .....	126
6.2.1	GSTs in Tomaten nach Induktion mit Fremdstoff-Metaboliten.....	126
6.2.2	Sonstige Entgiftungsenzyme in Tomatenblättern nach Induktion mit Fremdstoff-Metaboliten .....	128
IV	Diskussion .....	129
1	Synthese .....	129
2	Transport und Translokation .....	134
3	Wirkungen auf GSTs.....	137
3.1	Meerrettich-Wurzeln .....	137

3.2	GSTs in mykorrhizierten Pflanzenwurzeln .....	142
4	Toxintest.....	145
4.1	Visuelle Symptome .....	145
4.2	Enzymologische Untersuchungen .....	147
5	Wirkungen der Konjugate auf Mikroorganismen .....	148
5.1	GSTs in Pilzen nach Konjugat-Zugabe .....	148
5.2	Wirkungen auf Bakterien .....	149
6	Zusammenfassung.....	155
7	Literaturverzeichnis.....	158
V	Anhang .....	169
1	Absatz von PSM in Deutschland.....	169
2	Korrelation der verschiedenen Umsatzraten in Pilzen .....	170
3	Wachstumsfördernde Substrate des BIOLOG®-Versuchs .....	171
4	Hauptkomponenten-Analyse des BIOLOG-Versuches .....	174
4.1	Parent Mix .....	174
4.2	GS-DNB .....	176
4.3	Vergleich zwischen GS-X „Parent Mix“ und GS-DNB.....	177
4.4	Thiole .....	178
4.5	Modell-Xenobiotika .....	180
5	Toxintest.....	181

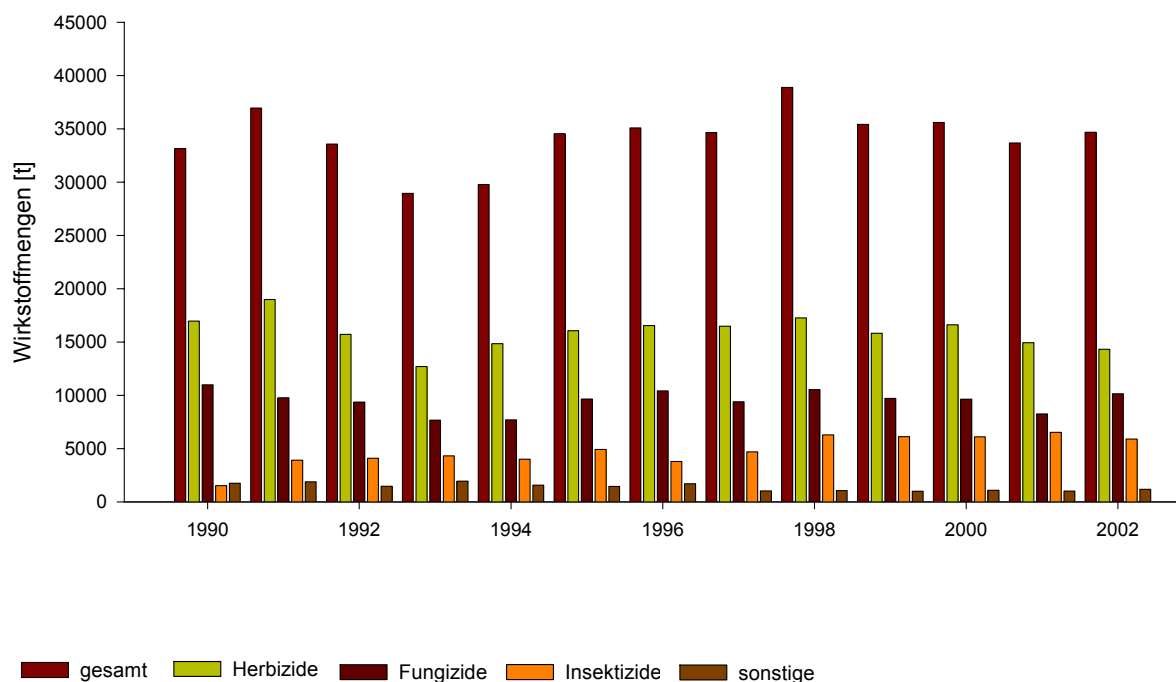
## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
A.l.	<i>Acaulospora longula</i>
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
CE	Kapillar-Elektrophorese
CHES	2-(cyclohexylamino)-ethansulfonsäure
Cys	Cystein
Cys-DNB oder Cys-X (analog GS-X)	Dinitrobenzyl-Cystein
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DCNB	1,2-Dichlor-4-nitrobenzol
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithio-DL-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOF	Elektro-osmotischer Fluß
$\gamma$ GC	$\gamma$ -Glutamylcystein
$\gamma$ GC-DNB oder $\gamma$ GC-X (analog GS-X)	Dinitrobenzyl- $\gamma$ Glutamylcystein
G.i.	<i>Glomus intraradices</i>
G.m.	<i>Glomus mossea</i>
GSH	Glutathion
GS-DNB oder GS-X	Dinitrobenzyl-Glutathion oder Glutathion-konjugiertes Xenobiotikum
GST	Glutathion-S-Transferase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MS	Massenspektrum
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNBC	Nitrobenzylchlorid
pNBoC	Nitrobenzoylchlorid
POX	Peroxidase
PSM	Pflanzenschutzmittel
PVP K30	Polyvinylpyrrolidon
Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

## I Einleitung

Landwirtschaftliche Produktion ist in der heutigen Zeit ohne Pflanzenschutzmittel (PSM) nicht mehr vorstellbar. Im Jahr 2002 wurden allein in Deutschland etwa 35.000 t PSM ausgebracht (BMVEL 2003). Etwa die Hälfte aller eingesetzten PSM sind Herbizide (Abb. 1, Hock 1995, Tabelle mit Detailinformationen im Anhang Kap.V1, S.169).

Zwar werden Mittel, die in den 50er und 60er Jahren zugelassen wurden und heute nicht mehr Gesundheits- und Umweltschutzaspekten gerecht werden, vom Markt genommen und ihre Verwendung gesetzlich verboten. So sind von über 300 Wirkstoffen, die in den 80er Jahren gebräuchlich waren, heute nur noch 269 zugelassen (BMVEL 2003). Doch auf der Grundlage dieser Wirkstoffe werden immer neue Produkte entwickelt, z. Zt. sind insgesamt 931 PSM auf dem Markt.



**Abb. 1: Absatz von Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffmengen in Deutschland [in t] in den Jahren 1990 bis 2002 (BMVEL 2003).**

Bei der Zulassung von neuen PSM werden hauptsächlich der Weg und Verbleib des eigentlichen Wirkstoffes verfolgt und beurteilt (Hock 1995). Verbleib und Wirkung von Metaboliten werden im Vergleich dazu nur in groben Zügen untersucht (BVL 2004). Die Metaboliten der Wirkstoffe gewinnen mehr und mehr an Interesse, besonders jetzt, wo immer klarer wird, daß

auch von den Rückständen noch Schadwirkungen ausgehen und Belastungen für die Umwelt entstehen können (BVL 2004; Sandermann 2004; Domsch 1992).

So ist es durchaus möglich, daß ein Wirkstoff selbst nicht mehr nachweisbar ist, weil er als gebundener Rückstand in die Biomasse eingebaut wurde (Scheunert & Schröder 1998; Sandermann 1997). Diese Biomasse wird jedoch eines Tages wieder zersetzt (z.B. durch Saprophyten) und gibt so mit großer Wahrscheinlichkeit den Wirkstoff wieder frei (Sandermann 1997; Sandermann et al. 1983).

Denkbar ist auch, daß ein Nichtziel-Organismus (Pflanze, Tier) den Wirkstoff aufnimmt, metabolisiert und auf diesem Wege mehr oder weniger toxische Intermediate bildet. Gelangen diese durch Ausscheidungsprozesse wieder in die Umwelt, sind die Folgen ungeklärt.

Seit etwa Mitte der 70er Jahre wird die Entstehung von Fremdstoff-Metaboliten in Pflanzen untersucht (z. B. Lamoureux & Rusness 1993), es liegen jedoch kaum Untersuchungen zur Translokation der Metabolite innerhalb der Pflanze vor. Die vorhandenen Arbeiten befassen sich ausschließlich mit der Kompartimentierung der Konjugate innerhalb der Zelle (z. B. Wolf 1996; Marrs et al. 1995; Lamoureux & Rusness 1993; Martinoia et al. 1993; Coupland 1991). Aussagen über eine Exudation der Metaboliten zusammen mit Zuckern und anderen organischen Molekülen an den Boden finden sich nur verstreut. Über einen eventuellen Einfluß der Metaboliten auf die Bodenlebewelt finden sich entsprechend wenige Angaben. Dabei ist die Rhizosphäre ein empfindliches Klein-Ökosystem, dessen Beeinflussung gravierende Folgen für die Pflanzengesundheit haben kann.

## **1 Entgiftung und Metabolismus von Herbiziden**

Als sessile Organismen haben Pflanzen nicht die Möglichkeit, (Umwelt-)Giften auszuweichen. Für ihr Überleben ist die Fähigkeit zur Entgiftung dieser Schadstoffe daher von entscheidender Bedeutung. Bei diesen Umweltgiften handelt es sich um die unterschiedlichsten chemischen Substanzen unterschiedlichster Herkunft, die durch ihre Verwendung, Schadensfälle und durch unkorrekte Handhabung in die Umwelt gelangen. In der vorliegenden Arbeit soll aber der Schwerpunkt auf den in der landwirtschaftlichen Produktion eingesetzten Herbiziden liegen, deren Applikation guter landwirtschaftlicher Praxis unterliegt.

Die Entgiftung organischer Schadstoffe und Herbizide folgt in groben Zügen dem Schema, das bereits 1905 von Knoop für die Entgiftung von Fettsäuren, die mit einem Phenolrest sub-

stituiert waren, im Säugerorganismus vorgestellt wurde (Knoop 1905, zitiert nach Sandermann 1994). Dieses Entgiftungsschema setzt sich aus 3 Phasen zusammen: Aktivierung des Schadstoffes, Konjugation mit einem Biomolekül (z. B. Zucker oder GSH) und anschließende Ausscheidung. Es wurde erstmalig 1976 von Shimabukuro auf den pflanzlichen Organismus übertragen und Mitte der 90er Jahre von Sandermann neueren Erkenntnissen angepaßt. Aufgrund seiner Analogien zum Säugermetabolismus wurde vom „Konzept der Grünen Leber“ gesprochen (Sandermann 1994).

Der erste Entgiftungsschritt ist – wie auch im Säuger gezeigt – die Aktivierung der Schadstoffe durch Reduktion, Oxidation oder Hydrolyse mit Hilfe der entsprechenden Enzyme. Damit wird der zu entgiftende Stoff zwar zunächst noch giftiger, so ist er aber reaktiv genug, um in einem zweiten Schritt an ein Biomolekül konjugiert zu werden. Mit der Konjugation ist oft eine drastische Vergrößerung des Moleküls verbunden, häufig ändern sich dadurch auch dessen chemische Eigenschaften. Beides führt dazu, daß der Schadstoff als solcher nicht mehr erkannt wird und damit seine Giftigkeit für die Zellen und Gewebe verliert (Coleman et al. 2001 und 1997).

Verfügt der tierische Organismus nun über die Möglichkeit der quantifizierten Ausscheidung der chemisch entgifteten Stoffe über Darm und Niere, müssen die Pflanzen andere Wege nutzen (Scholz 2000).

Der Begriff Ausscheidung ist daher – mit Blick auf die Pflanze – nicht ganz eindeutig. Einerseits ist die vollständige Verfrachtung des Stoffes aus dem Organismus heraus gemeint. Dies wird im strengen Sinne Vorgänge der Exudation, also der Abgabe von Substanzen an die angrenzende Umwelt umfassen und soll über die Wurzeln, aber auch über Sproßteile wie z. B. Guttation der Blätter, erfolgen (Libbert 1993; Hock & Elstner 1984).

Andererseits kann mit Ausscheidung aber auch gemeint sein, daß der Stoff lediglich aus dem „lebenden Teil“ des Organismus entfernt wird. Die betreffende Substanz liegt nicht mehr im Cytosol vor und kann von dort aus wirksam sein, sondern wird zunächst in die Vakuole verfrachtet (Schröder 2001).

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, daß der größte Teil der entgifteten Stoffe in der Vakuole dauerhaft eingelagert wird (Gaillard et al. 1994; Hörtensteiner 1993). In den letzten Jahren wurde jedoch immer klarer, daß die Konjugate in der Vakuole lediglich zwischengelagert werden und dort weiteren Stoffwechselprozessen unterliegen (Klein 2002 und 1998; Wolf 1996; Lamoureux 1993; Lamoureux & Rusness 1989).

Weiterhin konnte mehrfach festgestellt werden, daß die Konjugate und deren Metabolite aus der Vakuole wieder herausbefördert werden. Transport-Studien haben bisher gezeigt, daß die Fremdstoff-Metabolite vom Sproß in die Wurzel transportiert werden. Dort kommt es dann zu einer Anreicherung in der Wurzelspitze und/oder einer Verteilung in den Wurzelhaaren. Ein Rücktransport der Konjugate aus der Wurzel in den Sproß findet offenbar nicht statt (Scheer 2003).

Eine weitere Möglichkeit ist, Xenobiotika-Konjugate als sog. bound residues (gebundene Rückstände) im Organismus festzulegen. Diese Fixierung ist in aller Regel ein Einbauen in die Zellwand, wo es einen Teil des Lignin-Moleküls darstellt (Schmidt et al. 1988). Dies wird in der Literatur „storage excretion“ (Lagerungsausscheidung) genannt und bezeichnet ein sicheres „Entfernen“ aus dem aktiven Organismus für die Dauer seines Lebens (Schröder 2001).

## **2 Transportprozesse in pflanzlichen Geweben**

Die Transportvorgänge in Pflanzen werden nach Entfernungsbereichen eingeteilt. Es wird unterschieden nach Intrazellulärtransport, Transport zwischen den Geweben (Interzellulartransport) und Langstreckentransport, wobei letzterer auch Translokation genannt wird (Müller 1986).

Transport und Translokation innerhalb der Pflanze werden ausnahmslos vom Aufbau des Gewebes und der Beschaffenheit der Membranen bestimmt.

Die Translokation ist abhängig vom Aufbau des Gewebes, sie kann symplastisch oder apoplastisch erfolgen. Der Apoplast ist die Gesamtheit der Zellwände und Interzellularen (Abb. 2, rote Linie). Darin bewegen sich Moleküle frei diffusiv (Donan free space). Von hieraus werden die Moleküle über spezielle Transporter durch die Biomembranen in den Symplasten weitergeleitet.

Im Symplasten können sich die einmal aufgenommenen Moleküle mehr oder weniger frei zwischen den Zellen in deren Cytosol bewegen (Abb. 2, blaue Linie), denn die Protoplasten der Zellen sind über die Plasmodesmen miteinander verbunden, so daß ein lebendes Kontinuum (Symplast) im ganzen Organismus besteht (Müller 1986). Dieser lebende Bereich wird durch das Plasmalemma zur Zellwand hin und durch den Tonoplasten an der Vakuole begrenzt (Müller 1986).

Gerichtete Transportströme im Symplasten kommen durch Be- und Entladungsvorgänge in Source- oder Sink-Geweben bzw. durch spezifische Transportproteine zustande.

Es gibt Hinweise darauf, daß die Plasmodesmen mit KCl geschlossen werden können (Lüh-ring, mdl. Mitteilung 2004), so daß der Transport unterbrochen ist.

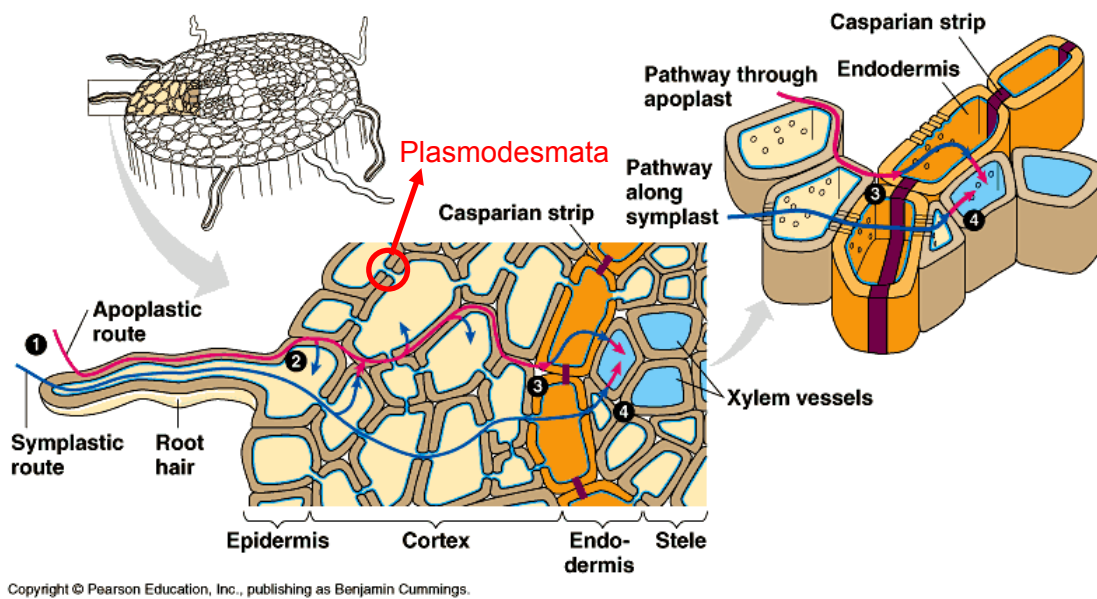


Abb. 2: Schematische Darstellung des Transportes innerhalb pflanzlichen Gewebes (verändert nach Cummings 2004).

Die Kompartimentierung und Translokation der Fremdstoff-Metabolite sind von großer Bedeutung für die Pflanzen (Marrs 1995; Coupland 1991). Nur wenn Ort der Konjugation und weitere Prozessierung räumlich voneinander getrennt sind, kann – gerade in Zusammenhang der Herbizid-Entgiftung mittels GSTs – die oft erwähnte Produkt-Hemmung ausgeschlossen werden (Michels & Gottschalk 1994; Lamoureux & Rusness 1986). Es hat sich in verschiedenen Studien gezeigt, daß die Aktivität der GSTs stark vermindert ist, sobald eine bestimmte Konjugat-Konzentration in der Lösung vorliegt (Blake-Kalff et al. 1997; Lamoureux & Rusness 1986). Daher ist es wichtig, die durch das Enzym gebildeten Produkte innerhalb der Zelle möglichst schnell in ein anderes Kompartiment zu befördern.

In biologischen Systemen versteht man unter Transport den Fluß von Molekülen und Ionen zwischen verschiedenen Kompartimenten. Erfolgt der Transport aus dem Blatt zur Wurzel im Phloem, spricht man auch von Translokation (Taiz & Zeiger 2000).

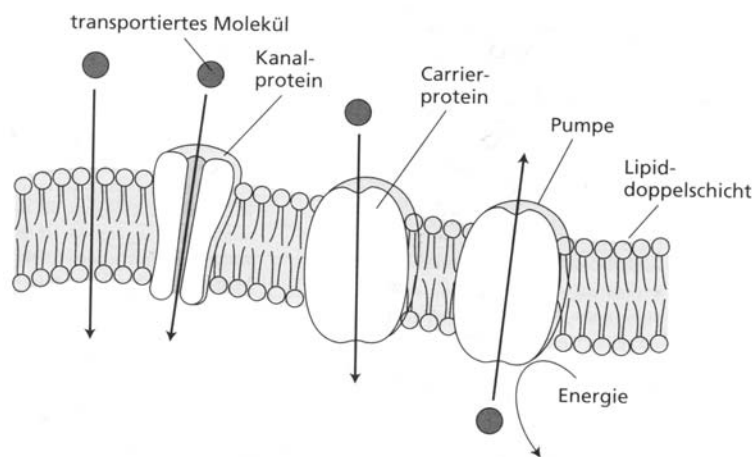
Den Transport kann man in aktive und passive Vorgänge unterteilen (Taiz & Zeiger 2000).



Der passive oder freie Transport ist die Bewegung der Moleküle aufgrund von Diffusion und erfolgt entlang eines Konzentrationsgradienten bis eine Gleichgewichtsverteilung erreicht ist.

Es ist keine Energiezufuhr notwendig (Libbert 1993).

Verläuft der Stofftransport entgegen einem Konzentrationsgefälle, spricht man von aktivem Transport. Dieser ist nicht spontan und benötigt die Zufuhr von Energie (Taiz & Zeiger 2000). Im Gegensatz zum freien (passiven) Transport erfolgt der aktive Transport mit Hilfe von Transportproteinen, die in Kanäle, Carrier und Pumpen unterteilt werden können (Taiz & Zeiger 2000, Abb. 3).



**Abb. 3: Schematische Darstellung verschiedener Transporter in biologischen Membranen (aus: Taiz & Zeiger 2000)**

### 3 Die Rhizosphäre und ihre Beeinflussung durch Wurzelexudate

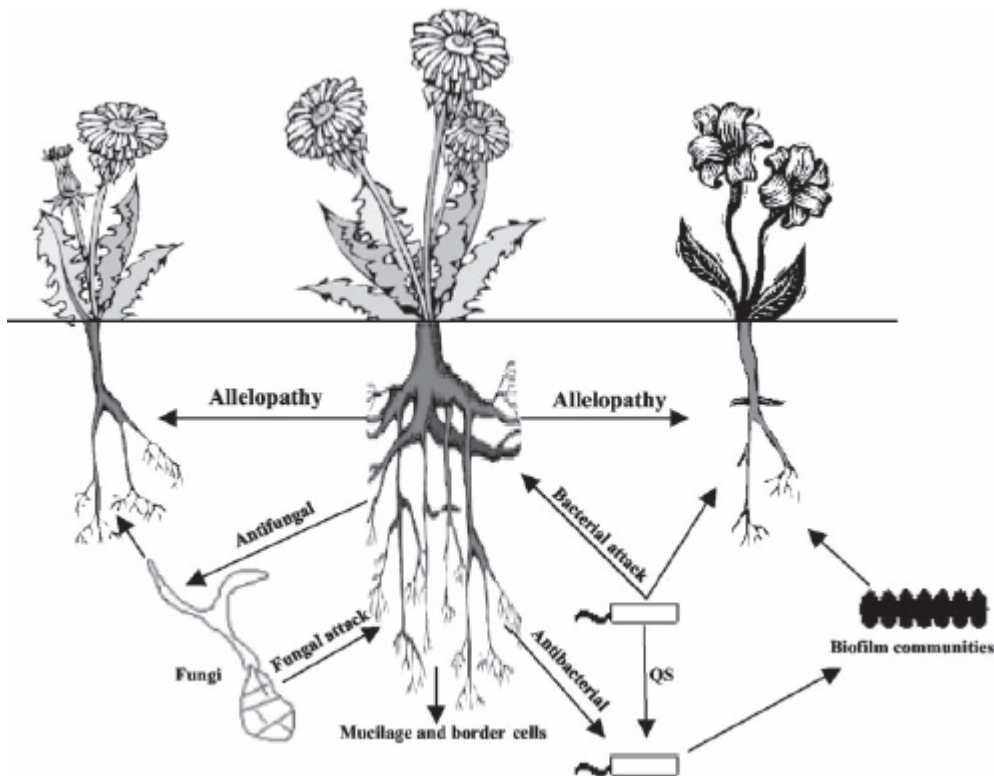
Als Rhizosphäre wird der Boden bezeichnet, der die Wurzel unmittelbar umgibt. Hier lebende Mikroorganismen werden direkt von der Pflanzenwurzel beeinflusst, beeinflussen ihrerseits aber auch die Wurzel (Walker et al. 2003; Flores 1999). Eine Übersicht gibt Abb. 4.

Durch die Exudation einer Vielzahl an Stoffen (Flores 1999) beeinflussen Wurzeln die Bodenlebewelt in ihrer unmittelbaren Nachbarschaft in hohem Maße. Es werden Herbivore und Pathogene abgewehrt, vorteilhafte Symbiosen mit Pilzen und Bakterien gefördert, chemische und physikalische Eigenschaften des Bodens verändert und das Wachstum konkurrierender Nachbarpflanzen gehemmt (Walker et al. 2003).

Wurzelexudate werden nach Walker et al. (2003) in nieder- und hoch-molekulare Komponenten eingeteilt (low- $M_r$ -compounds und high- $M_r$ -compounds). Low- $M_r$ -Komponenten sind

Aminosäuren, organische Säuren, Zucker, Phenole und verschiedene Sekundärmetabolite. Sie machen den Löwenanteil der Exudate aus.

Als high-M<sub>r</sub>-Komponenten werden Polysaccharide und Proteine bezeichnet (Walker et al. 2003).



**Abb. 4:** Übersicht über die komplexen Interaktionen von Wurzelexudaten in der Rhizosphäre zwischen Pflanzenwurzeln und anderen Organismen. Die Organismen sind nicht maßstabsgetreu abgebildet. QS – Quorum sensing (aus: Walker et al. 2003).

Die Pflanzenwurzel exudiert Stoffe, die von den Bodenorganismen direkt als Energiequelle genutzt werden. Daneben können Wurzelexudate das Milieu der Bodenlösung verändern und damit die Verfügbarkeit von Nährstoffen beeinflussen (Nardi et al. 2000). Dies ist vor allem für die Verfügbarkeit von Phosphor untersucht worden (Marino 2000; Neumann & Römheld 1999).

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß Wurzelexudate das Hyphenwachstum von arbuskulären Mykorrhizapilzen anregen (Vierheilig et al. 1998) oder deren Sporenkeimung stimulieren. Nähere Untersuchungen dazu liegen von Tamasloukht et al. (2003) vor. Es konnte gezeigt werden, daß zunächst eine Gen-Aktivierung in *Glomus* erfolgt, sobald Wurzelexudate

zugegeben wurden. Dem folgen Veränderungen im Pilz auf physiologischer und abschließend auf morphologischer Ebene. Der Mykorrhizapilz bildet als Antwort auf die Exudate ein extensiv verzweigtes Hyphengeflecht.

Gleichzeitig konnte aber auch nachgewiesen werden, daß eine besondere Art der Exudat-Zusammensetzung das Mykorrhiza-Wachstum unterbinden kann (Gadkar et al. 2003).

Von Ikeda et al. (1997) wird berichtet, daß die Wurzelexudate die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft im Boden verändern können. In ungünstigsten Fall werden Pathogene (hier: *Pseudomonas* spp.) stärker begünstigt als andere Bakterien.

Es wird sogar ein Zusammenhang zwischen Wurzelexudaten und Insekten diskutiert (Walker et al. 2003).

#### **4 Ziel**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst der Langstrecken-Transport von Xenobiotika-Metaboliten innerhalb des pflanzlichen Gewebes untersucht werden. Dabei wurde der Focus vor allem auf die Abgabe an den Boden bzw. das umgebende Medium gerichtet.

Unabhängig davon sollte auch gezeigt werden, welchen Einfluß die GSH-Konjugate und ihre Abbauprodukte auf die Bodenlebewelt haben können. Im Mittelpunkt stand der Einfluß auf Bodenbakterien, diese Frage sollte auch mit Hilfe von Untersuchungen an verschiedenen Bodenpilzen beantwortet werden.

Ziel war weiterhin, die Entgiftungskapazität von verschiedenen Pflanzen zu charakterisieren. Wichtig war hier, ob sich die Fähigkeit zur Entgiftung verändert, wenn die Wurzeln mit wurzelassoziierten Bakterien, sog. PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), oder einem Mykorrhizapilz besiedelt sind. Darüber hinaus wurde untersucht, inwieweit sich die GSTs in Pflanzen durch die Metabolite beeinflussen lassen.

Einen nicht unerheblichen Anteil der Arbeit nahm die Synthese der einzelnen Konjugate ein. Um physiologische Effekte in den Pflanzen zu erzeugen, müssen die Metabolite in einer Form vorliegen, wie sie auch im Organismus vorkommen. Da es jedoch keine Möglichkeit gibt, diese Fremdstoff-Metabolite käuflich zu erwerben, mußte eine Methode für die Eigensynthese entwickelt und geprüft werden.

## II Material und Methoden

### 1 Pflanzenmaterial und biologische Kulturen

Die Transportstudien mit der PITMAN-Kammer wurden mit Gersten-Keimlingen durchgeführt. Bei den Versuchspflanzen handelte es sich um Gerste (*Hordeum vulgare* L.) var. ‚Cherie‘, die auf feuchtem Filterpapier im Dunklen bei Raumtemperatur gekeimt und 7 Tage gewachsen war. Die Pflänzchen waren stets frei von Kontaminationen, obwohl auf eine Oberflächensterilisation des Saatgutes verzichtet wurde.

Wie die Konjugate auf sterile bzw. Bakterien-besiedelte Wurzeln wirken, wurde mit transformierten Meerrettichwurzeln (*Armoracia rusticana*)<sup>1</sup> untersucht. Die Transformation erfolgte mit *Agrobacterium rhizogenes* nach dem Protokoll von Sheng & Citovsky (1996); die Wurzeln wurden bei 25 °C in Strullu-Romand-Medium (1986, modifiziert nach Declerck et al. 1998) im Schüttler kultiviert (Tab. 1). Auf dem häufig verwendeten Murashige & Skroog Medium (Sigma-Aldrich M5524) war das Wachstum der Wurzeln vergleichsweise dürftig, so daß dieses Medium nicht eingesetzt wurde.

Weiterhin sollte die Enzymausstattung von mykorrhizierten Pflanzen mit nicht-mykorrhizierten Pflanzen verglichen werden.

Als Testpflanzen dienten *Hordeum vulgare*, *Festuca glauca* und *Plantago lanceolata*, die im Gewächshaus in Blähton-Kultur angezogen wurden. Die Pflanzen waren mit *Glomus intraradices* bzw. *Glomus mossea* bzw. *Acaulospora* besiedelt.<sup>2</sup>

Für die Enzym-Extraktion wurden ausschließlich die Wurzeln entnommen.

Um eine Beeinflussung der Konjugate auf Bodenpilze feststellen zu können, wurde das Muster der Entgiftungsenzyme von Pilzen nach Inkubation mit unterschiedlichen Konjugaten über die Zeit untersucht. Die Pilze *Chaetomium (globosum)*, *Fusarium graminearum* und eine *Trichoderma*-Art, die aus einem landwirtschaftlich genutzten Boden isoliert wurden, wurden zunächst für etwa 4 Wochen in Flüssigkultur (20% Malzextrakt) bei Raumtemperatur kultiviert.

---

<sup>1</sup> Die transformierten Meerrettichwurzeln stellte freundlicherweise Dr. A. Nepovim vom Department of Tissue culture der Czech Academy of Science, Prag, zur Verfügung.

<sup>2</sup> Die Pflanzen wurden freundlicherweise vom Lehrstuhl für Zellbiologie der TU München-Weihenstephan zur Verfügung gestellt.

Die Kolben wurden nicht geschüttelt, damit sich Mycel und Sporenrasen gut ausbilden konnten.

**Tab. 1: Nährmedium nach Strullu & Romand für transformierte Meerrettichwurzeln (1986, modifiziert nach Declerck et al. 1998). Für feste Medien wurden noch 3 g GelGro® pro L zugegeben.**

Menge [mg/L]	Substanz	Konzentration [mM/L]
<b>Makroelemente</b>		
739	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	3
76	KNO <sub>3</sub>	0,75
65	KCl	0,87
4,1	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,03
359	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,52
8	NaFe-EDTA	0,02
10 g	Sucrose	29,2
<b>Mikroelemente</b>		
		Konzentration [µM/L]
0,29	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1
1,86	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30
2,45	MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1
0,24	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,96
0,0024	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,01
0,035	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,03
<b>Vitamine</b>		
		Konzentration [µM/L]
1	Thiamine	2,96
0,9	Pyridoxine	4,38
1	Nicotinic acid	8,1
0,9	Panthotenat Ca	1,88
0,0009	Biotin	0,004
0,4	Cyanocobalamin	0,29

Bei den im BIOLOG-Versuch eingesetzten Bakterien handelte es sich um die drei typischen Bodenbakterien *Serratia liquefaciens* und *Burkholderia sacchari* sowie der phytopathogenen *Burkholderia cepacia*.

Im Toxintest wurde unterschiedliches Pflanzenmaterial eingesetzt. Es wurden Tomaten der Sorte 'Moneymaker' im Dunklen vorgekeimt und für 6 Wochen im Gewächshaus kultiviert. Sie wuchsen in Einheitserde (Fruhstorfer Erde, Typ T) bei 20 °C, 60% Luftfeuchtigkeit und 12 Std. Tageslänge. Einmal wöchentlich wurde mit Volldüngerlösung gedüngt.

Von diesen Tomatenpflanzen wurden 30 cm lange Kopfstecklinge geschnitten, die dann in die Testlösungen gestellt wurden. Pro Lösung wurden 10 Stecklinge ausgewählt. Bei den Testlösungen handelte es sich um GSH- und Cys-Konjugate sowie reine CDNB-Lösung. Die Lösungen waren 0,5 mM und 0,05 mM konzentriert. Die Kontrollstecklinge standen in Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,8).

Im zweiten Teil des Toxintests wurden keine Stecklinge verwendet, sondern vollständige, bewurzelte Pflanzen. Diese wurden jedoch nicht in Bodensubstrat kultiviert, sondern in Hydrokultur mit Plastikgranulat. Das Granulat ermöglicht durch seine glatte Oberfläche ein schonendes Entfernen der Wurzeln. Darüber hinaus sind die Wurzeln sauber und verunreinigen nicht durch Substratrückstände die Testlösungen.

## **2 Synthese der Konjugate**

### **2.1 Enzymatische Herstellung der Konjugate**

Die Synthese der Konjugate wurde versuchsweise mit gekaufter Ratten-GST (Sigma-Aldrich) durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, daß so nur Glutathion-Konjugate erzeugt werden können. Die Konjugation von CDNB mit Cystein oder  $\gamma$ Glutamylcystein wurde von diesem Enzym nicht katalysiert.

Problematisch ist hier weiterhin, daß durch das Phänomen der Substrat-Hemmung keine vollständige Umwandlung der Substrate in das Konjugat erfolgt. Liegen zu viele Konjugat-Moleküle in der Lösung vor, kann die GST nicht mehr effektiv arbeiten.

Schließlich spielen bei der enzymatischen Herstellung der Konjugate auch noch die hohen Kosten des Enzyms und dessen ständige Verfügbarkeit eine wichtige Rolle.

### **2.2 Nicht-enzymatische Synthese der Xenobiotika-Konjugate**

Die bei der Entgiftung entstehenden Konjugate bilden sich nicht nur unter Enzymwirkung, sondern auch spontan im basischen Milieu. Dabei wird die SH-Gruppe des thiolischen Co-Substrats (Glutathion (Abb. 5),  $\gamma$ Glutamylcystein (Abb. 6), Cystein (Abb. 7)) durch die reaktive Gruppe des Xenobiotikums (Abb. 8) unter Bildung von Salzsäure (HCl) ersetzt.

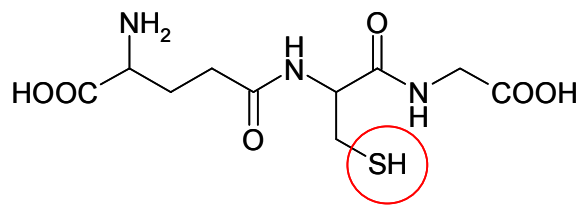


Abb. 5: Glutathion (GSH)

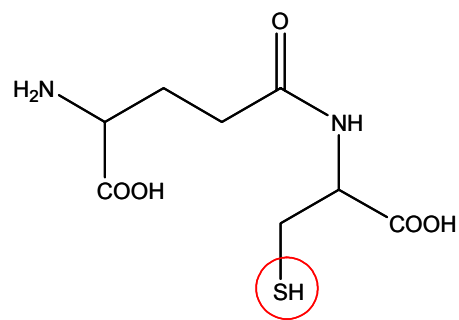
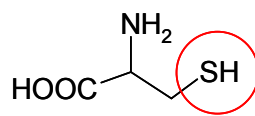
Abb. 6:  $\gamma$ -Glutamylcystein ( $\gamma$ GC)

Abb. 7: Cystein (Cys)

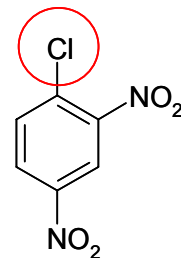


Abb. 8: 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB)

Die spontane Konjugation des CDNBs mit GSH und  $\gamma$ GC ist einfach. Es entsteht über die Zeit nur ein einziges Konjugat. Die Konjugation mit Cystein ist schwieriger, da es neben der reaktiven Thiolgruppe auch noch über eine ebenso reaktive Aminogruppe verfügt (Abb. 7). So kann sich im Laufe der Reaktionszeit nicht nur das S-Cys-DNB (Abb. 9) bilden, sondern auch noch ein N-Cys-DNB (Abb. 10). Dieses N-Cys-DNB tritt jedoch *in vivo* im Metabolismus von Pflanzen als endständiger Metabolit in Erscheinung, und es gibt Hinweise darauf, daß dieses Molekül nicht weiter metabolisiert wird (Lamoureux & Rusness 1993). Für Untersuchungen, bei denen Fremdstoff-Metabolite eingesetzt werden sollen, ist es also sehr wichtig, daß das „richtige“ Konjugat eingesetzt wird. Zumindest sollte man sich jedoch im Klaren darüber sein, daß man im gegebenen Fall mit einer Mischung aus S- und N-Cys-DNB arbeitet.

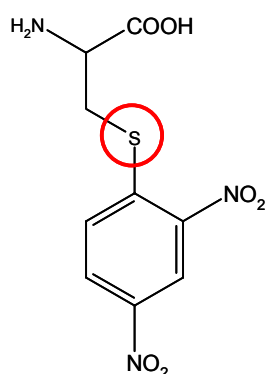


Abb. 9: S-Cys-DNB

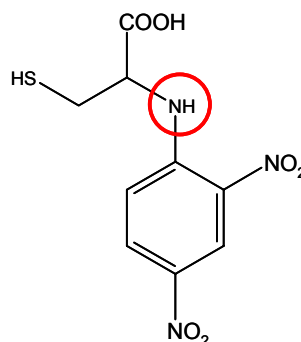


Abb. 10: N-Cys-DNB

Damit für die Versuche der vorliegenden Arbeit Klarheit über die verwendeten Thiol-Konjugate herrscht, wurden zunächst verschiedene Protokolle zur Synthese der Konjugate ausprobiert.

Wolf (1996) beschreibt die Konjugation von GSH und CDNB nach einem Protokoll von O'Connell et al. (1988). Danach wird das GSH-Konjugat in NaOH angesetzt und 4 Std. bei Raumtemperatur inkubiert.

Lamoureux und Rusness (1980) geben an, das S-Cystein-DNB-Konjugat in NaOH zu synthetisieren. Der Reaktionsansatz wird für 2 Std. bei 40 °C inkubiert und via präparative HPLC aufgereinigt. Leider fehlen Angaben zur quantitativen Ausbeute dieser Methode. Auch wird nicht erwähnt, ob mit dieser Methode andere Konjugate hergestellt werden können.

Scheer hat die Konjugate für seine Arbeit in einem basischen Puffer angesetzt. Er nahm die Aufreinigung mit Dichlormethan vor. Diese Methode ist jedoch nur für GSH-Konjugate validiert worden (Scheer 2003).

Bei allen Autoren gibt es Hinweise darauf, daß eine Erhöhung des pH-Wertes mit Ammoniak gute Erfolge bei der Konjugat-Synthese erzielt, jedoch finden sich in keiner der vorliegenden Quellen Hinweise über die Menge der synthetisierten Konjugate oder ihre Reinheit. Es wird auch nicht erwähnt, ob noch andere Stoffe gebildet werden.

Daher wurde versucht, ein eigenes Protokoll zur Synthese der Konjugat zu entwickeln. Dazu wurde die Konjugation mit verschiedenen Puffern unterschiedlicher pH-Werte überprüft (Tab. 2).



In 540 µl des jeweiligen Puffers wurden je 30 µl CDNB (30 mM in Ethanol) und Thiol (60 mM in H<sub>2</sub>O) gegeben. Der Verlauf der Konjugation wurde – wie bei den Enzymtests (vgl. Kap. 4.3.1) – im Photometer bei 340 nm Wellenlänge verfolgt.

Um Qualität und Reinheit der entstanden Konjugate zu überprüfen, wurden die entstanden Produkte über Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt. Zusätzlich erfolgte eine Auftrennung mittels HPLC.

Da oft NaOH und NH<sub>3</sub> den Synthese-Ansätzen zugegeben werden, wurden in einer weiteren Versuchsreihe Lösungen angesetzt, denen 1% NaOH (2 M) bzw. 1% NH<sub>3</sub> zugegeben wurden. Um in den HPLC-Chromatogrammen deutliche peak-Zuordnungen treffen zu können, lag in diesen Ansätzen das CDNB im Überschuß vor. Es hatte so die Funktion eines internen Standards.

**Tab. 2: Puffer für die Konjugat-Herstellung**

Puffer	Konzentration [M/L]	pH	Puffer	Konzentration [M/L]	pH
NaPP	1	3,2	Tris/HCl	0,1	7,5
Acetat	0,1	4	NaPP	0,1	7,5
CHES	0,0002	4,6	Tris/HCl	0,1	7,8
MES	0,025	5	KPP	0,1	7,8
H <sub>2</sub> O		5,7	Tris/HCl + NH <sub>3</sub>	0,1	7,8
Tris/HCl	0,1	6	Borat	0,1	8,2
Tris/HCl	0,05	6	PITMAN A		10
Tris/HCl	0,1	6,4	(vgl. Kap. 3)		
Tris/HCl	20	7,4	NaOH	1	14
Tris/HCl	0,02	7,4			

### 2.3 Aufreinigung der thiolischen Konjugate

Obwohl in allen Ansätzen das Thiol im Überschuß zugegeben wurde, ist nicht mit einer 100%igen Konjugation des Xenobiotikums zurechnen. Es ist eher zu erwarten, daß stets freie Reste vom Xenobiotikum in der Lösung vorliegen. Aus diesem Grund reinigen Lamoureux & Rusness (1980) ihre Ansätze stets via präparative HPLC auf. Da dies jedoch ein sehr langwieriges und wenig ergiebiges Verfahren ist, wurde versucht, die Konjugat-Lösungen anderweitig zu reinigen.

So wurden auf einer Vakuumstation kleine SPE-Säulchen verwendet, die mit C18-Material befüllt waren.

Für eine Nutzung mußten diese erst mit etwa 10 ml H<sub>2</sub>O befeuchtet werden. Die Konditionierung erfolgte mit 10/50/100% Acetonitril (ACN) in H<sub>2</sub>O (beides angesäuert mit 0,1% TFA). Zuerst wurde die Probe in die Säule gesaugt und mit etwa 2 ml H<sub>2</sub>O gespült. Dann folgte ein Gradient, bei dem in 10%-Schritten das Verhältnis von Acetonitril zu Wasser erhöht wurde. Da die HPLC-Chromatogramme zeigten, daß die Konjugate zwischen 50 und 70% ACN eluieren, wurde die Säule auch mit 55 und 65% ACN gespült. Alle Fraktionen wurden getrennt voneinander gesammelt und per HPLC und DC analysiert. So sollte untersucht werden, bei welchen Lösungsmittel-Konzentrationen die Konjugate eluieren und wann das nicht-konjugierte Xenobiotikum eluiert.

#### 2.4 Dünnschicht-Chromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie ist eine vergleichsweise einfache Methode, um flüssige Proben aufzutrennen (Jaenicke 1984). Dazu wird eine kleine Menge der Probe auf eine Kieselgelplatte mit Fluoreszenz-Indikator (MERCK, F254) gegeben. Im Laufmittel (Butanol (B), Eisessig (A), Wasser (W) im Verhältnis 12:3:5) trennt sich die Probe dann in ihre Einzelkomponenten auf. Unter UV-Licht sind diese Substanzen dann als UV-inaktive Banden detektierbar.

Über die R<sub>F</sub>-Werte, die sich aus dem Verhältnis Laufstrecke der Bande zu Gesamtlaufstrecke ergeben, lassen sich die gefundenen Substanzen charakterisieren.

Aus der Literatur ist bekannt, daß GSH-Konjugate bei Verwendung von BAW-Laufmittel auf Kieselgelplatten einen R<sub>F</sub>-Wert von etwa 0,35 haben (Schröder et al. 1993).

#### 2.5 HPLC

Der Erfolg der Konjugat-Synthese wurde mittels HPLC kontrolliert. Das System bestand aus den in Tab. 3 angegebenen Komponenten.

Die Trennung erfolgte auf einer Hypersil-ODS-Säule (5,0 µm; 250 x 4,0 mm) der Fa. Biscoff, Leonberg, mit C18-Material.

Als Laufmittel wurden A = Acetonitril (CH<sub>3</sub>CN) und B = Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) verwendet, beides im Ultraschallbad entgast und unter Zugabe von 0,1% TFA. Gradient und Trennbedingungen sind in Tab. 4 angegeben.

Es wurden jeweils 60 µl Probe injiziert, die Detektion der Konjugate erfolgte bei 280 nm.

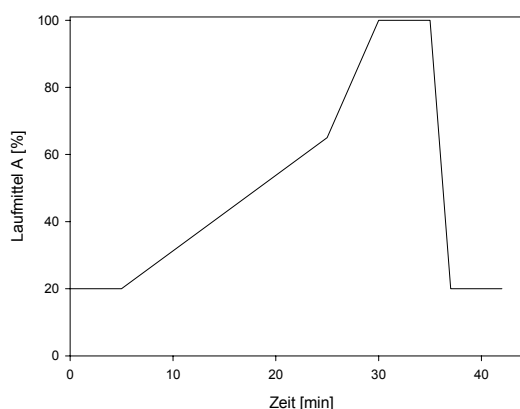
Zur Identifizierung der einzelnen Peaks wurden diese außerdem massenspektrometrisch analysiert. Der erste Peak ( $R_t \sim 3\text{min}$ ), der nur in den mit Ammoniak versetzten Proben auftrat, war stark gelb gefärbt und hatte einen hohen pH-Wert ( $\sim 8$ ). Es stellte sich heraus, daß dieser Peak ( $R_t \sim 3\text{min}$ ) und der folgende Peak ( $R_t \sim 10\text{min}$ ) identisch sind.

**Tab. 3: Komponenten der HPLC**

Gerät	Hersteller
Autosampler	Hewlett Packard
Pumpe	Varian ProStar 230
Monitor	Gynkoteck GP4
Auswerte-Einheit	Varian Star Workstation 5.5

**Tab. 4: Tabellarische und graphische Darstellung des Gradienten zur Trennung von Thiol-Konjugaten**

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	20	80
5	20	80
25	65	35
30	100	0
35	100	0
37	20	80
42	20	80



## 2.6 Kapillar-Elektrophorese (CE)

Eine Methode zur Charakterisierung von Proben unter elektro-chemischen Gesichtspunkten ist die Kapillar-Elektrophorese (CE – capillary electrophoresis). Grundprinzip hierbei ist die Wanderung geladener Teilchen (Ionen) im elektrischen Feld (Kuhn & Hofstetter-Kuhn 1993). Positiv geladene Teilchen (Kationen) wandern zur Katode (-Pol), die negativ geladenen Anionen wandern zur Anode (+Pol). Die Wanderung erfolgt in einer Kapillare, die mit Puffer gefüllt ist.

Gerade bei der Synthese der Cystein-Konjugate bietet die CE den Vorteil, daß das S-Cys-X (Abb. 11) und das N-Cys-X (Abb. 12) aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung voneinander getrennt und detektiert werden. Das N-Cys-X ist durch seine freie Thiolgruppe deutlich negativer geladen als das S-Cys-X. Es ist also zu erwarten, daß dieses bei der CE zu einem anderen Zeitpunkt im Detektor erscheint.

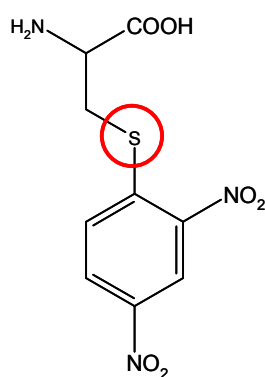


Abb. 11: S-Cys-DNB

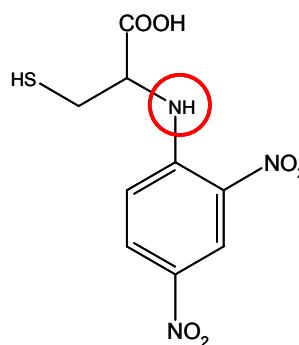


Abb. 12: N-Cys-DNB

Anhand der errechneten Titrationskurve (Abb. 13) läßt sich abschätzen, in welchem Milieu die unterschiedlichen Cys-Konjugate negativ geladen sind. Bei den jeweiligen pH-Werten ist theoretisch eine Auftrennung mittels CE möglich.

Die Konjugate trennen sich voneinander in pH-Bereichen zwischen 5 und 7. Dann liegt das S-Cys-X neutral vor, wohingegen das N-Cys-X negativ geladen ist (Abb. 13).

Bei  $\text{pH} > 10$  trägt das S-Cys-X auch eine negative Ladung, das N-Cys-X jedoch derer zwei. Im sauren Milieu ( $\text{pH} < 2$ ) liegt das S-Cys-X positiv geladen vor, das N-Cys-X ist hier neutral. In diesem Bereich sollte eine Aufreinigung sehr einfach sein. Extrem hohe oder extrem niedrige pH-Werte können jedoch negative Wirkungen auf die einzelnen Moleküle haben, so daß eine Trennung unter diesen Bedingungen nicht anzuraten ist. Die Messungen mit der CE wurden darum bei pH 6; 7 und 8 durchgeführt.

Das verwendete CE-System<sup>3</sup> bestand aus einem Beckman P/ACE System 5511 mit der dazugehörigen Software (Version 1.2). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf einer

<sup>3</sup> Die CE-Messungen konnten mit freundlicher Unterstützung der AG Schmitt-Kopplin am Institut für Ökologische Chemie (IÖC) durchgeführt werden.

50 cm langen Kapillare mit 17  $\mu\text{m}$  Durchmesser bei 25 kV und 30 °C über eine Dauer von 15 min. Die verwendeten Puffer bestanden aus 0,1 M NaOH und 50 mM Ammonium-Acetat, die pH-Werte waren auf 6/7/8 eingestellt.

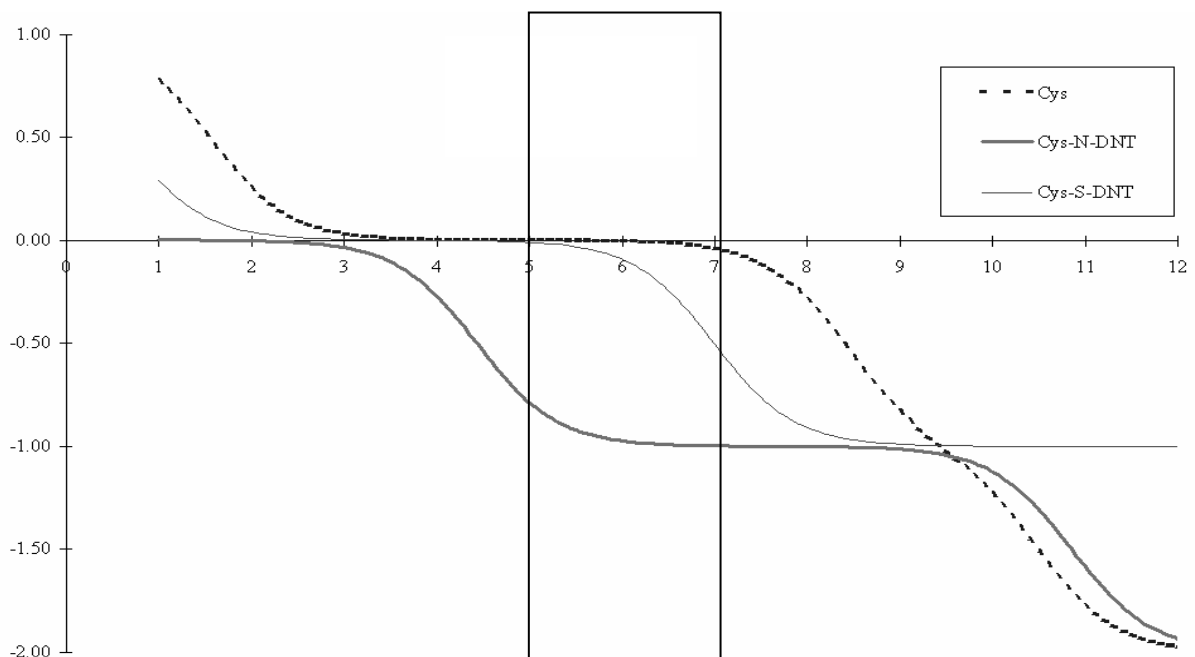


Abb. 13: Titrationskurven von Cys (gestrichelte Linie), S-Cys-DNB (dünne Linie) und N-Cys-DNB (fette Linie)

### 3 Transport-Studien

In einer Versuchsreihe mit der sog. PITMAN-Kammer wurde zunächst der Transport verschiedener Konjugate durch Gerstenwurzeln untersucht. Diesen Wurzeln waren die Spitzen abgeschnitten worden, in folgenden Versuchsreihen wurden die vollständigen Wurzeln eingesetzt. Schließlich wurden ganze Gerstenpflanzen in die Kammer eingelegt.

Für die Transport-Studien wurde die von Pitman (1971, zitiert nach Herschbach 1992) entwickelte Inkubationskammer verwendet (Abb. 14, Herschbach 1992). Sie besteht aus einer Plexiglas-Kammer, die durch herausnehmbare Stege variabel in drei Kompartimente geteilt werden kann. Die Stege ihrerseits sind halbiert, die Hälften sind an einer Längsseite siebenmal eingebuchtet. Dies sind die Aussparungen für das einzuspannende Material, damit es nicht zu Quetschungen kommt.

Zunächst wird ein halber Steg in die Kammer eingesetzt. Darauf bzw. in die Aussparungen wird das Pflanzenmaterial gelegt. Schließlich wird die zweite Steghälfte paßgenau aufgesetzt. Zur Abdichtung der einzelnen Kompartimente voneinander wurden die Stege und die Wurzeln in den Stegen großzügig mit Vaseline bestrichen.

In diese Kammer wurden fünf Wurzeln mit je 7 cm Länge gespannt, durch die dann ein Transport der Konjugat erfolgen sollte. In Kompartiment A lag der Sproß-seitige Teil der Wurzel, Kompartiment B diente als Puffer gegen Undichtigkeit von A oder C, und in Kompartiment C befand sich das Ende der Wurzel.

Die gesamte PITMAN-Kammer wurde mit einem speziellen Transportmedium gefüllt (5 mmol bis-tris-Propan und 0,5 mmol  $\text{CaCl}_2$ ; Schneider 1992), das zur Imitation der vom Sproß gelieferten Assimilate in Kompartiment A noch 1% Saccharose enthielt.

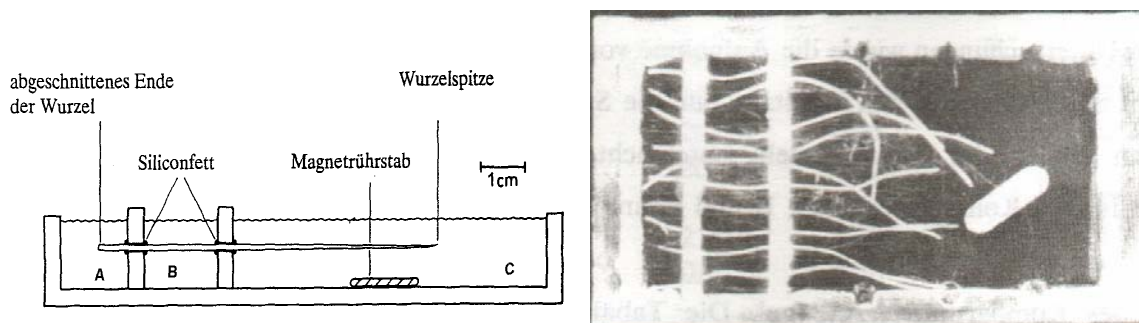


Abb. 14: Inkubationskammer nach Pitman (1971, zitiert nach Herschbach 1992)

Neben dem Transport vom Blatt zur Wurzel wurde auch noch der umgekehrte Transport von der Wurzel zum Sproß untersucht. Dazu wurden lediglich die Wurzeln andersherum in die Kammer eingespannt. Die Probenahme erfolgte nach wie vor in Kompartiment C.

Schließlich wurde getestet, ob der Transport mit KCl zu hemmen ist. Dazu wurden Wurzeln ohne Spitzen zunächst in die Kammer gespannt und über etwa 2 Std. der Transport vom Wurzelhals in Richtung Wurzelspitze verfolgt. Nachdem festgestellt wurde, daß ein Transport stattfindet, wurde in Kompartiment B 110 mM KCl-Lösung gegeben, um den Plasmodesmen-Transport zu inhibieren.

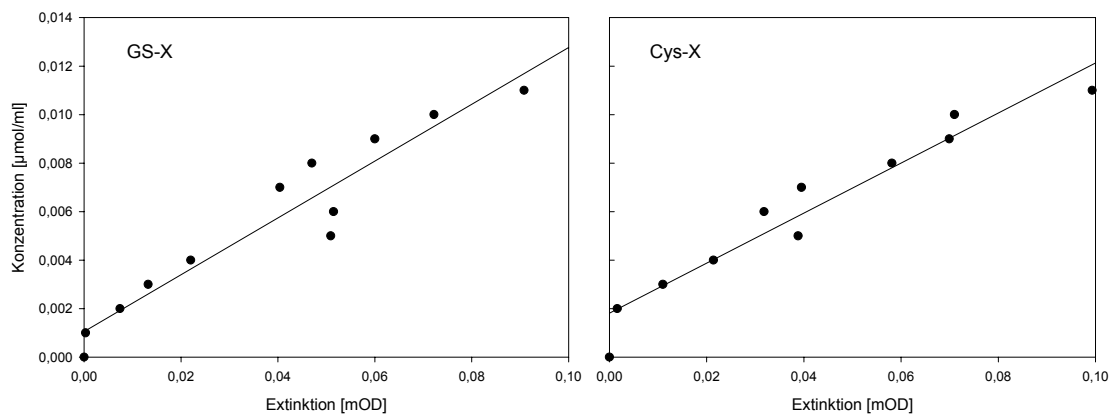
In vorläufigen, noch nicht publizierten Experimenten, stellte sich heraus, daß bei Applikation von 100 mM  $\text{K}^+$  Zellen der Kalyptra von *Lepidium sativum* sofort mit einer vollständigen De-

polarisation auf 0 mV reagierten. Die gleichzeitigen Änderungen von Membranspannung und -widerstand sowie eine Berechnung aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen des spezifischen Widerstands im depolarisierten Zustand, legten die Schlußfolgerung nahe, daß die symplastischen Verbindungen der Kalyptrazellen unterbrochen waren (persönliche Mitteilung, H. Lühring 2004).

Es wurden stets zwei PITMAN-Kammern parallel gestartet, damit mit identischem Pflanzenmaterial der Transport des GSH-Konjugates und Cystein-Konjugates festgestellt werden konnte. Im Falle der Hemmung mit KCl diente eine Kammer als unbeeinflusste Kontrolle. Um die Hemmung langfristig zu überprüfen, wurde die Probenahme am nächsten Tag fortgesetzt. In Kompartiment A befand sich das zu transportierende Konjugat. Es wurden jeweils 60 mM GSH bzw. Cys (in 10 ml Puffer) und 30 mM CDNB (in 5 ml Ethanol) gemischt, so daß sich eine theoretische Endkonzentration von 10 mM Konjugat ergab. Der Ansatz wurde 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Damit sich eine intensive Gelbfärbung, die den Erfolg der Konjugation anzeigt, einstellte, wurden noch einige Tropfen  $\text{NH}_3$  zugegeben.

Die Probenahme erfolgte alle 20 min. aus Kompartiment C. Es wurden in dreifacher Wiederholung Volumina von 150  $\mu\text{l}$  entnommen und bei 340 nm der Konjugatgehalt photometrisch bestimmt.

Für die Quantifizierung der transportierten Konjugate wurde für jedes Konjugat eine Kalibriergerade erstellt (Abb. 15). Die Konjugate wurden dafür zunächst im Verhältnis 1:100 mit Puffer verdünnt und dann für jeden Kalibrierpunkt von 5 bis 50  $\mu\text{l}$  auf 500  $\mu\text{ml}$  aufgefüllt. Über die Steigung der ermittelten Kalibriergeraden konnte die Menge des Konjugates in Kammer C errechnet werden.



**Abb. 15:** Beispiele für eine Kalibriergerade von GS-X und Cys-X. Die Formel zur Berechnung der GS-X-Menge lautet  $y=0,1172x+0,0012$ . Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  beträgt 0,9176. Die Formel zur Berechnung der Cys-X -Menge lautet  $y=0,1031x+0,0018$  mit einem Bestimmtheitsmaß von  $r^2 = 0,9423$ .

Die Unterschiede in den Transportgeschwindigkeiten der einzelnen Substanzen lassen sich mit dem BUNSEN'sches Effusionsgesetz beschreiben (Formel 1; Gerthsen et al. 1982).

Formel 1 
$$v_1 / v_2 = \sqrt{m_2 / m_1}$$

$v_n$  Geschwindigkeit von Konjugat n  
 $m_n$  Masse von Konjugat n [g/mol]

## 4 Pflanzen

### 4.1 Einfluß von Thiol-Konjugaten und *Serratia liquefaciens* auf transformierte Meerrettichwurzeln (*Armoracia rusticana*)

Sollte tatsächlich eine Beeinflussung der Bodenlebewelt durch die Herbizid-Metabolite vorliegen, so ergibt sich daraus, daß diese veränderte Mikroflora ihrerseits wieder die Pflanzen beeinflusst.

Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurden transformierte Meerrettichwurzeln verwendet.

Ein Teil der Wurzeln blieb steril, zu einem anderen Teil wurden 10 ml einer *Serratia liquefaciens* Kultur gegeben. Nachdem sich die Bakterien in der Wurzelkultur etabliert hatten, wurde allen Wurzeln je 0,5 ml der Xenobiotika-Metabolite in Form von GS-X bzw.  $\gamma$ GC-X bzw. Cys-X zugegeben. Für diesen Versuch wurden 120 mM einer wäßrigen Thiol-Lösung (GSH,



$\gamma$ GC, Cys) mit 60 mM CDNB (gelöst in Ethanol) unter Zugabe von 200  $\mu$ l  $\text{NH}_3$  gemischt, bis eine deutliche Gelbfärbung eintrat (Lamoureux & Rusness 1989).

Nach 0/3/6/9/24 Std. der Konjugat-Inkubation erfolgte die Probenahme, indem die Wurzeln in flüssigem Stickstoff schockgefrostet wurden. Die Extraktion der Proteine sowie die anschließenden Enzymtests verliefen nach den in Kap. 4.3 angegebenen Methoden.

## **4.2 Entgiftungsenzyme in mykorrhizierten Pflanzen**

### **4.2.1 Extraktion pflanzlicher Entgiftungsenzyme**

Die Extraktion der Enzyme aus pflanzlichem Material wurde nach dem Protokoll von Schröder et al. (1990) durchgeführt. Zunächst wird das Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff pulverisiert und 30 min. im Extraktionspuffer im Verhältnis 1:10 homogenisiert. Dieser Puffer besteht aus 0,1 M Kaliumphosphat mit pH 7,5 und enthält 5 mM EDTA, 5 mM DTE, 1% Nonidet P40 und 1 % PVP K30. Anschließend wird 30 min. bei 15.500 rpm (15.500 g) und 4 °C zentrifugiert.

Das Pellet wird verworfen, mit dem Überstand wird eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt.

### **4.2.2 Ammoniumsulfat-Fällung**

Die fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung wird in zwei Schritten durchgeführt (Jaenicke 1984). Im ersten Schritt werden zu der Probe 40%  $\text{NH}_3(\text{SO}_4)_2$  gegeben und 30 min. auf Eis gerührt. Die Salzmenge wird dabei nach Formel 2 bestimmt. Bei der nachfolgenden Zentrifugation (30 min. bei 20.000 g und 4 °C) werden die ersten unerwünschten Proteine aus der Probe entfernt. Mit dem Überstand wird der zweite Schritt durchgeführt. Es wird noch einmal Ammoniumsulfat zugegeben und 30 min auf Eis gerührt, so daß sich eine Endkonzentration von 80% ergibt (Formel 2). Auch hier wird wieder zentrifugiert.

Dann wird allerdings der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 2,5 ml KPP-Puffer (25 mM, pH 7,5) resuspendiert und mittels PD-10-Gelfiltrationssäulen mit Sephadex G 25 (Supelco) entsalzt. Die Proben wurden in Portionen zu 500  $\mu$ l in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die weitere Verwendung bei -80 °C gelagert.

$$\text{Formel 2} \quad NH_3(SO_4)_2 [g] = \frac{V * 1,77 * (S - s)}{3,54 - S}$$

V Volumen der Lösung (ml)  
 S gewünschte Konzentration an Ammoniumsulfat (als Dezimalbruchteil von 1)  
 s vorgelegte Konzentration an Ammoniumsulfat (als Dezimalbruchteil von 1)

### 4.3 Charakterisierung der Entgiftungsenzyme in Pflanzen und Pilzen

#### 4.3.1 Glutathion-S-Transferasen (GST)

Die Glutathion-S-Transferasen (im Folgenden GSTs) umfassen eine sehr große Gruppe an Enzymen, die ein breites Spektrum an Substraten umsetzen können. Aus der Literatur sind etwa 100 verschiedene Substrate bekannt (Habig et al. 1974; Lamoureux & Rusness 1993; Hayes & Pulford 1995; Marrs 1995; Schröder & Wolf 1996). Von diesen wurden einige ausgewählt, um die Entgiftungskapazität der verschiedenen Proben zu charakterisieren.

Die GST-Aktivität der Proben wurde in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer (KPP) mit pH 6,4 gemessen, dem 1 mM GSH-Lösung (in H<sub>2</sub>O) und 1 mM Substrat (in Ethanol) zugegeben wurden.

Die Messung erfolgte bei verschiedenen Wellenlängen in Abhängigkeit vom Substrat (Tab. 5) bei Raumtemperatur mit einem Beckman/Coulter Photometer.

**Tab. 5:** Bei den Enzymtests verwendete Substrate, die Wellenlänge, bei denen der Umsatz gemessen wird sowie der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$ .

Substrat	Abk.	Wellenlänge [nm]	Extinktionskoeffizient $\epsilon$ [1/mM*cm]
Chlordinitrobenzol	CDNB	340	9,6
Dichlornitrobenzol	DCNB	345	8,5
p-Nitrobenzylchlorid	p-NBC	310	1,8
p-Nitrobenzoylchlorid	p-NBOC	310	1,9
Fluorodifen	F	330	3,1

### 4.3.2 Glutathion-Reduktase (GR)

Weiterhin wurde die Aktivität der Glutathion-Reduktase gemessen. Dabei wurde das Protokoll von Stýblo & Thomas (1995) verwendet. Grundlage des Tests ist die Oxidation von NADPH während der Reduktion von GSSG.

In 0,1 m Tris/HCl-Puffer mit pH 7,5 werden 6 mM EDTA und 0,23 mM NADPH zugegeben. Als Substrat diente 0,1 mM GSSG.

Die Enzymaktivität wird im Photometer bei 340 nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  beträgt 6,22.

### 4.3.3 Peroxidasen (POX)

Neben den GSTs wurde auch die Aktivität einer Peroxidase in den Proben bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot in TRIS/HCl-Puffer (50 mM, pH 6,0) gegeben. Als Substrat diente 3,4 mM Guajacol, dem 0,9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben wurden. Der enzymatische Umsatz wurde im Photometer bei 420 nm über 5 min. verfolgt.

### 4.3.4 Bestimmung des Proteingehalts

Die Proteinmenge der einzelnen Proben wurde mit der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Die im Verhältnis 1:10 verdünnte Testlösung (BioRad) wird mit einem Aliquot der Proben 10 min. inkubiert und im Photometer bei 595 nm gemessen. Über eine Kalibriergerade, der als Standard Rinderserumalbumin zugrunde lag, wurde die Proteinmenge errechnet (Abb. 16).

Diese Messungen wurden mit einem SpektraMax plus 384 der Fa. Molecular Devices und der dazugehörigen Software SoftmaxPro 4.6 durchgeführt.

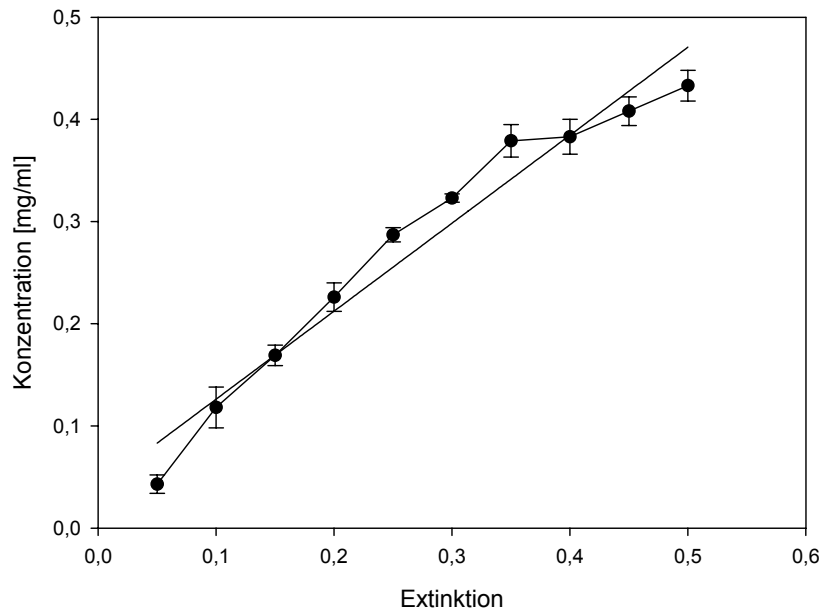


Abb. 16: Beispiel für eine Kalibriergerade zur Bestimmung des Proteingehaltes der Proben. Die zugehörige Formel lautet  $y = 0,8612x + 0,04$ . Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  beträgt 0,96.

#### 4.3.5 Berechnung der Enzymaktivität

Für die Berechnung der spezifischen Enzymaktivitäten wurde Formel 3 verwendet (Boehringer 1973). Der eingesetzte, spezifische Faktor  $F$  ermittelt sich aus den jeweiligen Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  (Tab. 5) nach Formel 4.

Formel 3: Spezifische Aktivität (Spez. A) 
$$\text{Spez. A} [\mu\text{kat} / \text{mg}] = \frac{\text{Rates} * F}{\text{Protein}}$$

Formel 4: Spezifischer Faktor F 
$$F [\mu\text{kat} / \text{ml}] = \frac{V * 1000}{v * t * p * \varepsilon}$$

V = Endvolumen des Tests

v = Probenvolumen im Test

$\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient (spezifisch für Substrat)

p = Schichtdicke (path)

t = Zeit in s (rates/min = 60s)

## 5 Mikroorganismen

### 5.1 Pilzliches Wachstum auf festem Medium

Um die Wirkung der Konjugate auf verschiedene Bodenpilze zu untersuchen, wurde der tägliche radial Zuwachs bei Anwesenheit der Konjugate gemessen.

Dazu wurde auf den Malzextrakt-Agar das GSH-Konjugat (Synthese vgl. Kap. 4.1) gegeben. Dieses wurde verdünnt ( $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$ ), mit einem Spritzenfilter steril filtriert und in 4facher Wiederholung auf die Platten gegeben (0,5 ml auf 25 ml Medium). Da die Lösung über Nacht in die Medien diffundieren konnte, wird von einer homogenen Verteilung der Konjugate auf den Platten ausgegangen.

Auf diese Platten wurden die Pilze überimpft, bei Raumtemperatur inkubiert und der tägliche radiale Zuwachs an vier Stellen pro Platte über Kreuz gemessen.

### 5.2 Entgiftungsenzyme in Pilzen

Zu den Pilzen wurde je 1 ml GS-X, Cys-X und reines CDNB in jeweils 2 Konzentrationen gegeben. Die Konjugate wurden wie in Kap. 4.1 beschrieben hergestellt. Die einzelnen Varianten wurden in 5facher Wiederholung angesetzt, damit zu den unterschiedlichen Zeiten frische Proben entnommen werden konnten.

Nach 0/3/6/9/24 Std. wurde das Medium durch Filtration vom Pilzmaterial getrennt.

Die Enzym-Extraktion aus Pilzen wurde nach dem Protokoll von Bieber (2000) durchgeführt. Zunächst wird das Pilzmaterial mit flüssigem Stickstoff pulverisiert und 10 min. im Extraktionspuffer im Verhältnis 3:1 homogenisiert (Bieber 2000). Dieser Puffer besteht aus 0,1 M Natriumphosphat mit pH 7,5 und enthält 20% Glycerin, 1,4 mM EDTA, 1,4 mM DTE und 1 mM PMSF. Anschließend wird 10 min. bei 15.500 rpm (15.500 g) und 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wird auf Eis gelagert, mit dem Pellet werden diese zwei Schritte wiederholt.

Der Überstand wird zu der ersten Fraktion gegeben, beides wird 90 min. bei 15.500 rpm (15.500 g) und 4 °C zentrifugiert.

Mit dem Überstand wird eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt (Kap. 4.2.2).

Die Enzymmessungen wurden wie in den Kap. 4.3 angegeben durchgeführt.

### 5.3 Bakterielleres Wachstum in Flüssigkultur unter Konjugat-Einfluß

Das Wachstum ausgesuchter Bodenbakterien (*Serratia liquefaciens*, *Burkholderia cepacia* und *B. sacchari*) unter Zugabe von Thiol-Konjugaten wurde nach dem Protokoll von Elbing & Brent (2002) durchgeführt. Dazu wurde 1 ml Bakteriensuspension einer Übernacht-Kultur zu je 100 ml sterilem LB-Medium gegeben. Das LB-Medium bestand aus 10g Pepton aus Casein, 5g Hefeextrakt und 10g NaCl, alles gelöst in 1L H<sub>2</sub>O.

Für die Behandlungen wurden Lösungen der GSH- und Cys-Konjugate sowie pure CDNB-Lösung (alles steril filtriert) in zwei Konzentrationen (90 und 9 mM) zugegeben. Die Kolben wurden dann bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Im Abstand von 3 Std. wurde das Wachstum bestimmt, indem unter der Impfbank 3mal 200 µl Medium pro Kolben entnommen und bei 600 nm im Photometer gemessen wurden. Anschließend wurde die Extinktionsänderung zwischen den Meßzeitpunkten errechnet und in ein Diagramm eingetragen. Die Extinktionsänderung über die Zeit ist ein Maß für das Wachstum der Kultur.

### 5.4 BIOLOG

Der Einfluß der Thiol-Konjugate auf das bakterielle Wachstum wurde außerdem mit Hilfe des sog. BIOLOG®-Systems untersucht. Der BIOLOG® Versuch ist ein Substrat-Nutzungstest, bei dem 95 verschiedene Substrate (und Wasser) in einer 96well-Platte einem Organismus angeboten und verstoffwechselt werden. Ist der Organismus in der Lage, das Substrat umzusetzen, erfolgt ein Farbumschlag. Dieser wird photometrisch gemessen.

Die Beeinflussung der Thiol-Konjugate wurde überprüft, indem diese mit den Organismen gemeinsam in die Testplatten gegeben wurde. Ein Vergleich mit den unbehandelten Platten sollte die Wirkung der Konjugate auf das Wachstum aufzeigen.

Das BIOLOG®-System ist ein von der Firma oxoid entwickeltes Verfahren zur Identifizierung von Bakterien und neuerdings auch Pilzen. Hauptkomponente des Systems sind spezielle Versuchsplatten, die mit 95 verschiedenen Substraten aus 6 chemischen Gruppen belegt sind (Abb. 17 und Abb. 18). Wird ein Substrat metabolisiert und kommt es so zu einer Vermehrung der Bakterien, verfärbt

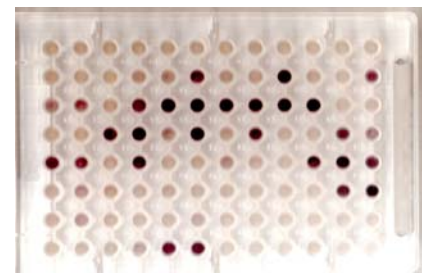


Abb. 17: BIOLOG® Micro-Plate

sich das betreffende well der Platte rot-violett. Auf diese Weise entsteht ein Muster, das auf

Artebene für jedes Bakterium charakteristisch ist. Anhand dieses Musters ist eine Identifizierung von unbekanntem Organismen möglich.

Um die Farbumschläge der einzelnen Wells detailliert unterscheiden zu können, werden die Microplates in einem Platerreader (Fa. Molecular devices) bei 590 nm Wellenlänge gelesen.

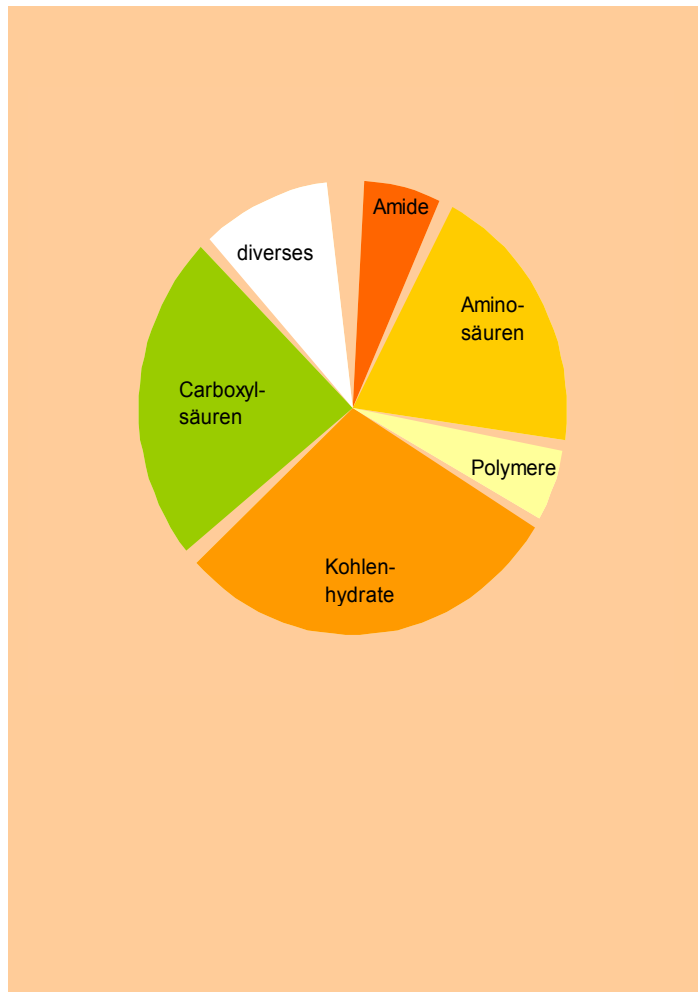
Das BIOLOG®-System eignet sich sehr gut, um mikrobielle Gemeinschaften zu charakterisieren (Hitzl et al. 1997). Schon lange werden damit Einflüsse durch landwirtschaftliche Kulturmaßnahmen (Fließbach & Mäder 1997, zitiert nach Hitzl et al. 1997), Schwermetalle (Fritze et al. 1997, zitiert nach Hitzl et al. 1997) oder Bodenremediation (Wünsche et al. 1995, zitiert nach Hitzl et al. 1997) gemessen.

#### **5.4.1 BIOLOG mit Bodenbakterien (Kontrollplatten)**

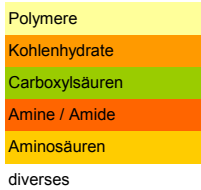
Es wurden zunächst die charakteristischen, unbeeinflussten Färbemuster von den Bakterien *Serratia liquefaciens*, *Burkholderia cepacia* und *B. sacchari* ermittelt. Dazu wurde jedes dieser gram-negativen Bakterien nach dem Standardprotokoll der Fa. oxoid auf BIOLOG-Universal-Growth (BUG) Medium über Nacht kultiviert (oxoid 2001).

Der entstandene Bakterienfilm wurde mit einem sterilen Glasspatel abgekratzt und in 100 ml des sterilen Puffers (Inoculating fluid von oxoid) gegeben. Diese Suspensionen (pro Organismus dreimal 100 ml) wurden dann in die Microplates pipettiert (100 µl pro well, je drei Platten pro Organismus und Behandlung).

Anordnung der chemischen Gruppen der BIOLOG®-Platten in den Diagrammen (rechts).



Belegung der wells mit den C-Substraten (unten).



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Water	$\alpha$ -Cyclodextrin	Dextrin	Glycogen	Tween 40	Tween 80	N - Acetyl - D - galactosamine	N - Acetyl - D - glucosamine	Adonitol	L - Arabinose	D - Arabitol	D - Cellobiose
B	i - Erythritol	D - Fructose	L - Fructose	D - Galactose	Gentiobiose	$\alpha$ - D - Glucose	m - Inositol	$\alpha$ - D - Lactose	Lactulose	Maltose	D - Mannitol	D - Mannose
C	D - Melibiose	$\beta$ - Methyl - D - Glucoside	D - Psicose	D - Raffinose	L - Rhamnose	D - Sorbitol	Sucrose	D - Trehalose	Turanose	Xylitol	Methyl Pyruvate	Mono - Methyl - succinate
D	Acetic Acid	Cis - Aconitic Acid	Citric Acid	Formic Acid	D - Galacturonic Acid Lactone	D - Galacturonic Acid	D - Gluconic Acid	D - Glucosaminic Acid	D - Glucuronic Acid	$\alpha$ - Hydroxy Butyric Acid	$\beta$ - Hydroxy Butyric Acid	$\gamma$ - Hydroxy Butyric Acid
E	p - Hydroxy Phenylacetic Acid	Itaconic Acid	$\alpha$ - Keto Butyric Acid	$\alpha$ - Keto Glutaric Acid	$\alpha$ - Keto Valeric Acid	D, L - Lactic Acid	Malonic Acid	Propionic Acid	Quinic Acid	D - Saccharic Acid	Sebacic Acid	Succinic Acid
F	Bromo Succinic Acid	Succinamic Acid	Glucuronamide	L - Alaninamide	D - Alanine	L - Alanine	L - Alanyl - glycine	L - Asparagine	L - Aspartic Acid	L - Glutamic Acid	Glycyl - L - Aspartic Acid	Glycyl - L - Glutamic Acid
G	L - Histidine	Hydroxyl - L - Proline	L - Leucine	L - Ornithine	L - Phenylalanine	L - Proline	L - Pyroglutamic Acid	D - Serine	L - Serine	L - Threonine	D,L - Carnitine	$\gamma$ - Amino Butyric Acid
H	Urocanic Acid	Inosine	Uridine	Thymidine	Phenylethylamine	Putrescine	2 - Aminoethanol	2,3 - Butanediol	Glycerol	D,L - $\alpha$ - Glycerol Phosphate	Glucose - 1 - Phosphate	Glucose - 6 - Phosphate

Abb. 18: Belegung der BIOLOG® Micro-Plates.



#### 5.4.2 BIOLOG mit thiolischen Konjugaten („Parent Mix“)

Der eigentliche Versuch bestand nun darin, das Wachstum der Bakterien unter Konjugat-Einfluß zu bestimmen. Es wurden hierfür 0,307 g GSH bzw. 0,121 g Cys bzw. 0,025 g  $\gamma$ GC in jeweils 7,3 ml Puffer (Tris/HCl, pH 7,8) gelöst und mit jeweils 0,183 g CNBD (gelöst in 2,7 ml Ethanol) versetzt. Bei erfolgreicher Konjugation erhält man 10 ml einer 90 mmol Lösung, die eine deutliche Gelbfärbung aufweist. Die Lösungen wurden bei der Zugabe zu den Bakterien-Suspensionen steril filtriert.

Um unterschiedliche Konjugat-Konzentrationen, aber immer mehr oder weniger konstante Bakterien-Mengen zu erlangen, wurden in die verbleibenden Bakterien-Suspensionen (nachdem die Kontrollplatten pipettiert waren, vgl. Kap. 5.4.1) zunächst 0,5 ml Konjugat-Lösung gegeben. Diese Bakterium-Konjugat-Lösungen wurden in jeweils drei Platten gegeben.

Zu den wiederum verbleibenden Lösungen wurden nochmals 1,5 ml Konjugat gegeben, um eine höhere Konzentrationsstufe prüfen zu können. So ergab sich eine Konzentrationssteigerung um den Faktor 5. Auch diese Lösung wurde in dreifacher Wiederholung auf die Platten gegeben.

Die Platten wurden zu Beginn ( $t_0$ ), nach 3 Std. ( $t_3$ ) und nach 24 Std. ( $t_{24}$ ) Inkubation bei 590 nm Wellenlänge photometrisch gemessen.

#### 5.5 BIOLOG mit Thiolen

Zu Beginn der Versuche mit den BIOLOG®-Platten stand noch nicht fest, daß die Synthese der Konjugate stark Problem behaftet war; dies zeigte sich erst im Laufe der Zeit.

Darum wurde der Versuch mit den Reinsubstanzen, die in gewissem Maße schon in der ersten Versuchsreihe vorlagen und sicher einen entsprechenden Einfluß ausübten, wiederholt.

Der Einfachheit halber wurden die Bakterien zunächst in flüssigem LB-Medium (vgl. Kap. 5.3) über Nacht bei 30 °C im Schüttler kultiviert. So entfiel das mühsame Abkratzen der Bakterien von den BUG-Platten. Da in diesem standardisierten BUG-Medium schon Agar-Agar (oder ein anderes Festigungsmittel) enthalten ist, war eine Vor-Inkubation in flüssiger Form dieses Mediums nicht möglich.

In 80 ml BIOLOG® Inoculating fluid wurden 2,5 ml Bakterien-Suspension gegeben. Für die erste Konzentration wurden dann 0,5 ml steril filtrierte Thiol-Lösung gegeben. Diese bestand aus 0,122 g GSH bzw. 0,1 g  $\gamma$ GC bzw. 0,048 g Cys gelöst in 2,9 ml Puffer (Tris/HCl 0,1 M, pH 7,8) und 1,1 ml Ethanol.

Nach Pipettieren der ersten drei Platten wurden in die verbleibende Lösung weitere 1,5 ml Thiol-Lösung gegeben, um eine weitere Konzentration zu testen.

Alle Platten wurden bei 590 nm nach 0/3/6/24 Std. im Photometer gemessen.

### 5.6 BIOLOG mit Modell-Xenobiotika

In dieser Versuchsreihe sollte der Einfluß von GSH-konjugierbaren Xenobiotika festgestellt werden. Dazu wurden allerdings keine PSM aus der Praxis eingesetzt, sondern die phenolischen Modell-Xenobiotika CDNB (Abb. 19) und DCNB (Abb. 20).

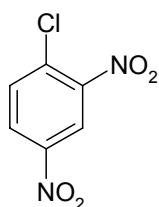


Abb. 19: 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB)

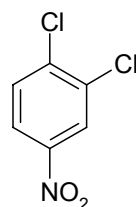


Abb. 20: 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol (DCNB)

Es wurden 0,073 g CDNB und 0,069 g DCNB in jeweils 1,1 ml Ethanol und 2,9 ml Puffer (Tris/HCl 0,1 M, pH 7,8) gelöst, so daß sich eine Endmolarität von 10 mM ergab.

Diese Lösungen wurden, wie schon in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben (Kap. 5.4.2), zu den Bakterien-Suspensionen gegeben.

### 5.7 BIOLOG mit aufgereinigtem GS-DNB

Schließlich konnte aufgereinigtes GS-DNB zu den Bakterien gegeben werden. Durch die Aufreinigung mit den SPE-Säulen (vgl. Kap. 2) enthielt die Lösung kein freies Thiol (GSH) und kein freies Xenobiotikum (CDNB) mehr, sondern nur noch das Konjugat. Die 10 mM Lösung wurde in bekannter Weise zugegeben (Kap. 5.4.2).

## 5.8 Auswertung und Darstellung der BIOLOG®-Ergebnisse

### 5.8.1 Klassische Auswertung

Die klassische Auswertung der BIOLOG®-Platten sieht eine Anwendung der Formel von Garland & Mills (1991) vor. In einem ersten Berechnungsschritt wird die Summe aller Meßwerte einer Platte abzüglich des internen Plattenblanks ( $A1 = H_2O$ ) gebildet, die per Division mit 95 für die gesamte Platte gemittelt wird (Formel 5). Auf diese Weise erhält man einen Platten-spezifischen Standard, der von Garland & Mills als average well colour development (AWCD) bezeichnet wird (Garland & Mills 1991).

$$AWCD = \frac{\sum C - R}{95}$$

**Formel 5: Berechnung des AWCD mit C = Behandlung und R = interner Plattenblank.**

Die eigentlichen Meßwerte der Platten (abzüglich des Blanks) werden dann in einem zweiten Schritt ins Verhältnis zu diesem Standard gesetzt (Formel 6).

$$y = \frac{C - R}{AWCD}$$

**Formel 6: Verrechnung der Meßwerte**

Werte  $> 1$  weisen auf eine Wachstumsförderung hin, Werte  $< 1$  stehen für ein gehemmtes Wachstum.

Die statistische Auswertung erfolgt zweckmäßigerweise mit einer Hauptkomponenten-Analyse (Garland & Mills 1991). Diese wurde mit SPSS durchgeführt.

### 5.8.2 Modifizierte Auswertung

Zunächst wurde die Extinktionsänderung über die Zeit für jedes well bestimmt und aus den drei Microplates einer Behandlung gemittelt. Diese Werte wurden dann für jeden Organismus getrennt ins Verhältnis zu den Werten der jeweiligen unbehandelten Platte gesetzt (Formel 7).

$$\Delta E = \Delta E_{t=3h} - \Delta E_{t=0h}$$

$$y = \frac{\Delta E_{\text{Behandlung}}}{\Delta E_{\text{Kontrolle}}}$$

#### Formel 7: Berechnung der Extinktionsänderung E

Für eine grafische Darstellung der Ergebnisse wurden die Substrate der Platte ihrer chemischen Gruppen nach sortiert.

Der Blank über alle 96 wells, als Verhältnis zu sich selbst und damit 1, wurde als roter Ring im Diagramm abgebildet. Die Werte der Behandlungen wurden gemäß ihrer Höhe in das Diagramm eingetragen.

Meßwerte, die über denen des Blanks liegen und so als Produkt  $> 1$  ergeben, stehen außerhalb des Ringes. Sie bedeuten eine Förderung des bakteriellen Wachstums in dem jeweiligen well. Extinktionsänderungen unterhalb des Blanks, also  $< 1$ , wurden innerhalb des Ringes eingetragen und verweisen auf eine Wachstumshemmung.

## 6 Toxintest mit Tomaten

Die Toxizität der Konjugate wurde mit einem Toxintest nach Nienhaus (1969) überprüft.

Tomatenpflanzen gelten als extrem empfindlich, weshalb sie häufig als Indikatoren eingesetzt werden. Durch ihren starken Turgorstrom nehmen sie große Mengen Flüssigkeit auf. Sind in dieser Flüssigkeit phytotoxische Substanzen enthalten, reagieren die Tomatenstecklinge mit Schadsymptomen wie Welke, Chlorose und Nekrose. Je nach Toxizität der Substanzen sind die Symptome unterschiedlich stark ausgeprägt.

Alle Pflanzen (Stecklinge und bewurzelte Pflanzen) wurden über 10 Tage beobachtet und die Reaktionen nach dem Schema in Tab. 6 bonitiert. Während der Beobachtungsphase wurden die Pflanzen mit Leitungswasser gegossen.

**Tab. 6: Boniturschema für den Toxintest**

<b>Boniturstufe</b>	<b>Welke</b>	<b>Chlorose</b>	<b>Nekrose</b>
0 gesund	keine Symptome	keine Symptome	keine Symptome
1 leicht	leichtes Einrollen vereinzelter Blätter	Blattadern vergilben (Aderchlorose)	leichte Schwärzung am Blattrand
2 mäßig	mäßige Welke	Chlorose greift bereits auf Interkostalfelder über	Interkostalfelder betroffen
3 stark	gesamte Pflanze vertrocknet	alle Blätter sind vollständig verfärbt	alle Blätter sind vollständig nekrotisch

Da es sich bei den Boniturergebnissen um ordinale Daten handelt, ist eine mathematisch-statistische Auswertung im klassischen Sinne (z. B. t-Test) nicht möglich (Lorenz 1992).

Für die Auswertung der Daten wurden zunächst die täglichen Boniturergebnisse für jede Behandlung einzeln gemittelt. So ergab sich die tägliche mittlere Boniturstufe als Durchschnitt von 10 Pflanzen. Diese mittleren Boniturstufen wurden in ein Diagramm eingetragen, um die Entwicklung des jeweiligen Symptoms über die Zeit graphisch darstellen zu können.

Weiterhin wurde in den Tomatenpflanzen die Entgiftungskapazität über die Ausstattung mit verschiedenen Enzymen bestimmt. Dazu wurden Blätter von Tomatenpflanzen für 24 Std. in 1,5 und 15 mM Konjugat-Lösungen (GHS und Cys) sowie CDNB-Lösungen gestellt.

Die Extraktion der Enzyme erfolgte nach der in Kap. 4.2 angegebenen Methoden. Die Aktivitäten wurden mit den üblichen Substraten ermittelt (Kap. 4.3).

### III Ergebnisse

#### 1 Synthese

Für die Durchführung der Versuche wurden größere Mengen GSH-Konjugat und dessen Metabolite ( $\gamma$ GC-X und Cys-X) benötigt, die je nach Bedarf selbst synthetisiert werden mußten.

Aus der Literatur sind verschiedene Ansätze und Synthese-Protokolle bekannt (vgl. Kap. II2), die sich teilweise widersprechen oder unzulänglich sind, da sie nur die Synthese eines einzigen Konjugates erlauben und keine Aussage darüber treffen, ob das Protokoll auch auf andere Konjugate anwendbar ist. Einzelheiten dazu siehe Kap. II2.

Um eine weitgehend einheitliche Synthese mit hoher Ausbeute zu erlangen, wurden verschiedene Methoden getestet und optimiert.

##### 1.1 Einfluß des pH-Wertes auf die Konjugation

Die höchsten Konjugationsraten von GSH und CDNB werden im pH-Bereich von 7,8 erreicht, ähnlich gut ist die Konjugation bei pH 7,5 (Tab. 7).

Im sauren Milieu erfolgt keine nennenswerte Konjugation, ebenso bei sehr hohen pH-Werten. Offenbar hat auch die chemische Zusammensetzung des Puffers einen Einfluß. Im 0,1 M NaPP-Puffer ist die Konjugationsrate höher als in Tris/HCl-Puffer mit gleichem pH-Wert. Ähnliches zeigt sich für den Vergleich zwischen KPP (0,1 mM) und Tris/HCl. Die Konjugationsraten sind in KPP etwas höher als in Tris/HCl.

Die höchste Konjugationsrate für  $\gamma$ GC und CDNB läßt sich in destilliertem Wasser mit einem pH-Wert von  $\sim 5$  messen (Tab. 7).

Gute Erfolge lassen sich auch mit basischem Borat-Puffer (pH 8,2) erzielen. Meßbare Konjugation findet auch bei pH-Werten zwischen 7,5 und 7,8 statt, jedoch nicht im sauren Milieu (Tab. 7).

Cystein und CDNB konjugieren am besten bei einem pH-Wert von 7,5 (Tab. 7). Vergleichbar gut ist die Konjugation auch in dem zuckerhaltigen Transportmedium aus den Versuchen mit der PITMAN-Kammer (vgl. Kap. II3) mit einem pH-Wert von  $\sim 10$ .

Ähnlich wie bei dem Glutathion-Konjugat ist ein Einfluß der chemischen Zusammensetzung des Puffers festzustellen. Auch das Cystein konjugiert in phosphathaltigem Puffer besser mit CDNB als in Tris/HCl mit gleichem pH-Wert.

Anders als bei den übrigen Co-Substraten findet auch noch eine Konjugation bei pH 6 statt, in saurem Milieu jedoch nicht mehr (Tab. 7).

**Tab. 7: Konjugationsraten [in dA/min] zwischen den Thiolen GSH,  $\gamma$ GC und Cys und dem Modell-Xenobiotikum CDNB in verschiedenen Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten und Konzentrationen.**

Puffer	Konzentration		GSH	$\gamma$ GC	Cys
	[M/L]	pH	Rate [dA / min]	Rate [dA / min]	Rate [dA / min]
NaPP	1	3,2	0	9,52	0
Acetat	0,1	4	13,76	2,14	7,35
CHES	0,0002	4,6	0	25,72	0
MES	0,025	5	9,93	2,33	13,47
H <sub>2</sub> O	-	6	2,64	1708,55	22,54
Tris/HCl	0,1	6	12,81	1,39	88,92
"	0,05	6	9,5	6,37	83,11
"	0,1	6,4	11,99	2,32	207,18
"	20	7,4	8,89	4,36	839,87
"	0,02	7,4	14,48	8,03	636,08
"	0,1	7,5	534,61	452,29	1685,08
NaPP	0,1	7,5	792,42	260,41	1935,89
Tris/HCl	0,1	7,8	915,16	299,08	0
KPP	0,1	7,8	1036,89	555,64	418,95
Borat	0,1	8,2	51,62	748,15	45,10
PITMAN A	-	10	16,52	3,37	1593,91
Tris/HCl + NH <sub>3</sub>	0,1	12	0	0	0
NaOH	1	14	0	0	0

Bei der Konjugation von Cystein mit CDNB ist allerdings ein wichtiger Aspekt zu beachten: das CDNB-Molekül kann sich sowohl mit der SH-Gruppe als auch mit der Aminogruppe mit dem Cystein verbinden. So kann neben dem S-Cystein- auch ein N-Cystein-Konjugat entstehen. Da letzteres nicht im pflanzlichen Stoffwechsel entsteht, gilt es bei der Synthese als un-

erwünschtes Nebenprodukt (Lamoureux & Rusness 1993), das die Lösung verunreinigt. Mit photometrischen Messungen läßt sich nicht bestimmen, welches der beiden Konjugate in der Lösung vorliegt.

Genauere Aussagen diesbezüglich lassen sich nur über chromatographische Analysen treffen, wobei die Möglichkeit besteht, daß die beiden Konjugate sehr ähnliche oder sogar gleiche Elutionseigenschaften aufweisen.

## **1.2 Einfluß von $\text{NH}_3$ -Lösung und Natronlauge auf die Konjugation**

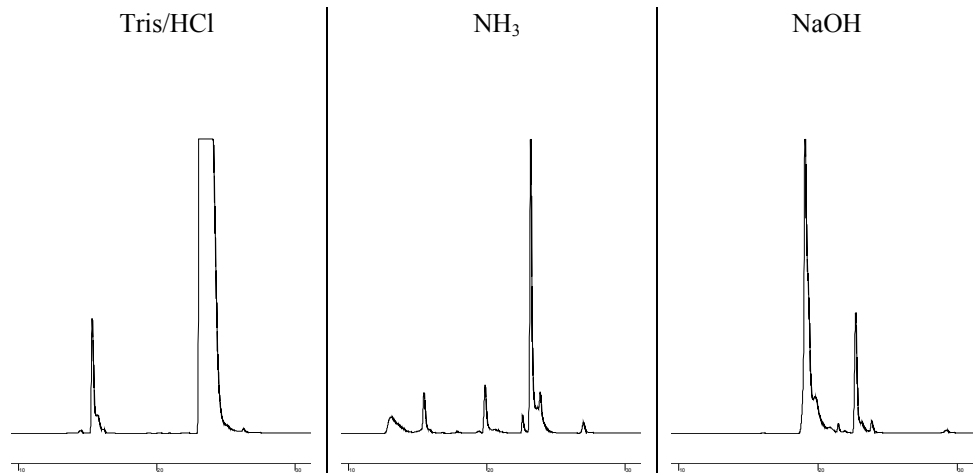
Der Einfluß von  $\text{NH}_3$  und  $\text{NaOH}$  auf die Konjugation wurde per HPLC untersucht. Auffallend war, daß die anfänglich zart gelbe Lösung nach  $\text{NH}_3$ -Zugabe rasch eine intensive Gelbfärbung annahm. Wurde statt dessen  $\text{NaOH}$  zugegeben, schlug die Farbe innerhalb kürzester Zeit nach braun um.

In den HPLC-Chromatogrammen der Proben, denen nichts zugegeben wurde, zeigten sich stets ein sauberer Konjugat-Peak und ein relativ großer Xenobiotika-Peak.

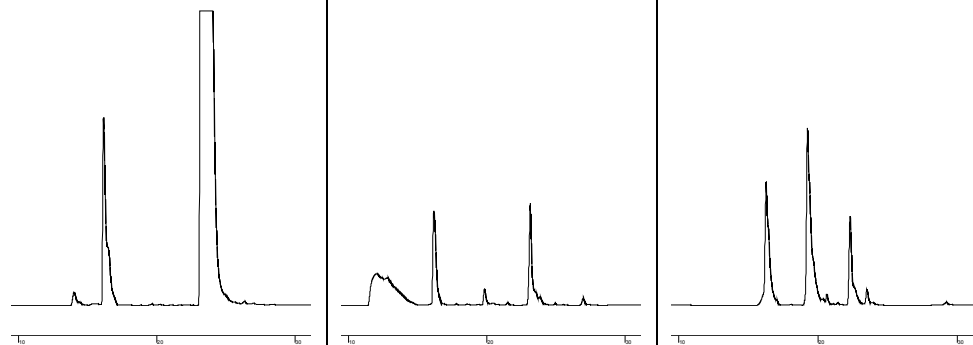
Erfolgt die Synthese unter Zugabe von  $\text{NH}_3$ , erscheinen viele Peaks in den Chromatogrammen. Durch Zugabe von  $\text{NaOH}$  erhält man einen großen Peak, bei dem es sich aufgrund der Retentionszeit nicht um das entsprechende Konjugat handeln kann. Da der CDNB-Peak sowohl in der  $\text{NH}_3$ - als auch in der  $\text{NaOH}$ -versetzten Lösung sehr klein ist, obwohl die Konzentration in allen Lösungen gleich war, muß es sich durch die Laugen stark verändert haben.



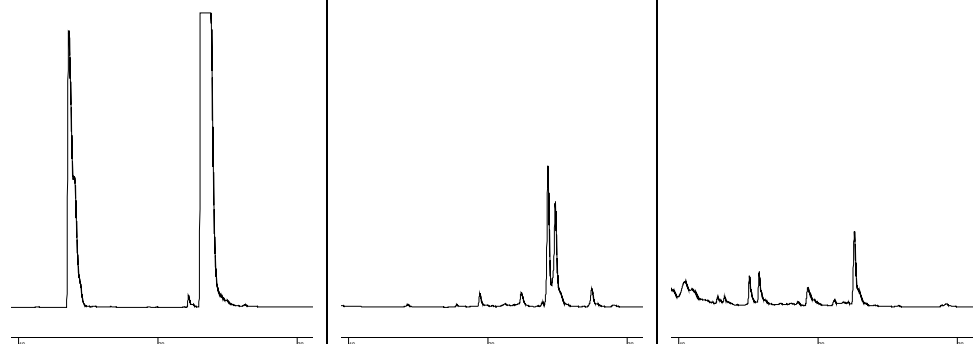
**Abb. 21: Konjugation von GSH und CDNB in Puffer (links),  $\text{NH}_3$  (Mitte) und NaOH (rechts)**



**Abb. 22: Konjugation von  $\gamma$ GC und CDNB in Puffer (links),  $\text{NH}_3$  (Mitte) und NaOH (rechts)**



**Abb. 23: Konjugation von Cys und CDNB in Puffer (links),  $\text{NH}_3$  (Mitte) und NaOH (rechts)**



### 1.3 Extinktionen der SPE-Fraktionen

Nachdem die GSH-Konjugate mit den SPE-Säulen aufgereinigt wurden, wurden die Extinktionen der einzelnen Fraktionen bei 340 nm gemessen. Es wurde deshalb die Wellenlänge 340 nm gewählt, da die Konjugate hier ihre Absorptionsmaxima haben (Habig et al. 1974).

Die höchsten Extinktionen werden jeweils in den Fraktionen 0 – 40 gemessen (Abb. 24 oben). Wurde der Lösung zuvor  $\text{NH}_3$  zugegeben, so zeigt auch die 80%-Fraktion starke Extinktion bei 340 nm.

Demnach ist das GS-DNB vor allem in den Fraktionen 0 – 40 enthalten, besonders dann, wenn die Probe  $\text{NH}_3$  enthielt. Hier scheint die Konjugation aber nur unvollständig abzulaufen, da sich in der 80%-Fraktion noch eine Substanz befindet, die bei 340 nm detektierbar ist. Dabei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um unkonjugiertes CDNB, das bei einer Konzentration von 80% Acetonitril bereits sehr gut gelöst ist.

Auffällig ist, daß die Konjugation von GSH und CDNB um ein Vielfaches höher ist als die zwischen CDNB und  $\gamma\text{GC}$  oder Cys.

Bei dem  $\gamma\text{GC}$ -DNB finden sich die Extinktionsmaxima hauptsächlich in den Fraktionen 40/60 und 90 (Abb. 24 Mitte). Dabei scheint es keinen Einfluß zu haben, ob den Lösungen  $\text{NH}_3$  zugegeben wurde oder nicht. Ein Einfluß des  $\text{NH}_3$  zeigt sich überwiegend in den Fraktionen 0 und 10. Nach  $\text{HN}_3$ -Zugabe findet sich hier ein Großteil der Konjugate.

Von den unbeeinflussten Cys-DNB-Fraktionen haben die Fraktion 30 und 100 die höchsten Extinktionen (Abb. 24 unten). Die Fraktionen der  $\text{NH}_3$  behandelten Probe haben ein recht eng eingegrenztes Maximum bei 55 – 60.

Es läßt sich zwar feststellen, in welchen Fraktionen ein Cys-Konjugat vorliegt. Aussagen darüber, ob es sich dabei um das S-Cys-DNB oder das N-Cys-DNB handelt, können jedoch nicht getroffen werden.

Da die beiden Substanzen unterschiedliche Absorptionsmaxima haben, könnte man über eine Änderung der Wellenlänge eine Aussage treffen. Da das Absorptionsmaximum seinerseits aber abhängig von der Lösung ist, in der die gesuchten Substanzen gelöst sind, ist diese Möglichkeit nur bedingt zielführend. Nachteilig ist auch, daß die Maxima im Spektrum sehr dicht beieinander liegen (340 und 360 nm). Eine klar getrennte Detektion ist damit nicht möglich.

Ein Test brachte nur marginale Unterschiede. Der resultierende Verlauf der Kurven war identisch.

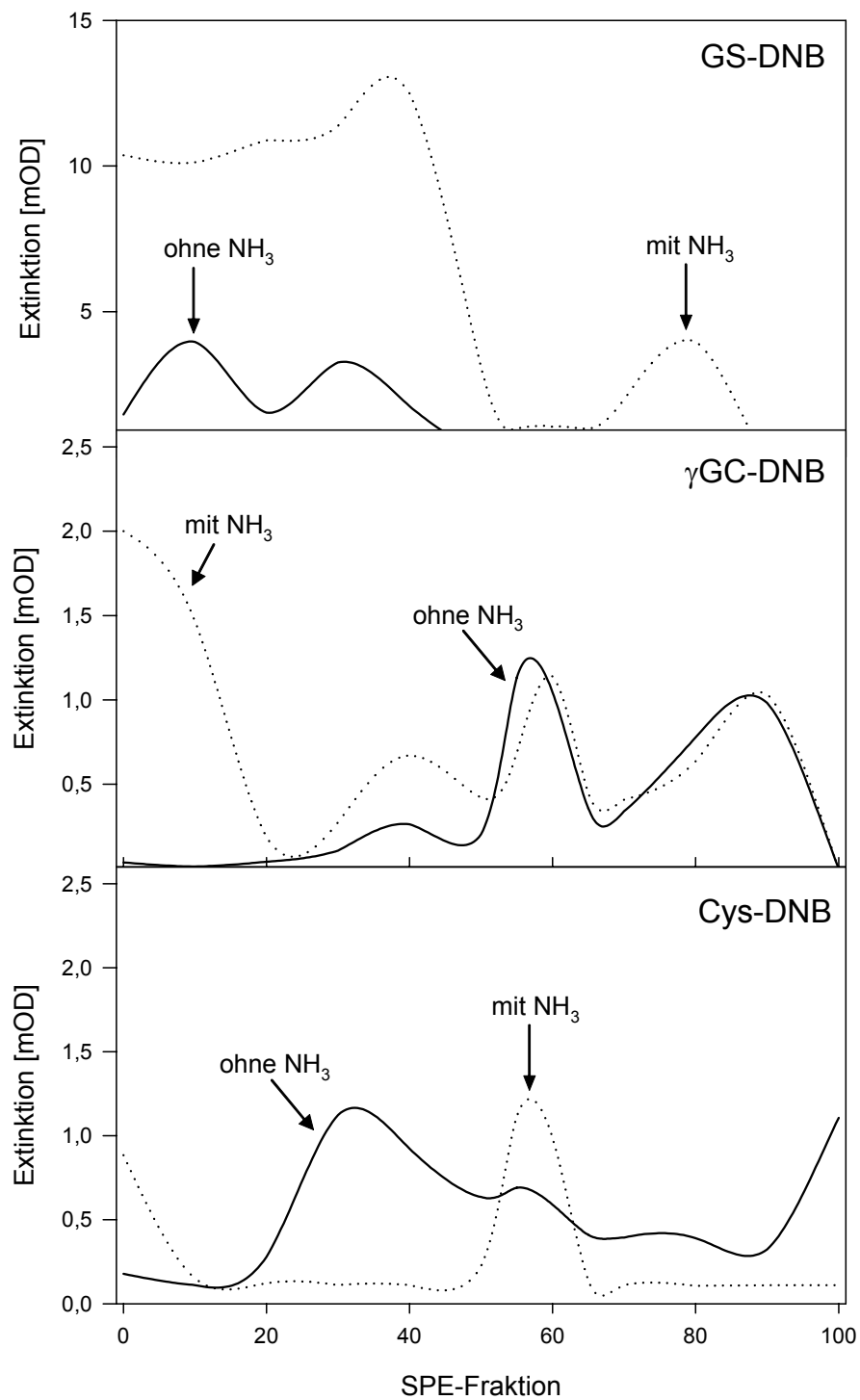


Abb. 24: Extinktionen [mOD] der SPE-Fractionen von GS-DNB (oben),  $\gamma$ GC-DNB (Mitte) und Cys-DNB (unten) im Photometer gemessen bei 340 nm, Schichtdicke 1 cm. Die durchgezogene Linie zeigt die Proben ohne NH<sub>3</sub> an, die gestrichelte Linie die Proben mit NH<sub>3</sub>.

#### 1.4 Dünnschichtchromatographie der SPE-Fractionen

Eine erste Aufreinigung der Fraktionen aus den kleinen C18-Säulen erfolgte auf Kieselgelplatten.

Es zeigte sich, daß in keiner Probe, die zuvor mit  $\text{NH}_3$  behandelt worden war, eine Bande auftrat. Auf eine Darstellung der Ergebnisse wird deshalb verzichtet. Nachfolgend wird ausschließlich auf die Ergebnisse der Ammoniak-freien Proben eingegangen.

Die Auftrennung der GS-DNB-Proben ergab eine deutliche Bande in den Fraktionen 0-40 (Abb. 25). Ihr  $R_f$ -Wert beträgt  $\sim 0,35$ . In den übrigen Fraktionen traten keine Banden auf.

Für das  $\gamma$ GC-DNB zeigten sich Banden in den Fraktionen 0-40 (Abb. 25). Die  $R_f$ -Werte betragen etwa 0,3. In allen weiteren Fraktionen konnte kein Konjugat detektiert werden.

Nach Auftrennung der Cys-DNB-Fractionen waren in den Fraktionen 30-40 deutliche Banden mit den  $R_f$ -Werten von  $\sim 0,6$  sichtbar. Spuren des Konjugates fanden sich auch noch in den Fraktionen 50-90. Alle übrigen Fraktionen wiesen aber keine Banden mehr auf (Abb. 25).

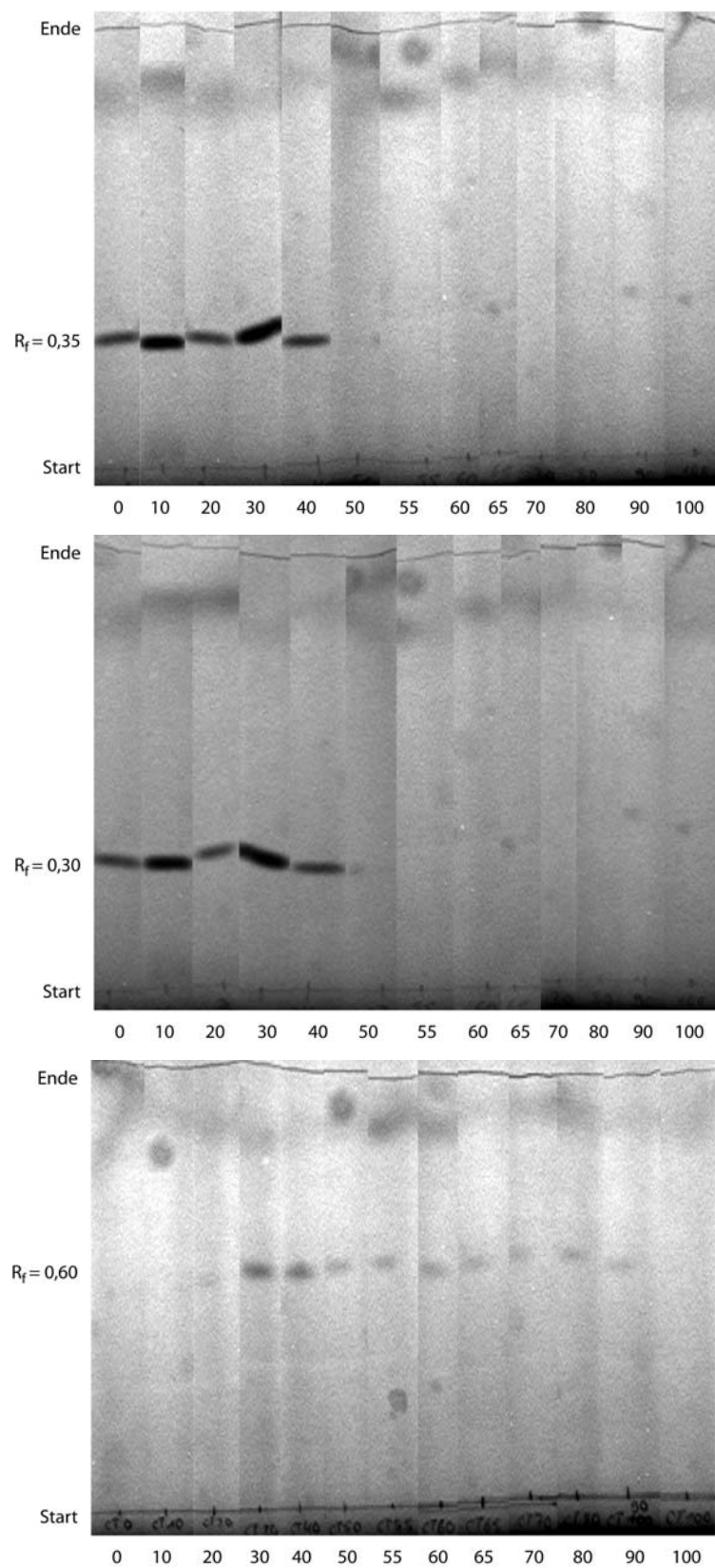


Abb. 25: Dünnschicht-Chromatographie der aufgereinigten Konjugate, die Synthese erfolgte ohne Zugabe von  $\text{NH}_3$  oder  $\text{NaOH}$ . Oben: GS-DNB, Mitte:  $\gamma$ GC-DNB, unten: Cys-DNB. Angegeben sind die Nummern der Fraktionen sowie der  $R_f$ -Wert.

## 1.5 HPLC der SPE-Fraktionen

### 1.5.1 GS-DNB

Das HPLC-Chromatogramm zeigt, daß das GSH-Konjugat bei ~ 40% ACN von der C18-Säule eluiert (Abb. 26 oben). Das entspricht bei dem verwendeten Gradienten einer Retentionszeit von 15min. Mit dem electrospray MS<sup>4</sup> (ThermoQuest, LCQ Duo, Quadropol) konnte bestätigt werden, daß es sich bei diesem Peak tatsächlich um das GS-DNB mit einer Masse von 474 u handelt (Abb. 26 unten). Das nicht konjugierte CDNB eluiert nach ~23 min bei 100% ACN.

Nebenprodukte, die z. T. große Verunreinigungen erzeugen, sind vollständig wasserlöslich, da sie in der 0 %-Stufe ausgewaschen werden und in den folgenden Fraktionen nicht mehr erscheinen. Für eine Aufreinigung der Konjugate ist diese Fraktion somit unbrauchbar.

Nach der Aufreinigung der NH<sub>3</sub>-freien Lösung finden sich in den SPE-Fraktionen 10-40 große Konjugat-Mengen (Abb. 27 links). Auch Fraktion 0 enthält GS-X, doch ist hier auch das nicht konjugierte Thiol enthalten, welches mit der verwendeten HPLC-Methode nicht detektiert werden kann.

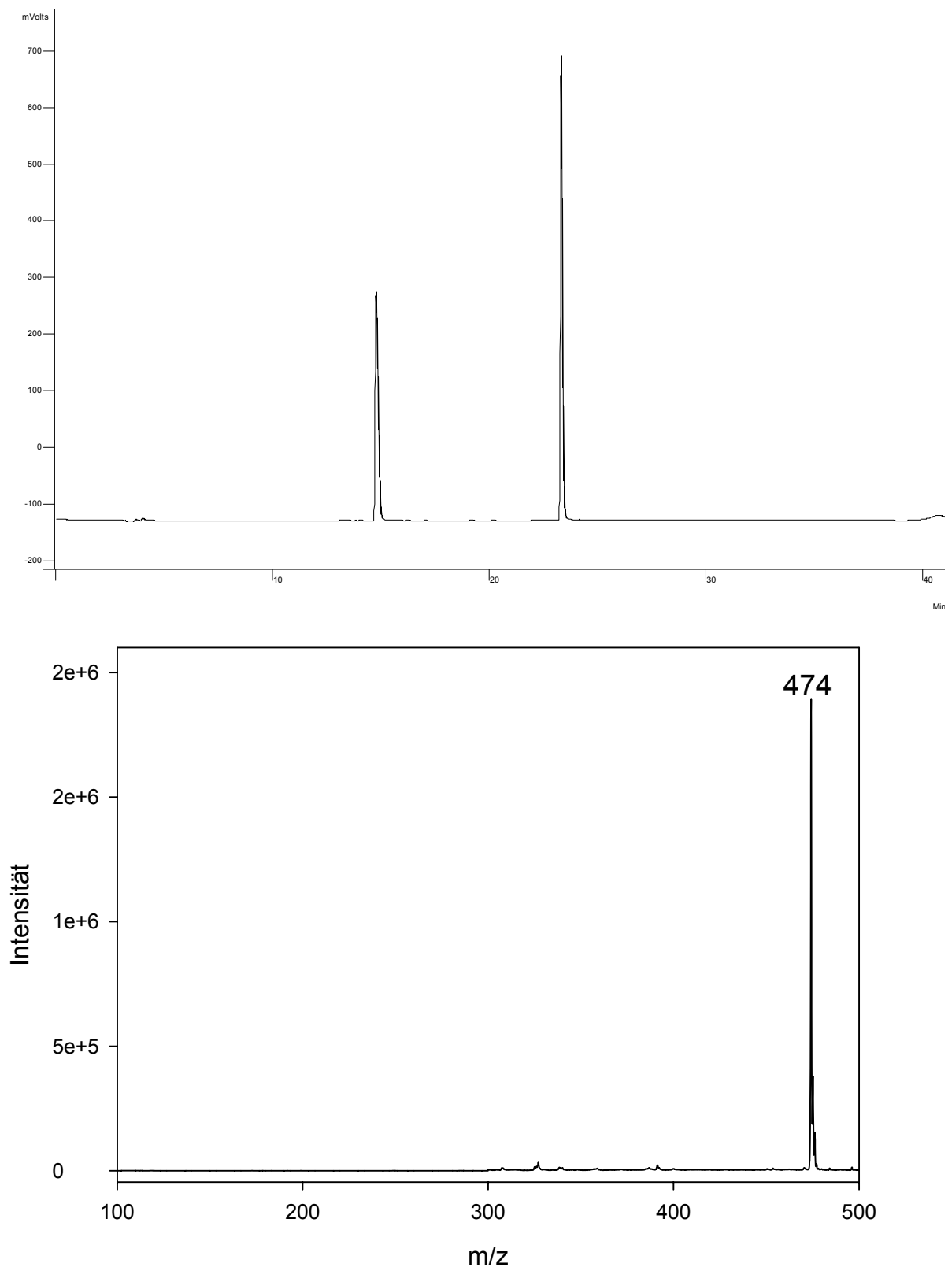
Bei Lösungsmittelkonzentrationen von über 50 % eluiert nur noch unkonjugiertes Xenobiotikum.

Wurde der Lösung für die Konjugation NH<sub>3</sub> zugesetzt, findet sich in der Fraktion 65 ein recht großer Konjugat-Peak und ein etwas kleinerer in Fraktion 10 (Abb. 27 rechts). In den Fraktionen 70-100 sind große CDNB-Menge detektierbar (Abb. 27 rechts).

Wird die Konjugation ohne NH<sub>3</sub> durchgeführt, ist eine hohe Ausbeute zu erwarten. Das gebildete Konjugat läßt sich einfach über SPE-Säulen aufreinigen. Bei der Konjugation mit NH<sub>3</sub> entstehen überwiegend Nebenprodukte und fast kein GS-DNB. Eine Aufreinigung über C18-Säulen ist schwierig.

---

<sup>4</sup> Die Messungen mit dem MS wurden von M. Frommberger am IÖC durchgeführt. Ihm sei an dieser Stelle herzlich gedankt. ☺



**Abb. 26:** oben: Beispiel-Chromatogramm von der GS-DNB-Lösung, die mit den SPE-Säulen aufgereinigt wurde. Der erste Peak ist das Konjugat (Retentionszeit 14,8 min = 42 % Acetonitril), der zweite das nicht-konjugierte CDNB (Retentionszeit 23,3 min = 100 % Acetonitril). Unten: Massenspektrum der SPE-Fractionen 10-40.

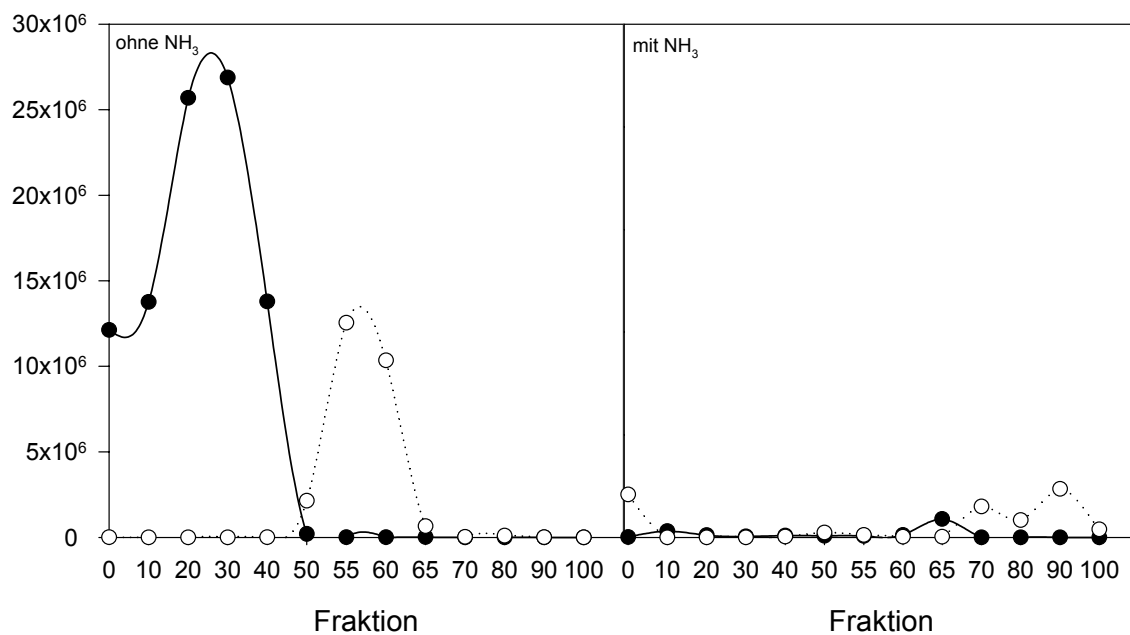


Abb. 27: GS-DNB-Peaks nach Konjugation ohne (links) und mit (rechts) Ammoniak-Zugabe. Schwarze Punkte sind das Konjugat, weiße Punkte unkonjugiertes CDNB.



### 1.5.2 $\gamma$ GC-DNB

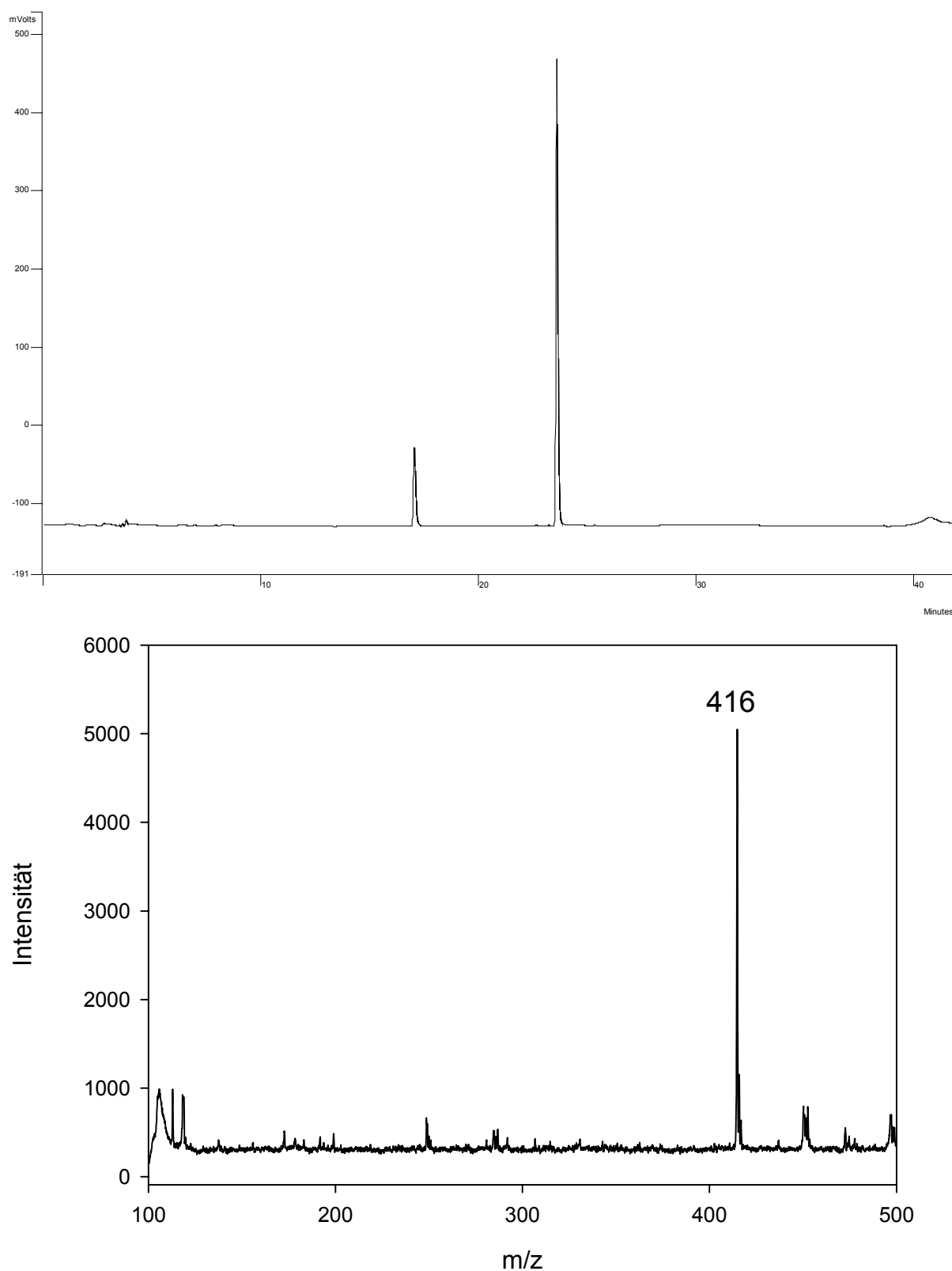
Das  $\gamma$ GC-Konjugat eluiert in der HPLC bei einem ACN-Gehalt von 47% (Abb. 28 oben). Messungen mit dem MS bestätigen, daß es sich hierbei dabei um das Konjugat handelt (Abb. 28 unten). Die schwache Intensität zeigt, daß nur sehr wenig Konjugat in der Lösung vorhanden war.

Wurde die Konjugation ohne  $\text{NH}_3$  durchgeführt, findet sich in keiner SPE-Fraktion ein deutlicher Konjugat-Peak. Offenbar geht das Konjugat bei der Aufreinigung über die kleinen C18-Säulen verloren (Abb. 29 links). Das freie CDNB ist dagegen in den Fraktionen 50-65 meßbar.

In den Fraktionen 30 und 40 wurde eine Fülle von Substanzen detektiert. Die daraus resultierenden Peaks sind zwar nur klein, doch ergeben sie ein eindeutiges Signal im Detektor. Offenbar werden sehr viele Nebenprodukte gebildet, die auf den SPE-Säulen ähnliche Elutionseigenschaften wie das Konjugat haben.

Bei einer Konjugation mit  $\text{NH}_3$  finden sich die größten Konjugat-Mengen in den Fraktionen 0 und 10 (Abb. 29 rechts). Danach geht die Menge in den Fraktionen zurück, das Konjugat ist aber bis zur Fraktion 40 detektierbar. Auch in Fraktion 60 findet sich noch einmal eine größere Menge Konjugat. Eine große Menge nicht konjugiertes CDNB liegt in den Fraktionen 0, 10, 55 und 60 vor.

Die Konjugation von  $\gamma$ GC und CDNB ist generell schwierig. Bei einer Synthese ist die Ausbeute nur gering. Erfolgt dann eine Aufreinigung, ist der Verdünnungseffekt so groß, daß schließlich gar kein Konjugat mehr detektiert werden kann.



**Abb. 28:** oben: Beispiel-Chromatogramm von der  $\gamma$ GC-DNB-Lösung, die mit den SPE-Säulen aufgereinigt wurde. Der erste Peak ist das Konjugat (Retentionszeit 17,0 min = 47 % Acetonitril), der zweite das nicht-konjugierte CDNB (Retentionszeit 23,3 min = 100 % Acetonitril). Unten: Massenspektrum der SPE-Fractionen 10-40.

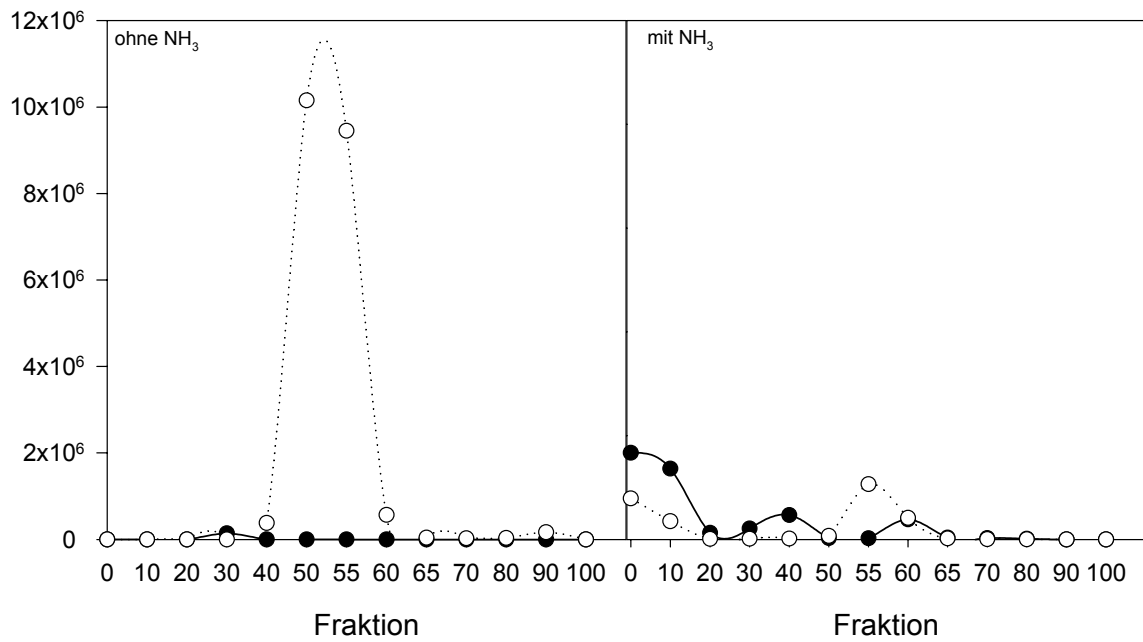


Abb. 29: Konjugation von  $\gamma\text{GC}$  und CDNB ohne (links) und mit (rechts) Ammoniak-Zugabe. Die durchgezogene Linie zeigt das Konjugat, die gestrichelte Linie das unkonjugierte CDNB.

### 1.5.3 Cys-DNB

Trennt man den Cys-DNB-Ansatz in der HPLC, treten viele Peaks auf, von denen der Konjugat-Peak nur schwer zu identifizieren ist. Einzig das freie CDNB ist dem Peak bei ~80% ACN eindeutig zuzuordnen (Abb. 30 oben).

Das MS zeigt, daß tatsächlich mehrere Substanzen mit unterschiedlichen Massen in der Lösung vorliegen (Abb. 30 unten). Nach Aufreinigung der Lösung, die ohne NH<sub>3</sub> angesetzt wurde, ist in den Fraktionen 30 und 40 ausschließlich das Konjugat enthalten. Alle folgenden Fraktionen enthalten neben diesem Konjugat und dem freien CDNB (diese vor allem in Fraktion 60) noch weitere Substanzen (in Abb. 31 links als Dreieck abgebildet).

Um was es sich hier handelt, ist unklar. Messungen mit dem MS brachten keine schlüssigen Erklärungen.

Erfolgte die Konjugation mit NH<sub>3</sub>, findet sich lediglich in Fraktion 60 ein Konjugat-Peak, der größte Teil wurde bereits mit Wasser aus den SPE-Säulen gespült (Abb. 31 rechts).

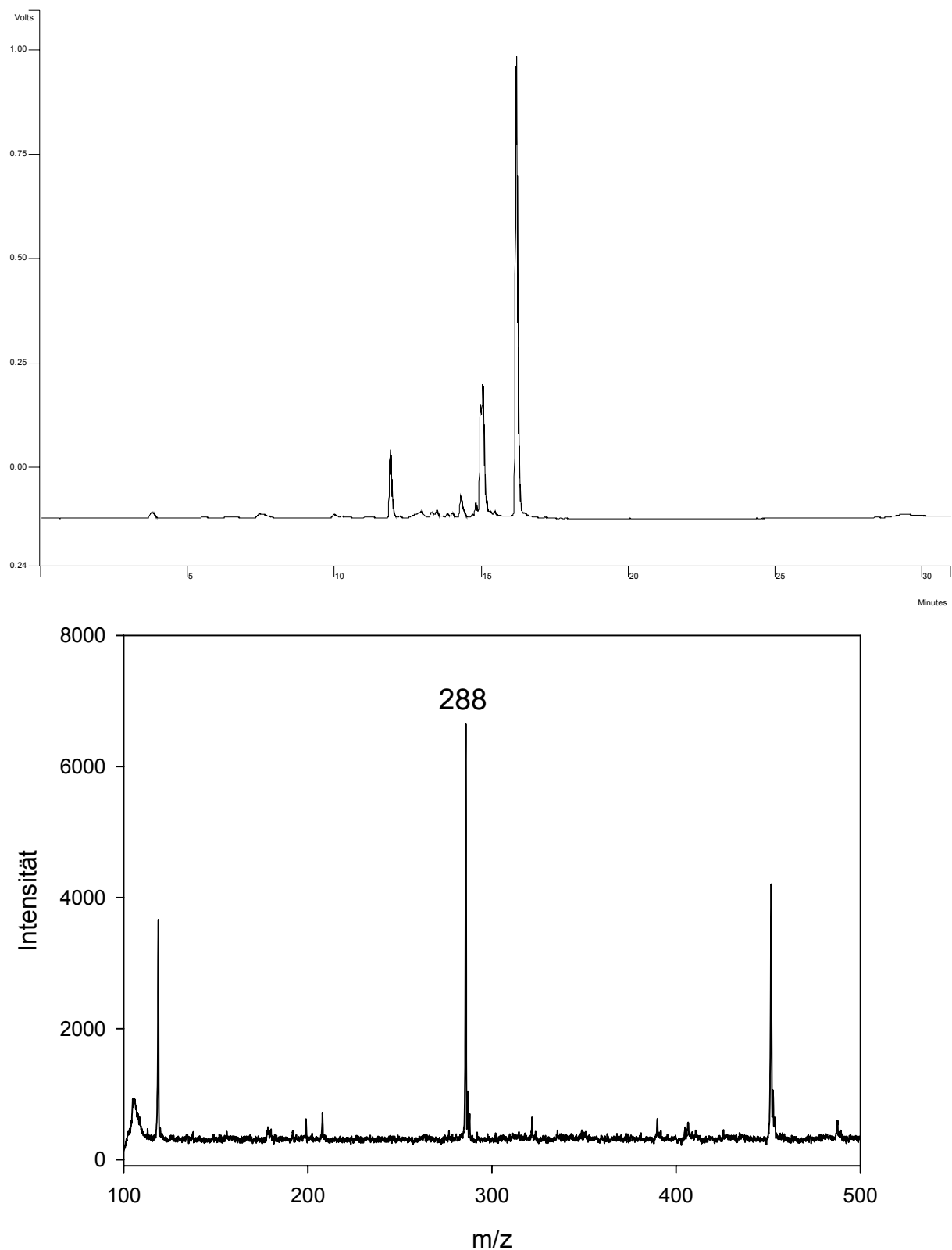
Es sind jedoch große Mengen unkonjugiertes CDNB in den Fraktionen 30, 40 und 70 zu finden.

Die Synthese des S-Cys-DNBs ist äußerst problematisch. Schon die Konjugation ist schwierig, da sehr viele Nebenprodukte entstehen. Zwar scheint ein Ansatz ohne NH<sub>3</sub> erfolgreich, doch ist nach wie vor unklar, ob das S-Cys-DNB oder der N-Cys-DNB entsteht und aufgereinigt wird. Mit der Aufreinigung über SPE-Säulen kann man lediglich die Synthese-Produkte von freiem Cys und unkonjugiertem CDNB trennen.

Eine Analyse mit NMR<sup>5</sup> ergab, daß auch in Fraktion 55 noch große Mengen freies Cys (orange) vorliegen. Es konnte auch S-Cys-DNB (blau) detektiert werden, dies ist jedoch nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Schließlich enthält die Lösung einige undefinierte Substanzen (grün), bei denen es sich vermutlich um aromatische Verbindungen handelt (Abb. 32).

---

<sup>5</sup> Die Messung mit dem NMR wurde freundlicherweise von Dr. Hertkorn, IÖC, durchgeführt.



**Abb. 30:**oben: Beispiel-Chromatogramm von der Cys-DNB-Lösung, die mit den SPE-Säulen aufgereinigt wurde. Die ersten zwei größeren Peaks sind vermutlich das Konjugat (Retentionszeit 11,9 min = 57 % und 15,5 min = 76 % Acetonitril), der große Peak ist das nicht-konjugierte CDNB (Retentionszeit 16,2 min = 79 % Acetonitril). Unten: Massenspektrum der SPE-Fractionen 10-40.

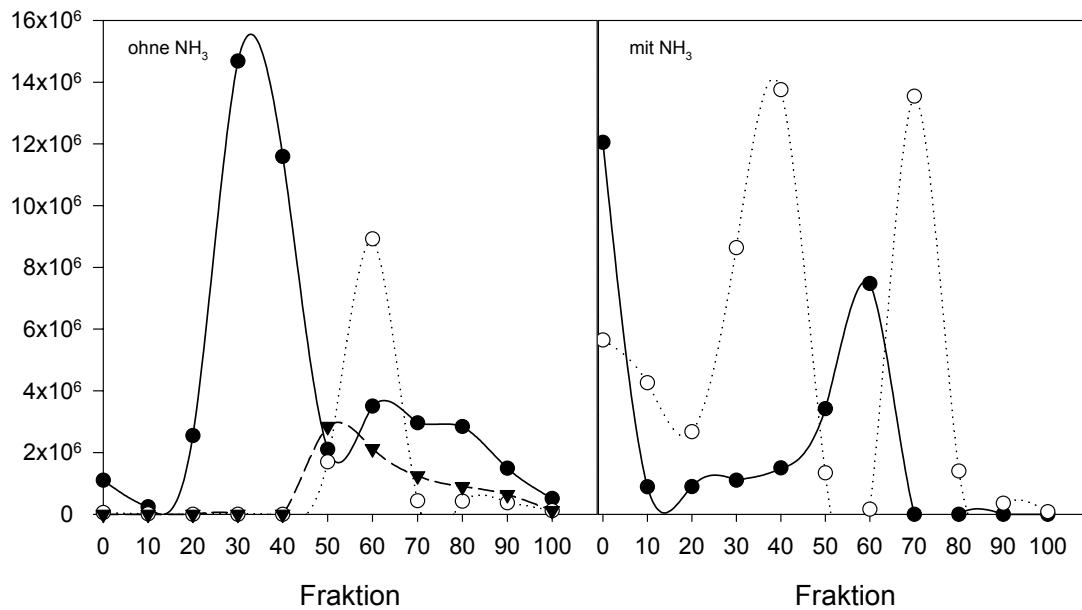


Abb. 31: Konjugation von Cys und CDNB ohne (links) und mit (rechts) Ammoniak-Zugabe. Die durchgezogene Linie zeigt das Konjugat, die gestrichelte Linie das unkonjugierte CDNB. Im linken Diagramm ist noch ein weiteres Cystein-Konjugat eingetragen (Dreieck).

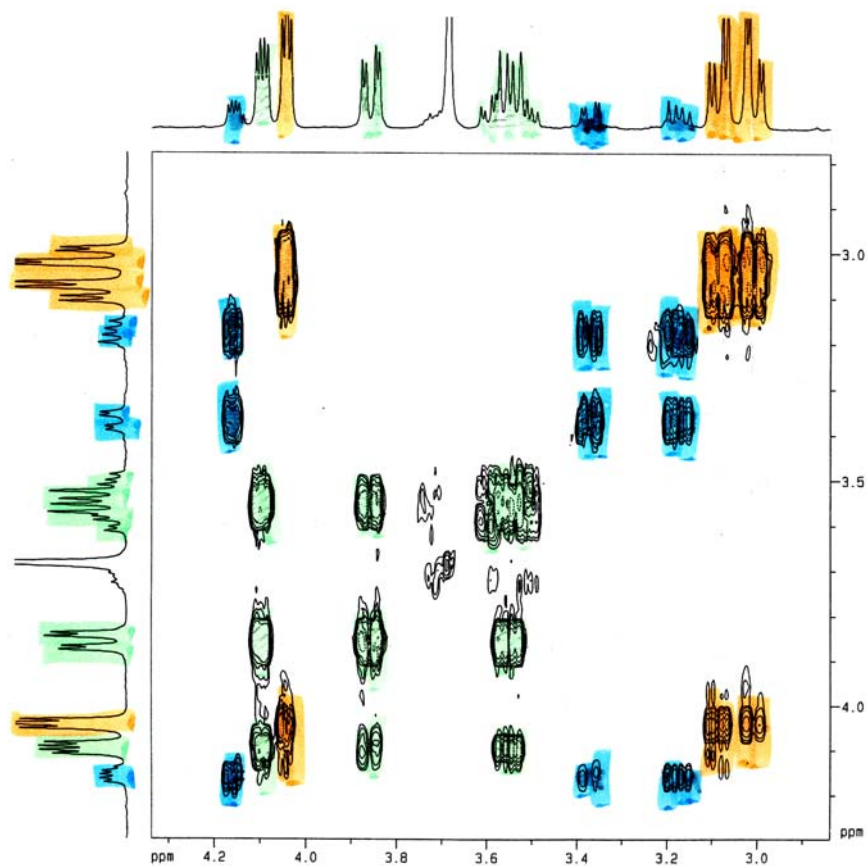


Abb. 32: NMR-Spektrum der Cys-DNB-Lösung. Orange – freies Cys, Blau – S-Cys-DNB und grün – unbekannte Aromaten.

### 1.6 Analyse des Cystein-Konjugates mit Hilfe der CE

In der CE wurden Proben aufgetrennt, die bei pH 6,0; 7,0 und 7,8 synthetisiert wurden. Jede Probe wurde in einem Ammonium-Acetat-Puffer (0,05 M) mit pH 6/7/8 gemessen.

Es zeigte sich, daß bei einer Synthese in einem Puffer mit pH 6,0 keine Produkte entstehen (Abb. 33).

Die in den Elektropherogrammen in Nachbarschaft des EOF (effektive Mobilität  $\leq -0,007$ ) zu detektierenden Peaks wurden mit dem MS als freies, unkonjugiertes Cys identifiziert (in den Diagrammen mit \* markiert). Die minimale Wanderung bei den höheren pH-Werten korreliert mit den theoretisch berechneten logD-Werten (vgl. Abb. 13, S. 29). Bei pH 6,0 und 7,0 liegt Cys vollständig neutral vor, bei pH 8,0 ist ein kleiner Teil der Moleküle negativ geladen.

CDNB konnte im Positivmodus im MS nicht detektiert werden, es ist jedoch davon auszugehen, daß dieses im EOF wandert (mit ♦ markiert).

Wurde die Synthese dagegen bei pH 7,0 bzw. 7,8 angesetzt, treten 3 große Peaks auf. Diese zeigen jedoch trotz verändertem pH-Wert des Trennpuffers keine Änderung ihrer Mobilität. Demnach sind bei der Synthese je 3 Produkte entstanden, von denen jedoch keines das gewünschte S-Cys-DNB ist, welches seine Mobilität in den verwendeten Trennpuffern ändern sollte.

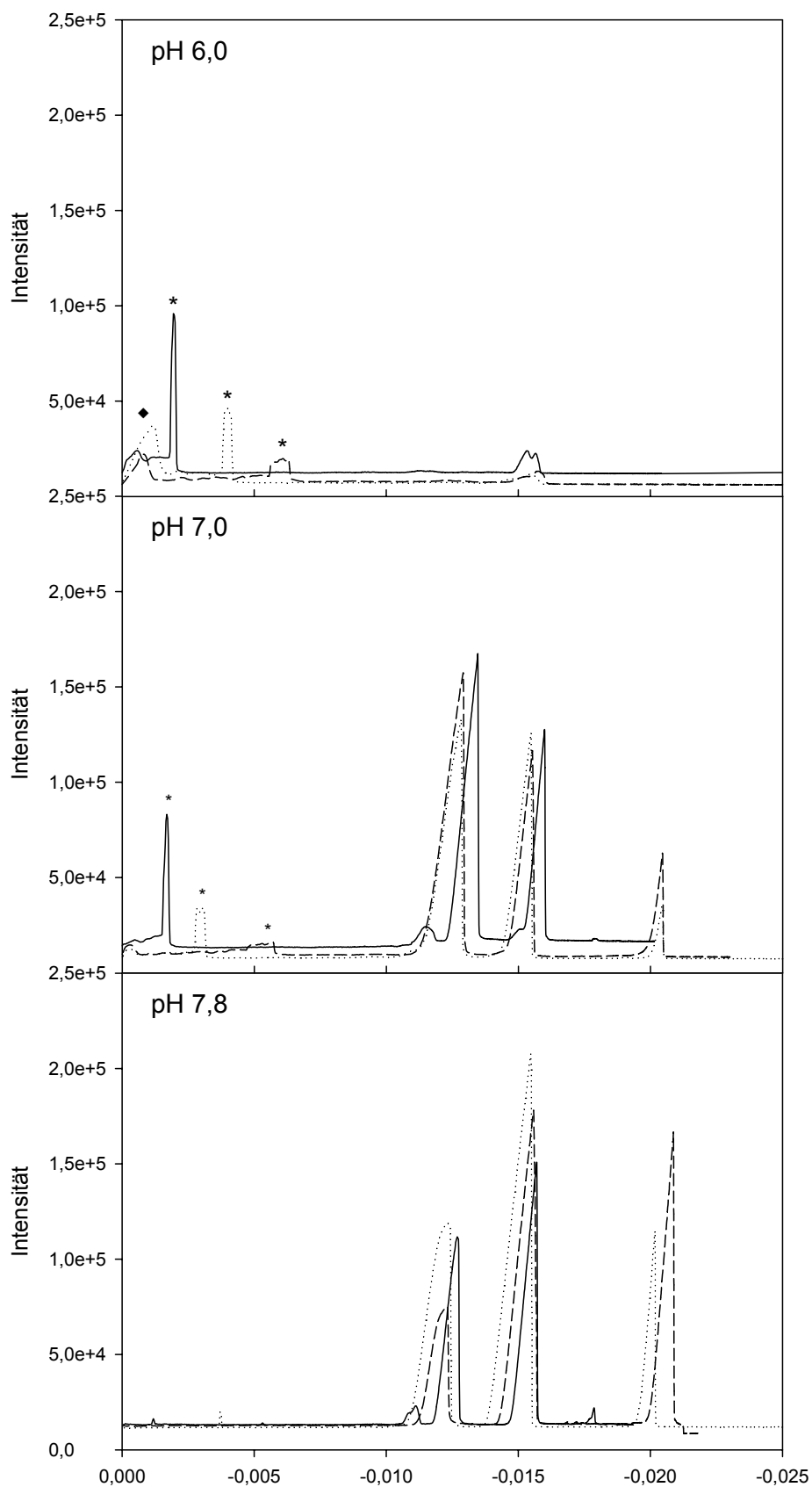


Abb. 33: Elektropherogramme der Cys-Konjugate. Die Synthese fand bei pH 6 (oben), 7 (Mitte) und 7,8 (unten) statt, die Trennung erfolgte bei pH 6 (durchgezogene Linie), 7 (gepunktet) und 8 (gestrichelt).



### 1.7 Zusammenfassung

Die beste Konjugation von GSH und CDNB wird in einem physiologischen Puffer mit einem pH-Wert von 7,8 erreicht (Tab. 8). Dabei sollte auf eine Zugabe von NaOH oder  $\text{NH}_3$  verzichtet werden. Nach einer Aufreinigung mit SPE-Säulen können die Fraktionen 10-40 als reine GS-DNB-Lösung verwendet werden. Die übrigen Fraktionen enthalten freies Thiol bzw. freies CDNB.

Das  $\gamma\text{GC}$ -Konjugat synthetisiert man am erfolgreichsten in  $\text{H}_2\text{O}$  oder basischem Borat-Puffer (pH 8,2). Die Zugabe von  $\text{NH}_3$  oder NaOH scheint die Konjugation zu verbessern, allerdings bereitet die anschließende Aufreinigung mit SPE-Säulen einige Schwierigkeiten. Evtl. können längere Reaktionszeiten und/oder Synthese bei höheren Temperaturen ( $>30\text{ °C}$ ) die Ausbeute steigern.

Für die Synthese des Cys-DNBs wird die gleiche Methode empfohlen wie für das GS-DNB. Es besteht aber hoher Bedarf an einer weiteren Analyse der entstehenden Produkte mit anschließender Modifikation des Synthese-Protokolls.

**Tab. 8: Übersicht über die wichtigsten Ergebnisse der Synthese der Thiol-Konjugate. Angegeben sind die Puffer, bei denen die höchsten Konjugationsraten erzielt wurden sowie Daten der Konjugation ohne und mit NH<sub>3</sub>.**

**Lesebeispiel: Konjugation von GSH ohne Zugabe von NH<sub>3</sub>: das GS-DNB war im Photometer in den SPE-Fractionen 10 und 30 detektiert. Die Fractionen 0-40 zeigten bei der DC jeweils eine Bande mit einem R<sub>f</sub>-Wert von 0,3. In der HPLC war in den Fractionen 10 und 40 das reine GS-DNB detektiert.**

Thiol		Konjugationsrate		Photometer	DC		HPLC
		Puffer	pH	SPE-Fraktion	SPE-Fraktion	R <sub>f</sub>	SPE-Fraktion
<b>GSH</b>		KPP	7,8				
		Tris/HCl	7,8				
Ohne NH <sub>3</sub>	GS-DNB			10 + 30	0-40	0,3	10 + 40
	CDNB			-			55 + 60
Mit NH <sub>3</sub>	GS-DNB			0 - 40	-	-	10 + 65
	CDNB			80	-	-	0 + 70 + 90
<b>γGC</b>		H <sub>2</sub> O	6				
		Borat	8,2				
Ohne NH <sub>3</sub>	γGC-DNB			40	0-40	0,35	-
	CDNB			55 + 60 + 90			50-60
Mit NH <sub>3</sub>	γGC-DNB			0 + 10 + 40 + 60	-	-	0 + 10 + 40 + 60
	CDNB			90			0 + 55
<b>Cys</b>		NaPP	7,5				
		Tris/HCl	7,5				
Ohne NH <sub>3</sub>	Cys-DNB			30	30-60	0,6	30-40
	CDNB			100			60
Mit NH <sub>3</sub>	Cys-DNB			0 + 55-60	-	-	60
	CDNB			-	-	-	40 + 70

### 1.8 Saubere Konjugate für ausgewählte Versuche

Für die GSH-Konjugate wurden Glutathion und CDNB ohne Zugabe von  $\text{NH}_3$  oder NaOH zusammen in einen physiologischen Puffer (Tris/HCl 0,1 mM) mit einem pH-Wert von 7,8 gegeben und über SPE-Säulen aufgereinigt. Anschließend wurden die Fraktionen 10-40 zusammengegeben und lyophilisiert.

Die Konjugate wurden dann für die Versuche in Wasser gelöst. Eine Bestimmung der eingesetzten Molarität erfolgte im Photometer bei 340 nm mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für CDNB ( $\epsilon = 9,6$ ) und Formel 8.

$$\frac{\text{OD}}{\epsilon} * \frac{V}{v} = \text{mM}$$

**Formel 8: Bestimmung der Molarität einer Lösung**

**OD** – im Photometer gemessene Extinktion [OD]

**V** – Gesamtvolumen in der Küvette

**v** – Volumen der Probe

**$\epsilon$**  = Extinktionskoeffizient (spezifisch für Substrat)

## 2 Transportstudien mit pflanzlichem Gewebe

### 2.1 Transport von GSH-Konjugat und Cys-Konjugat durch verschiedene Gewebe von Gerstenkeimlingen von der Wurzelbasis zur Wurzelspitze

Die PITMAN-Kammer ist eine kleine Inkubationskammer, die mittels kleiner Stege in 3 Kompartimente (A, B, C) unterteilt werden kann. In diese Kammer wird Pflanzenmaterial, z. B. Gerstenwurzeln, gespannt, durch das hindurch von Kompartiment A nach Kompartiment C die Konjugate geleitet werden sollen.

Durch die Gerstenwurzeln, deren Wurzelspitze abgeschnitten wurde, findet in den ersten 45 min. kein nennenswerter Transport der Konjugate von Kompartiment A, in dem die Konjugate vorgelegt waren, nach Kompartiment C durch die Wurzel statt (Abb. 34A). In Kompartiment C der jeweiligen PITMAN-Kammer nimmt die Menge der Konjugate dann jedoch zu. Es fällt auf, daß die Konzentration des GSH-Konjugates stärker zunimmt als die Konzentration des Cystein-Konjugates.

Ein recht ähnliches Bild zeigt sich auch für die vollständigen Gerstenwurzeln (Abb. 34B). Eine Konjugatabgabe nach C ist erst nach etwa einer Stunde meßbar. Während die Konzentration des GSH-Konjugates im entsprechenden Experiment dann rasch zunimmt, steigt die Menge des Cys-Konjugates im analogen Versuch nur zögerlich an.

Wie schon für die Wurzeln mit und ohne Spitze gezeigt werden konnte, erfolgt auch durch die Pflanzen ohne Wurzelspitze ein Transport der Konjugate (Abb. 34C). Hier ist die Konzentrationszunahme allerdings schon etwas früher meßbar, langfristig scheint die Transportgeschwindigkeit aber nahezu gleich zu sein.

Auch hier zeigte sich, daß das GSH-Konjugat schneller transportiert wird als das Cys-Konjugat.

Durch die vollständigen Gerstenpflanzen wird das GSH-Konjugat vergleichsweise schnell transportiert. In Kammer C ist eine starke Konzentrationszunahme meßbar (Abb. 34D). Das Cys-Konjugat wird dagegen nur langsam weitergeleitet.

In allen Fällen wird also das größere GSH-Konjugat schneller transportiert als das kleinere Cys-Konjugat.

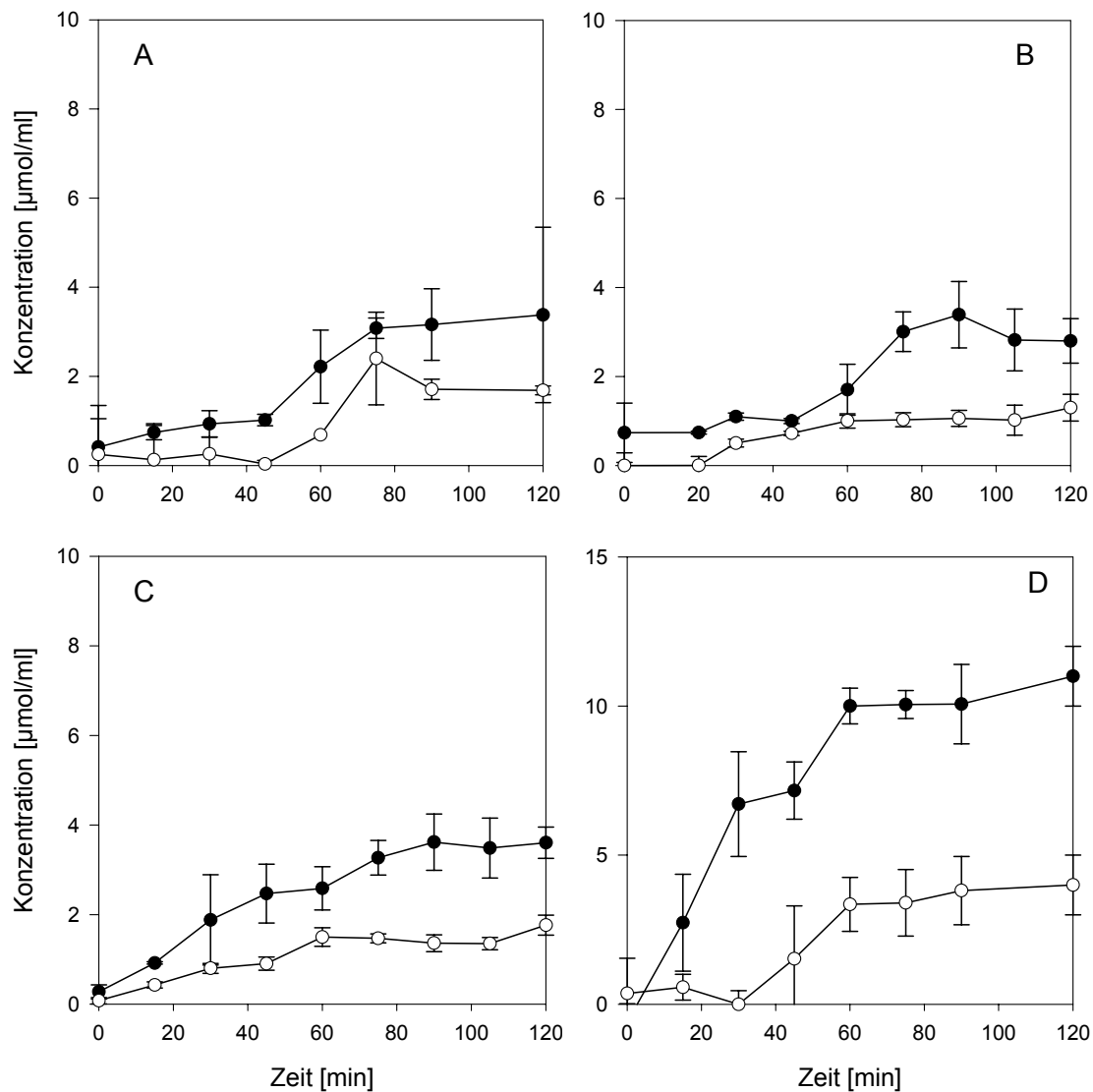
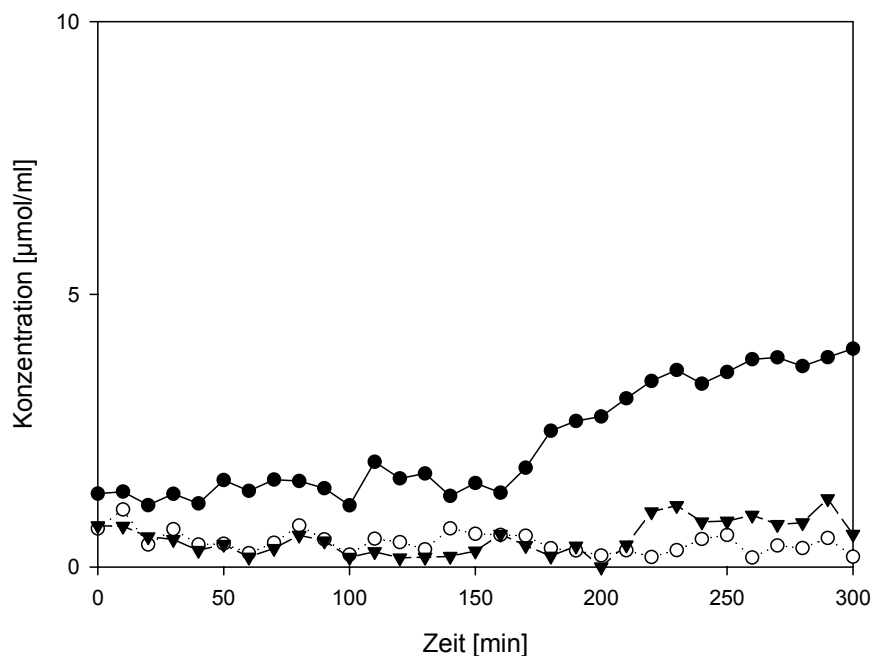


Abb. 34: Transport der Konjugate (Konzentration = 15 mM) durch verschiedene Gewebe von Gerstenkeimlingen. Die schwarzen Punkte markieren das GSH-Konjugat, die weißen Punkte das Cystein-Konjugat. Es wurden zu jedem Meßzeitpunkt dreimal 150 µl Lösung aus Kompartiment C der PITMAN-Kammer entnommen und im Photometer bei 340 nm gemessen. Nach Mittelwertbildung der gemessenen Extinktionen und Errechnung der Standardabweichung ( $n = 3$ ) konnte über eine Kalibriergerade die Konjugat-Konzentration bestimmt werden. A – Wurzeln ohne Spitze, B - Wurzeln mit Spitze, C – ganze Pflanzen ohne Wurzelspitze, D – ganze Pflanzen mit Wurzelspitze.

## 2.2 Transport von 1,5 mM GSH-Konjugat

In einer Versuchsreihe wurde der Transport von GSH-Konjugat getestet, das gegenüber den übrigen Versuchen 1:10 verdünnt war. So sollte überprüft werden, ob die Konzentration des Konjugates einen Einfluß auf die Transportgeschwindigkeit hat.

Es zeigte sich wieder einmal, daß das Konjugat durch die vollständigen Pflanzen nach Fütterung ins Blatt am schnellsten transportiert wird (Abb. 35). Zwischen den Wurzeln sind die Unterschiede nur gering (Abb. 35).



**Abb. 35:** Transport von 1,5 mM GSH-Konjugat durch verschiedene Gewebe von Gerstenkeimlingen. Die schwarzen Kreise bilden den Transport durch die ganze Pflanze ab, weiße Kreise den Transport durch die Gerstenwurzeln ohne Spitze und schwarze Dreiecke den Transport durch Wurzeln mit Spitze. Nach Abzug der Eigenabsorption des Transportmediums wurde – wie auch bei den vorangegangenen Transportstudien – über eine Kalibriergerade die Konjugat-Konzentration bestimmt.

### 2.3 Transport von GSH-Konjugat von der Wurzelspitze zur Wurzelbasis

Versuche, bei denen die Wurzeln „verkehrt herum“, also mit der Spitze in Kompartiment A, in die PITMAN-Kammer eingespannt wurden, blieben ergebnislos. Wiederaufnahme und anschließender Transport des Konjugats (15 mM) von der Wurzelspitze zum Sproß konnten nicht festgestellt werden (Abb. 36).

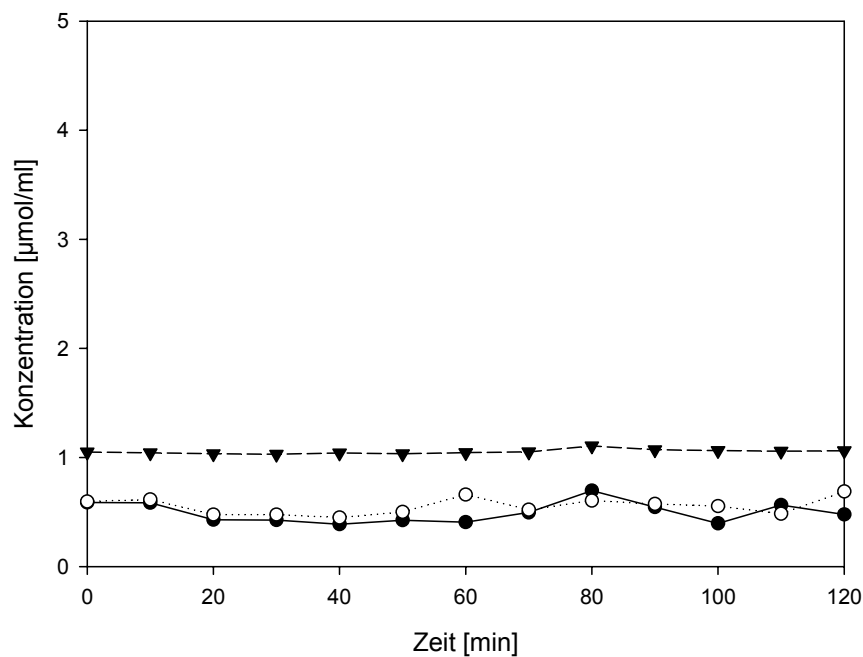


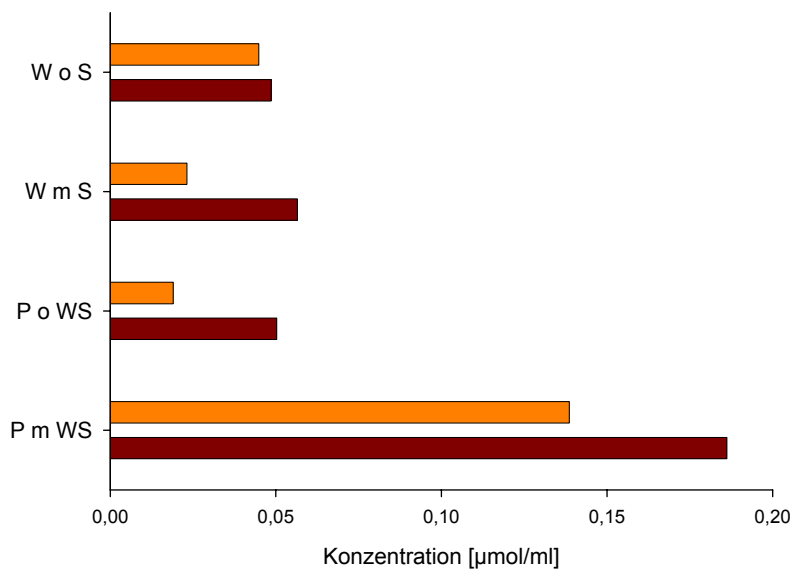
Abb. 36: Transport des GSH-Konjugats durch verschiedene Gewebe von Gerstenkeimlingen. Die schwarzen Kreise bilden den Transport durch die ganze Pflanze ab, weiße Kreise den Transport durch die Gerstenwurzeln ohne Spitze und schwarze Dreiecke den Transport durch Wurzeln mit Spitze.

#### 2.4 Transportgeschwindigkeiten durch die verschiedenen Gewebe

Über die Ermittlung und grafische Darstellung (Abb. 37) der Transportraten wird deutlich, daß das GSH-Konjugat stets schneller transportiert wird als das Cys-Konjugat.

Der Transport des GSH-Konjugates ist in den Wurzeln mit Wurzelspitze besser als in dekaptierten Wurzeln bzw. Pflanzen, denen die Wurzelspitze abgeschnitten wurde, am schnellsten erfolgt die Weiterleitung in vollständigen Gerstenpflanzen.

Auch der Transport von Cys-X ist vom Gewebe abhängig. Durch dekaptierte Wurzeln wird das Konjugat annähernd so schnell transportiert wie das GSH-Konjugat. Sind die Wurzeln jedoch vollständig oder soll das Konjugat durch eine Pflanze mit abgeschnittener Wurzel transloziert werden, gehen die Transportraten merklich zurück. Durch vollständige Pflanzen kann ein sehr rascher Transport festgestellt werden.



**Abb. 37:** Zunahme der Konjugat-Konzentration in µmol/ml pro Minute in Kammer C. W o S = Wurzeln ohne Spitze; W m S = Wurzeln mit Spitze; P o WS = Pflanze ohne Wurzelspitze; P m WS = Pflanze mit Wurzelspitze. Dunkelrot = GS-X, orange = Cys-X.



## 2.5 BUNSEN'sches Effusionsgesetz

Die Diffusion von Gasen durch poröse Membranen läßt sich mit dem BUNSEN'schen Effusionsgesetz (Formel 9) beschreiben (Gerthsen et al. 1982).

Siau konnte zeigen, daß diese Gleichung auch grob für in Flüssigkeiten gelöste Moleküle und deren Weiterleitung durch pflanzliche Gewebe Gültigkeit hat (Siau 1984). So kann man in recht guter Annäherung Unterschiede im Transport großer Moleküle wie von GS-X und Cys-X durch poröse Medien mit Hilfe einer einfachen Formel charakterisieren.

Rein rechnerisch ergibt sich für die Diffusion von Cys-X und GS-X durch enge Poren oder englumige Gefäße ein Wert von 0,78 (Tab. 9). Das bedeutet, daß das Cys-Konjugat aufgrund seiner geringeren Masse ( $u = 288$ ) - und damit einhergehend seines kleineren Volumens - schneller diffundiert als das GSH-Konjugat mit seiner größeren Masse ( $u = 474$ ).

Formel 9 
$$\frac{v_1}{v_2} = \sqrt{\frac{m_2}{m_1}}$$

$V_n$  Geschwindigkeit von Konjugat n

$m_n$  Masse von Konjugat n [g/mol]

$m_1 = \text{GS-DNB (474 u)}$

$m_2 = \text{Cys-DNB (288u)}$

Die Versuche mit der PITMAN-Kammer ergaben jedoch ein anderes Bild.

Findet der Transport durch isolierte Gerstenwurzeln ohne Wurzelspitze statt, stellt sich heraus, daß das Verhältnis der Transportraten vom GSH- und Cys-Konjugat nicht dem theoretischen Wert von 0,78 entspricht, sondern 1,08 beträgt (Tab. 9). Das bedeutet, daß das größere GSH-Konjugat schneller durch das Pflanzenmaterial geleitet wird als das kleinere Cys-Konjugat.

Wird den Wurzeln die Spitze belassen, ergibt sich ein noch höherer Wert (2,44). Demnach kann die Weiterleitung der GS-X-Moleküle in der Pflanze durch die Anwesenheit der Wurzelspitze noch beschleunigt werden.

Ähnliche Ergebnisse brachten Versuche mit jungen Gerstenpflanzen. War die Wurzelspitze abgeschnitten worden, ergab sich ein Verhältnis zwischen Cys-X und GS-X von 1,34. Auch aus ganzen Pflanzen mit Wurzelspitze konnte eine Beschleunigung des Glutathiontransports gemessen werden, so daß sich ein Verhältnis von 2,65 errechnete.

Die errechneten Werte sind in jedem Falle  $>1$ . Somit ist klar, dass das größere GS-X stets schneller durch das Gewebe geleitet wird als das Cys-X. Damit muss Diffusion als treibende Kraft ausgeschlossen werden, und man muss folgern, dass ein echter Transportvorgang vorliegt.

**Tab. 9: Verhältnis der Transportgeschwindigkeiten von Cys- und GSH-Konjugat nach dem BUNSEN'schen Ausströmungsgesetz.**

$$\frac{v_1}{v_2} = \sqrt{\frac{m_2}{m_1}}$$

Diffusiver Transport	0,78
Wurzeln	1,08
Wurzeln mit Wurzelspitze	2,44
Pflanzen	1,34
Pflanzen mit Wurzelspitze	2,65

Im Falle eines Transportes sollte es möglich sein, diesen zu hemmen. Werden beispielsweise die Plasmodesmata durch KCl-Wirkung geschlossen, dürfte kein Transport mehr feststellbar sein, und es ließe sich durch Inkubation der Wurzeln mit einer KCl-Lösung bestimmen, ob der Transport symplastisch oder apoplastisch erfolgt.

## 2.6 Hemmung des Transportes

Um zu testen, ob der GS-X-Transport mit 110 mM KCl-Lösung gehemmt werden kann, wurden zunächst Gerstenwurzeln ohne Spitze in die PITMAN-Kammer eingespannt und der unbeeinflusste Transport eine Stunde lang gemessen.

Nachdem eine Konjugatzunahme in Kammer C festgestellt werden konnte, wurde in eine Kammer (Kompartiment B) die KCl-Lösung gefüllt. Zur Kontrolle wurde der Transport in einer PITMAN-Kammer ohne KCl gemessen.

Wie aus Abb. 38 ersichtlich ist, konnte der Transport des GS-X gut mit KCl-Lösung gehemmt werden. Zwar ist noch eine kurze Zeit lang eine leichte Konjugatzunahme in Kompartiment C meßbar, langfristig wird aber kein Konjugat durch das Gewebe geleitet.

Vor allem im Vergleich zur unbeeinflussten Kontrolle ist eine deutliche Hemmwirkung festzustellen.

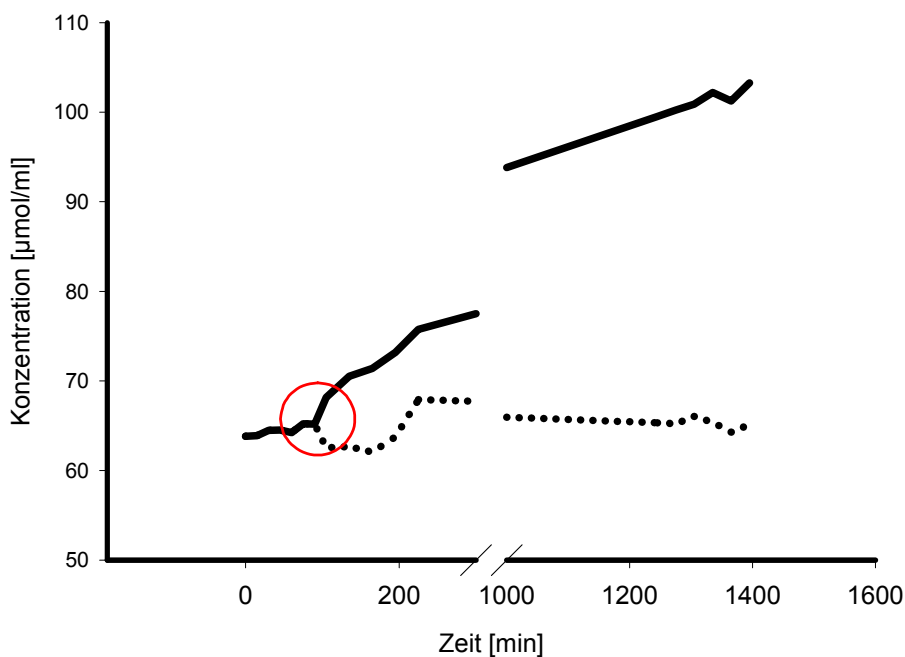


Abb. 38: Hemmung des Transportes in der PITMAN-Kammer mit 110 mM KCl. Die durchgezogene Linie stellt den Transport in den unbeeinflussten Kontrollwurzeln dar, die gepunktete Linie den Transport in den mit KCl behandelten Wurzeln. Der rote Kreis markiert die Zugabe der KCl-Lösung.

### 3 Wirkungen auf Glutathion-S-Transferasen (GSTs) in Pflanzen

#### 3.1 Entgiftungskapazitäten von Meerrettich-Wurzelkulturen

Wie in den Versuchen mit der PITMAN-Kammer gezeigt werden konnte, sind Pflanzen in der Lage, über die Wurzeln Fremdstoff-Metabolite abzugeben.

Gelangen diese Stoffe nun in den Boden, ist ein Einfluß auf benachbarte Pflanzenwurzeln und Organismen in der Rhizosphäre nicht auszuschließen.

Deshalb wurden transformierte Meerrettich-Wurzeln mit den Fremdstoff-Metaboliten inkubiert und die Veränderung der GSTs über die Zeit gemessen.

Parallel dazu wurde überprüft, wie sich die Enzym-Aktivitäten entwickeln, wenn die Wurzeln mit dem Bodenbakterium *Serratia liquefaciens* inokuliert sind.

##### 3.1.1 Zugabe von GS-X

In dieser Versuchsreihe zeigte sich, daß schon allein die Zugabe von *Serratia liquefaciens* einen Einfluß auf den Enzymhaushalt der Wurzeln hat. Zum Zeitpunkt  $t_0$  ist in den *Serratia* inokulierten Wurzeln der Umsatz von CDNB deutlich gegenüber den sterilen Wurzeln erhöht. Für die übrigen Substrate (DCNB und NBOC) wird dagegen ein merklich verringerter Umsatz gemessen.

Die CDNB-GST-Aktivität erreicht sowohl in den sterilen als auch in der *Serratia* inokulierten Wurzeln 3 Std. nach der Inkubation mit GS-X ihr Maximum (Abb. 39A). In den besiedelten Wurzeln ist die Aktivität anfänglich erhöht gegenüber den sterilen Kulturen. Über einen längeren Zeitraum (24h) verringert sich die Umsatzrate jedoch wieder.

Die Aktivität der DCNB-GST geht 3 Std. nach der Konjugat-Zugabe vollständig zurück und bleibt während des Experiments mehr oder weniger niedrig (Abb. 39B). Dabei sind die Unterschiede zwischen den sterilen und den besiedelten Wurzeln nur marginal und statistisch nicht abgesichert.

Ähnlich verhält sich die NBC-GST-Aktivität in den sterilen Wurzeln, auch hier erfolgt zunächst ein Zusammenbruch der Aktivität. Über die Zeit ist jedoch wieder eine stetige Aktivitätszunahme zu verzeichnen (Abb. 39C).

In den *Serratia* besiedelten Wurzeln zeigt sich ein anderes Bild. Die Enzymaktivität wird zunächst gesteigert, geht dann leicht zurück, um 24 Std. nach der Zugabe des GS-X ihr Maximum zu erreichen (Abb. 39C).

Eine drastische Reaktion zeigt die NBOC-Aktivität. Sie wird in allen Wurzeln durch die Konjugat-Zugabe stark erhöht ( $\sim 4 \mu\text{kat}/\text{mg}$ ) und bleibt auch über die Zeit auf diesem hohen Niveau (Abb. 39D). Die sterilen Wurzeln zeigen ihr Umsatzmaximum 6 Std. nach der Konjugat-Zugabe, wohingegen in den inokulierten Wurzeln bereits nach 3 Std. die höchste Reaktion gemessen wird.

Auffallend ist, daß ähnliche Substrate wie CDNB und DCNB bzw. NBC und NBOC sehr unterschiedlich umgesetzt werden. Weiterhin fällt auf, daß die Umsatzrate für ein Substrat völlig zurückgeht, während die Rate für ein anderes Substrat drastisch erhöht ist.

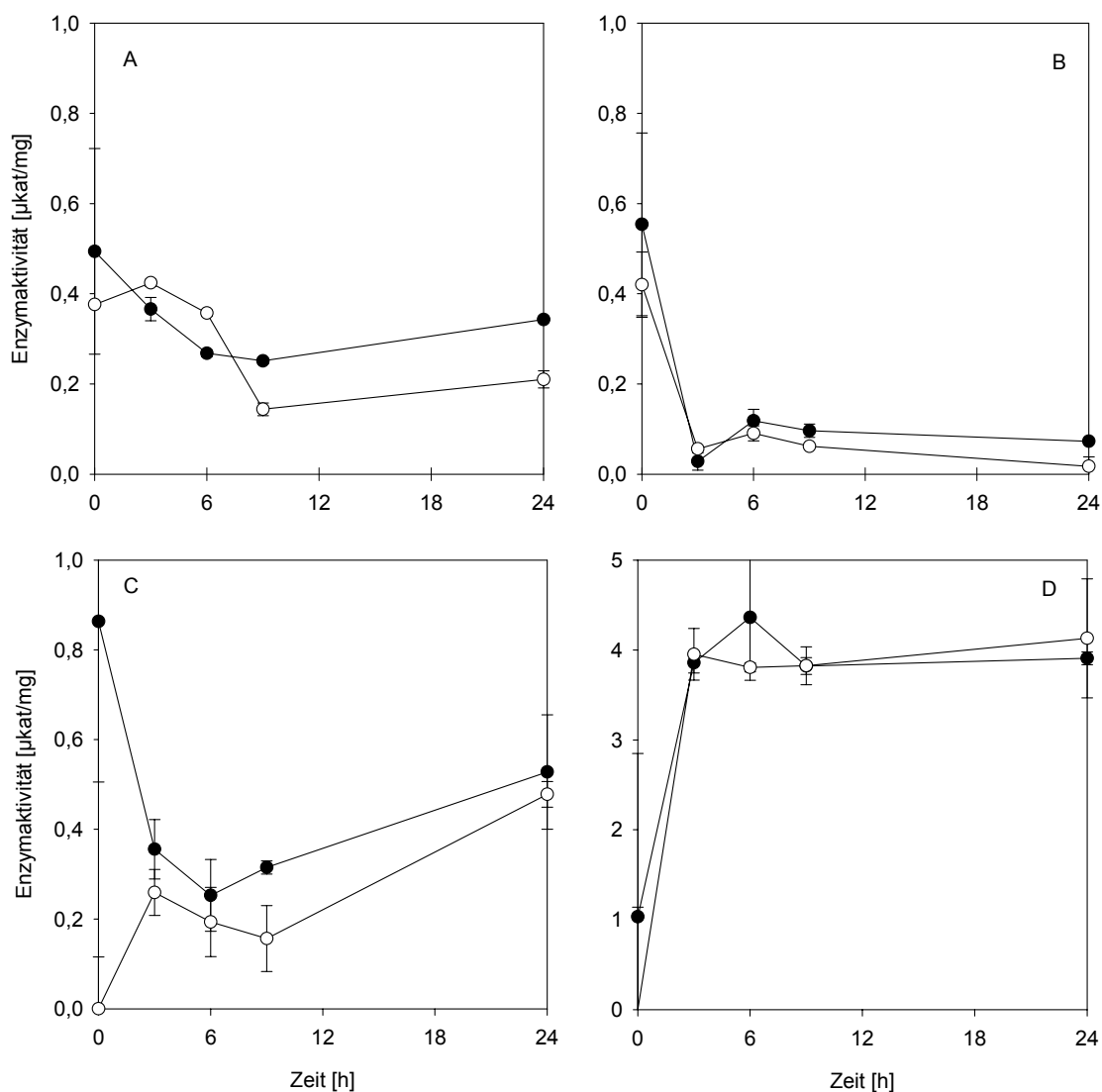
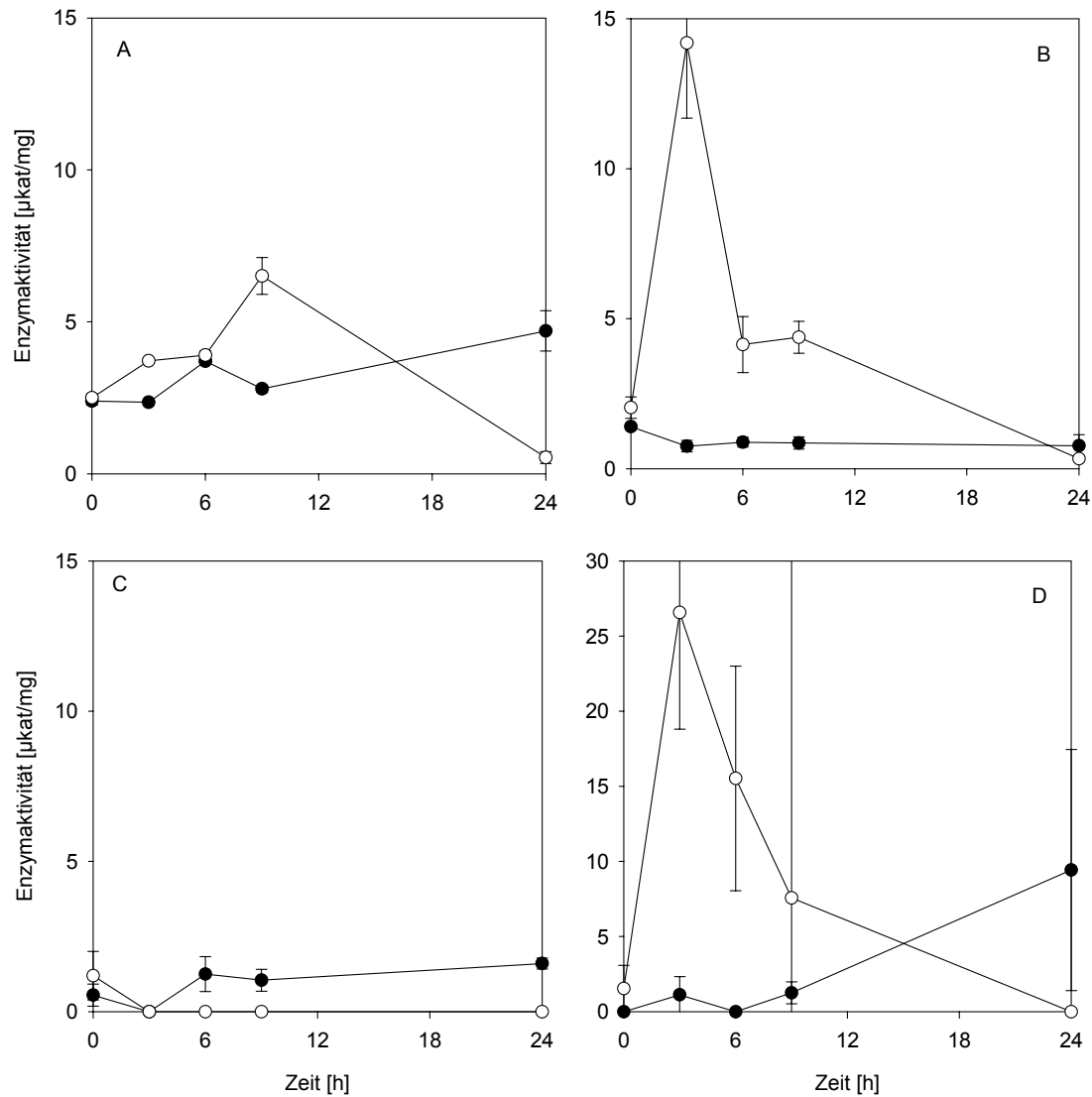


Abb. 39: Zeitliche Entwicklung der Umsatzraten der verschiedenen GSTs (Enzymaktivitäten in  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein) in sterilen Meerrettichwurzeln (schwarze Punkte) und in mit *Serratia liquefaciens* inokulierten Meerrettichwurzeln (weiße Punkte) nach Zugabe von GS-X. Umsatz von A – CDNB; B – DCNB; C – NBC und D – NBOC (aus: Diekmann et al. 2004).

3.1.2 Zugabe von  $\gamma$ GC-X

**Abb. 40:** Zeitliche Entwicklung der Umsatzraten der verschiedenen GSTs (Enzymaktivitäten in  $\mu\text{kat/mg}$  Protein) in sterilen Meerrettichwurzeln (schwarze Punkte) und in mit *Serratia liquefaciens* inokulierten Meerrettichwurzeln (weiße Punkte) nach Zugabe von  $\gamma$ GC-X. Umsatz von A – CDNB; B – DCNB; C – NBC und D – NBOC.

Innerhalb des pflanzlichen Organismus' werden die Xenobiotika nicht nur mit GSH konjugiert und auf diese Weise entgiftet, die GSH-Konjugate werden auch noch weiter metabolisiert. Erstes Abbauprodukt ist das  $\gamma$ GS-X (Bakke et al. 1994).

Darum wurde auch der Einfluß dieses Konjugates auf die Meerrettich-Wurzeln getestet.

Werden die sterilen Meerrettichwurzeln mit  $\gamma$ GC-X behandelt, wird die höchste Umsatzrate für CDNB nach 6 Std. erreicht. Sind die Wurzeln zusätzlich mit *Serratia liquefaciens* besiedelt, wird die höchste Rate erst nach 9 Std. festgestellt, die Aktivität ist jedoch deutlich höher als in den sterilen Wurzeln (Abb. 40A).

Eine Veränderung der Umsatzes für DCNB wird über die Zeit in den sterilen Wurzeln nicht gemessen (Abb. 40B). Dafür zeigen die *Serratia* inokulierten Wurzeln eine deutliche Reaktion. 3 Std. nach Inkubation steigt die Umsatzrate um den Faktor 5 an. Weitere 3 Std. später ( $t_6$ ) ist der Umsatz wieder verringert und nähert sich nach 24 Std. dem Kontrollwert an.

Der Umsatz von NBC ist in allen Behandlungen nur gering, in den *Serratia* besiedelten Wurzeln geht er sogar vollständig zurück (Abb. 40C).

Die sterilen Wurzeln zeigen weiterhin nur geringen Umsatz von NBOC (Abb. 40D), über die Zeit ist jedoch ein Anstieg der Aktivität festzustellen. Sind die Wurzeln mit *Serratia liquefaciens* besiedelt, wird 3 Std. nach Behandlung ein sehr hoher Umsatz von NBOC gemessen (etwa das 10fache gegenüber der Anfangsaktivität), der nur langsam wieder zurückgeht. Auch 9 Std. nach Inkubation ist die Umsatzrate noch verhältnismäßig hoch, nach 24 Std. jedoch wieder vollkommen unterdrückt.

Auch in dieser Versuchsreihe fällt auf, daß chemisch ähnliche Substrate völlig unterschiedlich umgesetzt werden. Ebenso ist bemerkbar, daß einige Substrate fast gar nicht umgesetzt werden, für andere dagegen extrem hohe Aktivitäten gemessen werden.

Die deutlichen Zunahmen der Aktivitäten infolge der Inkubation zeigen alle den bekannten Verlauf eines „bursts“, also eines sprunghaften Ansteigens der Enzymaktivitäten, wie es für den oxidativen burst nach Pathogeninfektion beschrieben ist.

Da dies ausschließlich in den mit *Serratia liquefaciens* inokulierten Wurzeln geschieht, scheint offenkundig eine enge Korrelation zwischen einer bakteriellen Besiedlung und der Reaktion auf  $\gamma$ GC-Konjugate zu bestehen.

## 3.1.3 Zugabe von Cys-X

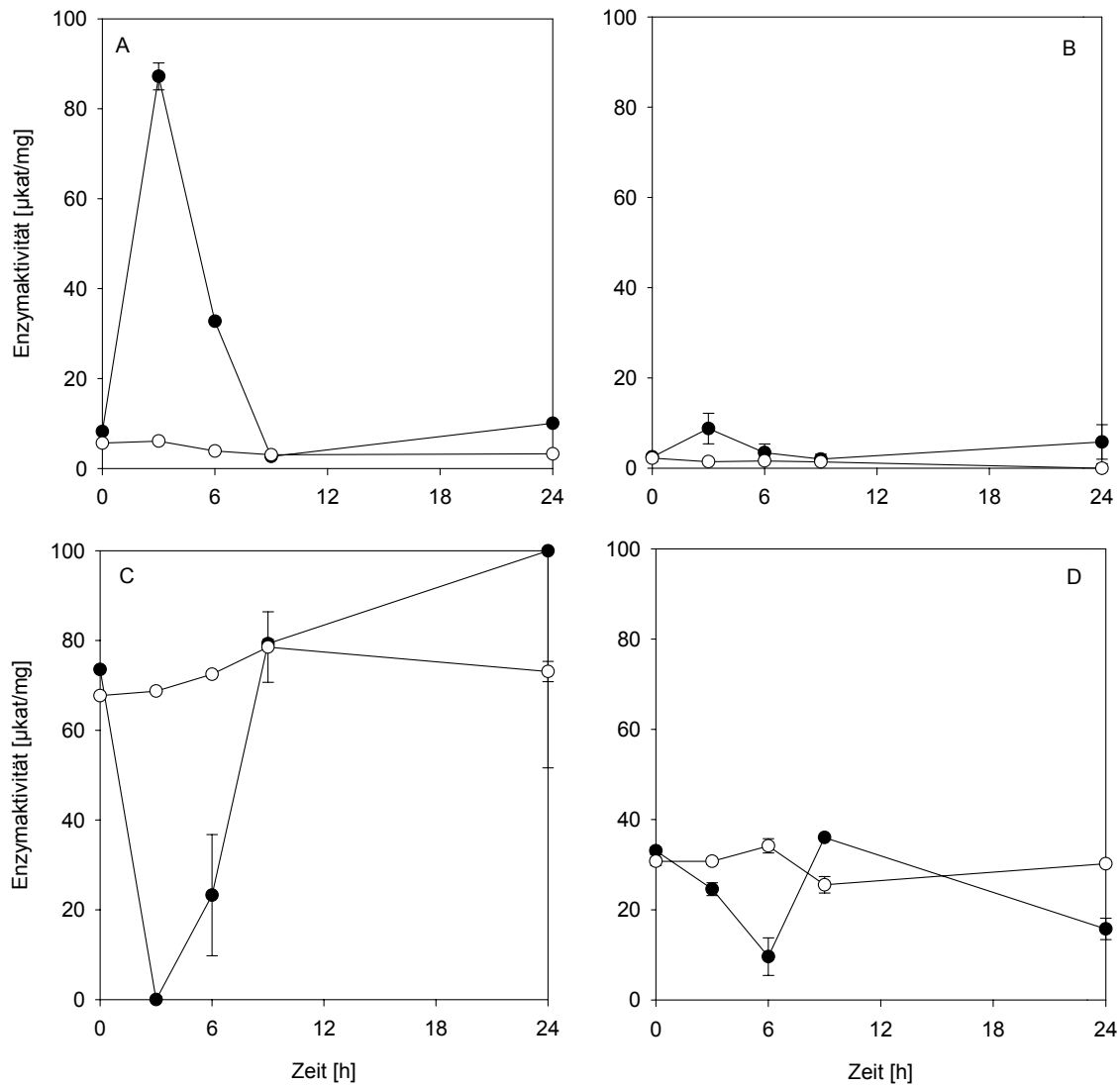


Abb. 41: Zeitliche Entwicklung der Umsatzraten der verschiedenen GSTs (Enzymaktivitäten in  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein) in sterilen Meerrettichwurzeln (schwarze Punkte) und in mit *Serratia liquefaciens* inokulierten Meerrettichwurzeln (weiße Punkte) nach Zugabe von Cys-X. Umsatz von A – CDNB; B – DCNB; C – NBC und D – NBOC.



Schließlich wurde auch noch der Einfluß des Cys-Konjugates auf die Meerrettich-Wurzeln getestet. Dieser Fremdstoff-Metabolit entsteht durch den weiteren Abbau des  $\gamma$ GC-Konjugates im Zuge der pflanzlichen Entgiftung (Lamoureux & Rusness 1993). Der Theorie nach sollte dieses Konjugat die geringsten Effekte hervorrufen.

Auch in dieser Versuchsserie wurden die größten Veränderungen innerhalb der ersten Stunden des Experimentes gemessen. Die sterilen Wurzeln erreichen das Maximum ihrer GST-Aktivität für den Umsatz von CDNB bereits nach 3 Std. Danach fällt die Aktivität wieder nahezu auf ihr Anfangsniveau zurück. Sind die Wurzeln mit *Serratia liquefaciens* inokuliert, zeigt sich über die gesamte Zeit kaum eine Veränderung in der Aktivität (Abb. 41A).

Das Muster des DCNB-Umsatzes ähnelt dem des CDNB-Umsatzes, die Aktivität beträgt jedoch nur etwa ein Zehntel (Abb. 41B). Auch hier haben die sterilen Wurzeln ihr Aktivitätsmaximum nach 3 Std., während die besiedelten Wurzeln nur marginale Veränderungen zeigen. Dies ist statistisch jedoch nicht abgesichert.

Die sterilen Wurzeln zeigen eine relativ hohe Anfangsaktivität für den NBC-Umsatz, die jedoch nach 3 Std. Inkubation mit Cys-X völlig zum Erliegen kommt. Bis zur 12. Std. steigt die Aktivität wieder auf Höhe der Anfangsaktivität an und erhöht sich bis zur 24. Std. noch weiter. Die *Serratia* inokulierten Wurzeln zeigen im Vergleich zu den sterilen Wurzeln keine nennenswerten Veränderungen im Umsatz von NBC (Abb. 41C).

Auch die Aktivität für den NBOC-Umsatz ist zu Beginn des Versuches in den Wurzeln (steril und besiedelt) sehr hoch (Abb. 41D).

In den sterilen Wurzeln geht diese Aktivität dann schrittweise zurück, erholt sich dann aber wieder, um dann bis zum Ende des Versuchs unter das Niveau der Anfangsaktivität abzusinken.

Deutlich schwächer reagieren die mit *Serratia liquefaciens* besiedelten Wurzeln. Ein geringer, aber doch signifikanter Unterschied des NBOC-Umsatzes ist zwischen der 6. und der 9. Std. meßbar. Generell sind die Veränderungen allerdings nur gering.

In dieser Versuchsreihe zeigte sich, daß CDNB und DCNB in ähnlicher Weise umgesetzt werden, die DCNB-Aktivität (Entwicklung entsprechender Enzyme ähnlich) jedoch nur einen Bruchteil der CDNB-Aktivität beträgt. Auch die Entwicklung der Aktivität der NBC- und NBOC-GST folgt einem ähnlichen Muster, wobei die NBOC-Aktivität wiederum nur einen Bruchteil der NBC-Aktivität ausmacht.

Besonders auffällig ist hier, daß es keine nennenswerten Veränderungen in den Enzymaktivitäten über die Zeit gibt, wenn die Wurzeln mit *Serratia liquefaciens* inokuliert sind.

#### 3.1.4 Peroxidase-Aktivität in Meerrettich-Wurzelkulturen

Ein weiterer Indikator für die Entgiftungskapazität und im weitesten Sinne ein Indikator für Streß ist die Peroxidase-Aktivität.

Die Peroxidase-Aktivität steigt in den sterilen Wurzeln bis zur 6. Std. nach der Zugabe von GS-X an und geht dann wieder zurück. In den *Serratia liquefaciens* besiedelten Wurzeln wird das Aktivitätsmaximum schon nach 3 Std. erreicht (Abb. 42A).

Die Aktivität beträgt aber nur etwa  $2/3$  gegenüber den Umsatzraten der sterilen Wurzeln. In allen Wurzeln geht die Aktivität wieder stark zurück, bleibt aber über den Kontrollen.

Auf die Zugabe von GS-X reagieren Meerrettich-Wurzeln auch im Fall der Peroxidase mit burst-ähnlicher Induktion. Diese tritt in besiedelten Wurzeln früher ein als in sterilen. In den sterilen Wurzeln ist sie jedoch heftiger, hier werden höhere Enzymaktivitäten gemessen.

Nach Erreichen der maximalen Umsatzraten fällt die Aktivität wieder zurück.

Werden die Wurzeln mit  $\gamma$ GC-X inkubiert, ist über die Zeit kaum eine Veränderung der Aktivität in den sterilen Wurzeln meßbar. Es gibt Hinweise auf eine leichte Zunahme der Aktivität, dies ist jedoch nicht signifikant (Abb. 42B).

Die besiedelten Wurzeln reagieren heftiger. So folgt nach einer anfänglichen Aktivitätsdepression zum Zeitpunkt  $t_3$  ein starker Anstieg.

Die Aktivität sinkt dann aber 24 Std. nach Inkubation ab, sie unterschreitet sogar die Anfangsaktivität.

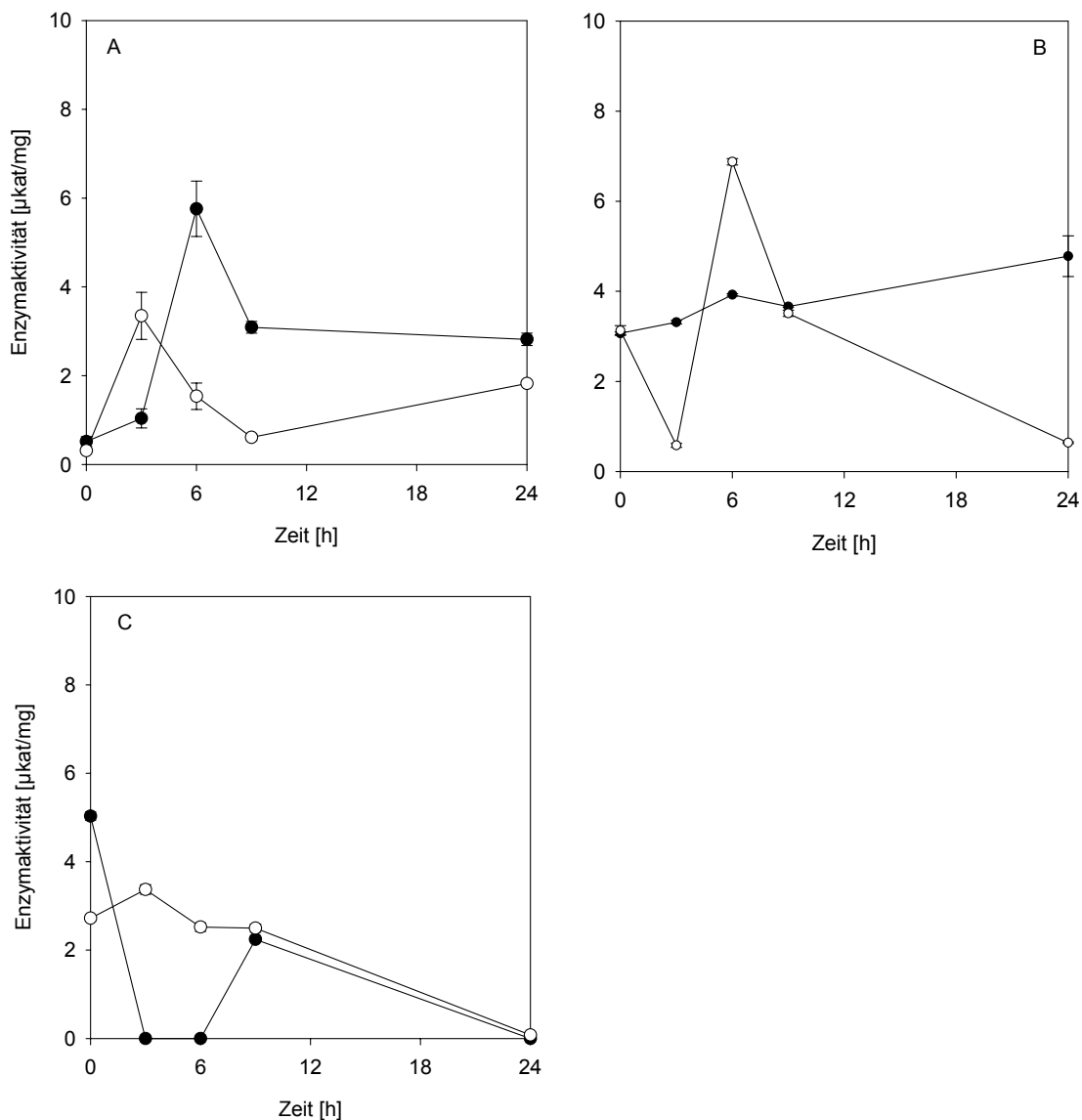
Auch dieser Verlauf ist rasch und transient und in Analogie zum oxidativen burst. Nach einer starken Aktivitätszunahme erfolgt ein deutlicher Abfall der Aktivität. Dies erfolgt jedoch nur in den besiedelten Wurzeln.

Wurden die sterilen Wurzeln mit Cys-X behandelt, bricht die Peroxidase-Aktivität, die anfänglich sehr hoch war, total ein. Auch 6 Std. nach der Zugabe kann kein Umsatz des Guaja-

cols gemessen werden. Erst 9 Std. nach Inkubation ist wieder Aktivität meßbar, weitere 15 Std. später ist keine Aktivität mehr feststellbar (Abb. 42C).

In den besiedelten Wurzeln folgt auf einen leichten Anstieg 3 Std. nach Konjugat-Zugabe ein kontinuierliches Abfallen der Aktivität. Eine statistische Absicherung dieses Effektes ist unbedingt erforderlich.

Generell ist die Peroxidase-Aktivität in *Serratia liquefaciens* besiedelten Wurzeln höher als in den sterilen Wurzeln. Die Reaktion auf extern zugegebenes GS-X ist verzögert.



**Abb. 42:** Entwicklung der Peroxidase-Aktivität [ $\mu\text{kat}/\text{mg}$ ] in sterilen Meerrettichwurzeln (schwarze Punkte) und in mit *Serratia liquefaciens* inokulierten Meerrettichwurzeln (weiße Punkte) nach Zugabe von A - GS-X, B -  $\gamma\text{GC-X}$  und C - Cys-X.

### 3.2 GST-Aktivitäten in mykorrhizierten Pflanzen

Die Enzymtests wurden mit den üblichen Substraten CDNB, DCNB und NBOC durchgeführt. Zusätzlich wurde noch der Umsatz von Fluorodifen gemessen. Dies ist ein Gräser-Herbizid aus der Klasse der Nitrophenlyether (Lamoureux et al. 1990). Die Entgiftung dieses Herbizids beruht auf einer Etherspaltung und anschließender nukleophiler Addition von GSH an den 2-Nitro-4-fluoromethylphenylrest unter Freisetzung eines Phenols. Da es bis vor wenigen Jahren in der Praxis angewendet wurde, ist eine Bestimmung der entsprechenden GST-Aktivität durchaus von Bedeutung.

#### 3.2.1 Gerste (*Hordeum vulgare* L.)

In den Wurzeln der Gerstenpflanzen ist die CDNB-Aktivität generell sehr hoch, wie an der Kontrolle ersichtlich (Abb. 43A). Diese wird jedoch von *Glomus mossea* stark und von *Acaulospora longula* nahezu vollständig unterdrückt. In *Glomus intraradices* sind die Umsatzraten dagegen deutlich erhöht.

Die Umsatzrate für DCNB ist nur sehr gering (Abb. 43B). Einzige Ausnahme bilden die *Acaulospora longula* besiedelten Wurzeln. Hier ist die Aktivität sogar extrem hoch (~100  $\mu\text{kat}/\text{mg}$ ).

Der Umsatz von Fluorodifen ist in den Wurzeln der Kontrollpflanzen um ein Vielfaches höher als alle übrigen bisher gemessenen Umsatzraten. Hier wurden Aktivitäten um die 6.000  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  gemessen (Abb. 43C).

Die *Acaulospora longula* und *Glomus intraradices* besiedelten Wurzeln zeigen dagegen kaum bis gar keine Aktivitäten.

Einzig die *Glomus mossea* mykorrhizierten Wurzeln zeigen ähnlich hohe Umsätze wie die unmykorrhizierten Kontrollwurzeln.

Interessanterweise ist ein Umsatz von NBOC in den Wurzeln der Kontrollpflanzen nicht meßbar, wohl aber in den mykorrhizierten Pflanzen (Abb. 43D). Am höchsten ist der Umsatz wiederum in *Glomus mossea*.

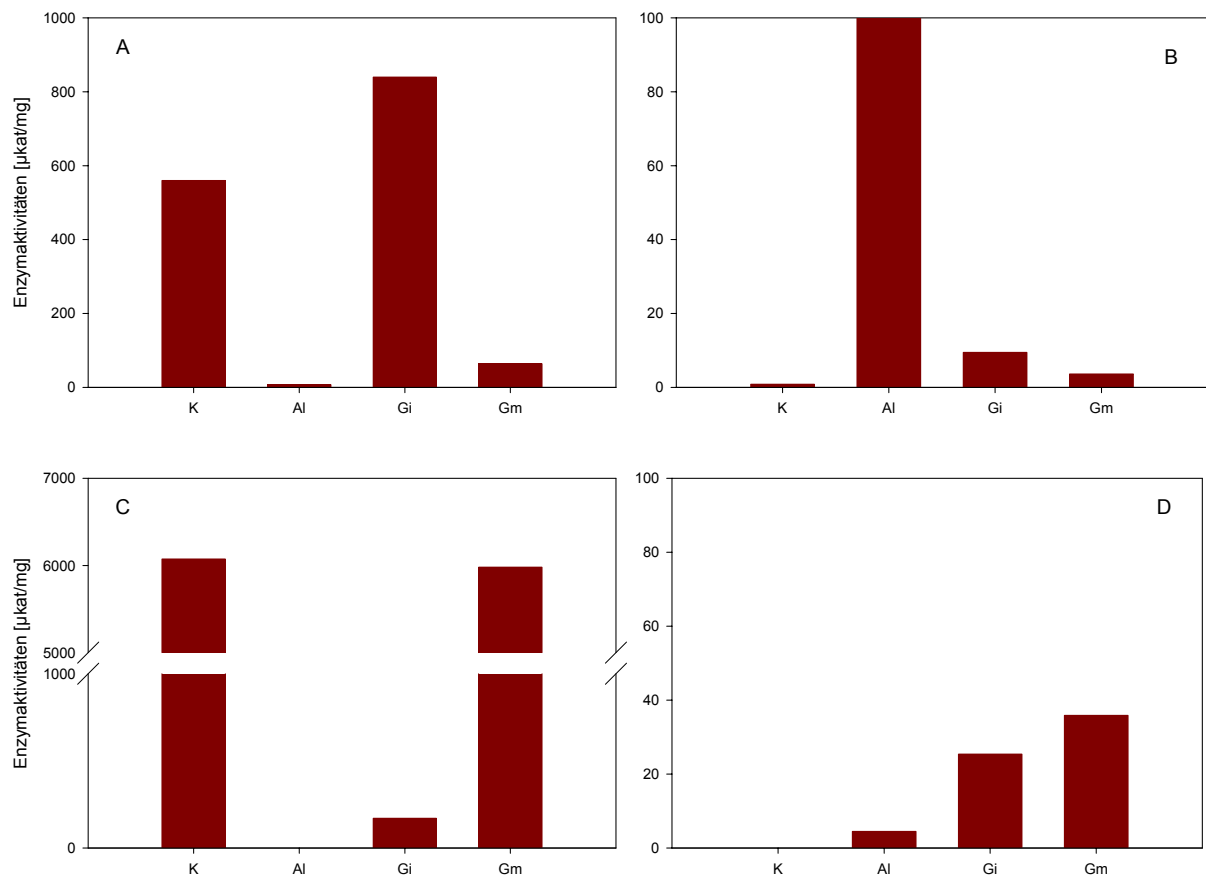


Abb. 43: Umsatzraten der verschiedenen GSTs (Enzymaktivitäten in  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein) in nicht-mykorrhizierten Gerstenwurzeln (K = Kontrolle) und mit *Acaulospora longula* (Al), *Glomus intraradices* (Gi) und *G. mossea* (Gm) mykorrhizierten Gerstenwurzeln. Umsatz von A – CDNB; B – DCNB; C – Fluorodifen und D – NBOC.

### 3.2.2 Spitzwegerich (*Plantago lanceolata* L.)

Spitzwegerich-Wurzeln scheinen keine Aktivität für CDNB-GST zu besitzen, es konnte keine in den Kontrollpflanzen gemessen werden. Durch die Besiedlung mit Mykorrhizapilzen wurde diese jedoch stark erhöht (Abb. 44A), wobei der Einfluß von *Glomus intraradices* nur gering ist.

Ein Umsatz von DCNB war in keinem Fall meßbar. Eine leichte Erhöhung des Umsatzes ist zu verzeichnen, wenn die Pflanzen mit einem Pilz der Gattung *Glomus* besiedelt sind (Abb. 44B).

Auch in Spitzwegerich ist der Umsatz von Fluorodifen gegenüber den übrigen Substraten extrem erhöht. Unmykorrhizierte Wurzeln zeigen Aktivitäten um die 13.000  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  (Abb. 44C). Diese Aktivitäten sind in *Acaulospora longula* besiedelten Wurzeln leicht, in *Glomus intraradices* besiedelten Wurzeln stärker reduziert.

Nach Besiedlung mit *Glomus mossea* können im Spitzwegerich die ohnehin hohen Enzymaktivitäten sogar noch weiter gesteigert werden.

Die Umsatzraten für Fluorodifen sind zwar nicht auf dem Niveau des CDNB-Umsatzes wie bei der Gerste, verglichen mit den Umsätzen für DCNB und NBOC sind sie aber dennoch extrem hoch.

Anders sieht es für den Umsatz von NBOC aus (Abb. 44D). Die Kontrollwurzeln weisen eine Aktivität auf, die mit Besiedlung von *Acaulospora longula* um das 8fache gesteigert wird. Sind die Wurzeln dagegen mit einem *Glomus* besiedelt, zeigt sich kein Umsatz mehr.

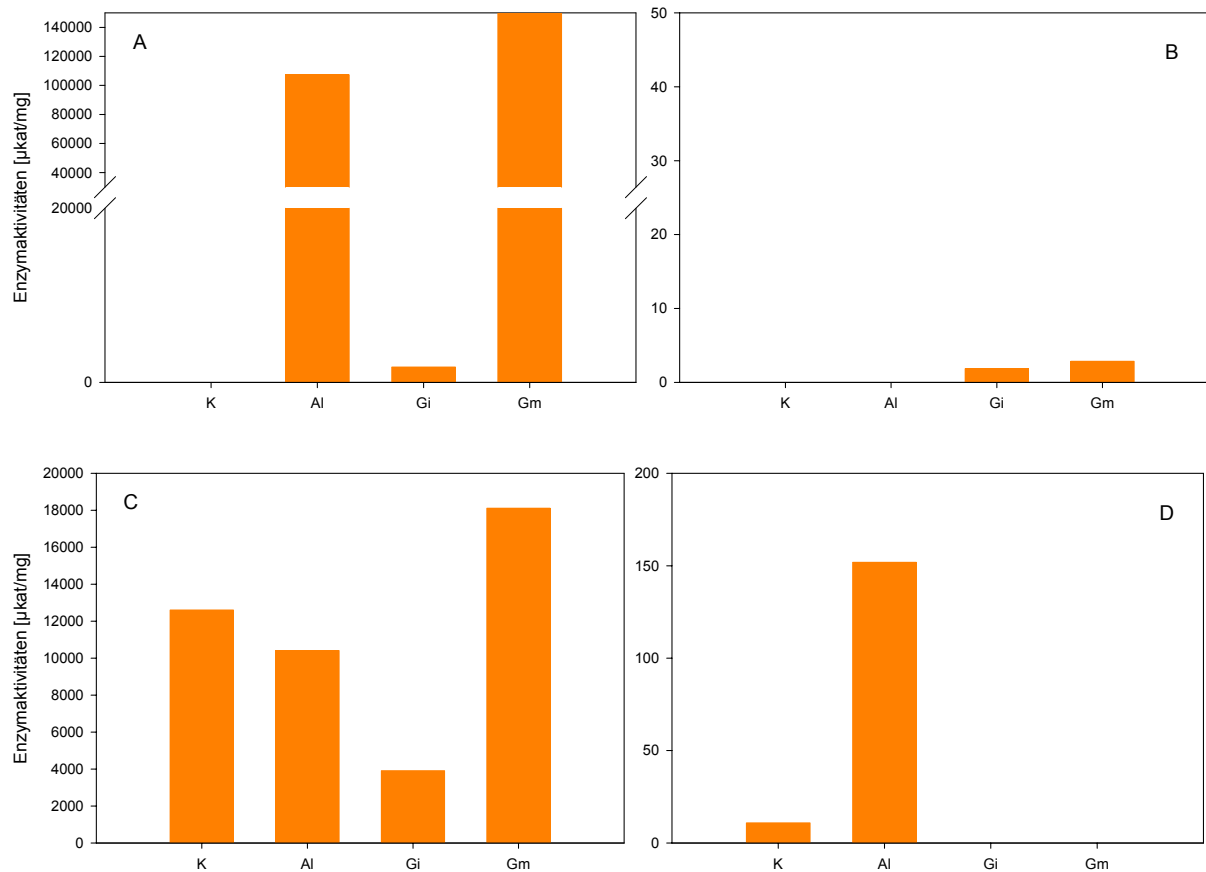


Abb. 44: Umsatzraten der verschiedenen GSTs (Enzymaktivitäten in  $\mu\text{kat/mg}$  Protein) in nicht mykorrhizierten Spitzwegerichwurzeln (K = Kontrolle) und mit *Acaulospora longula* (Al), *Glomus intraradices* (Gi) und *G. mossea* (Gm) mykorrhizierten Spitzwegerichwurzeln. Umsatz von A – CDNB; B – DCNB; C – Fluorodifen und D – NBOC.

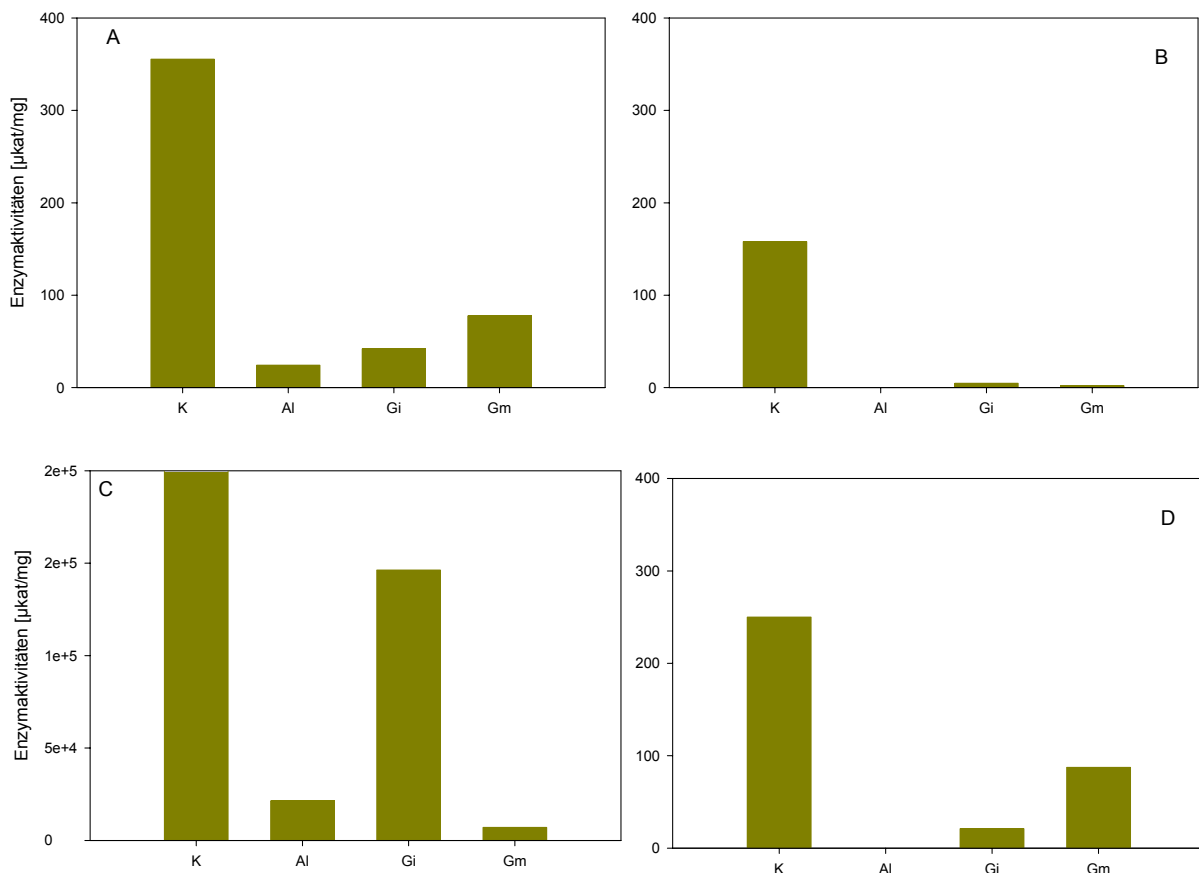
### 3.2.3 Blauschwingel (*Festuca glauca* L.)

In nicht-mykorrhizierten Schwingel-Wurzeln ist eine hohe CDNB-Umsatzrate meßbar. Ist die Wurzel mit einem beliebigen Mykorrhizapilz besiedelt, geht diese Enzymaktivität zurück (Abb. 45A). Ebenso verhält es sich mit den Umsatzraten für DCNB und NBOC (Abb. 45B, D). In den Kontrollwurzeln ohne Pilz ist stets eine höhere Enzymaktivität feststellbar als in mykorrhizierten Wurzeln.

In unbesiedelten Blauschwingelwurzeln konnten sehr hohe Umsatzraten für Fluorodifen gemessen werden (Abb. 45C).

Eine Besiedlung mit *Acaulospora longula* oder *Glomus mossea* unterdrückt diese Aktivitäten vollständig. Auch mit *Glomus intraradices*-Besiedlung bleiben die Aktivitäten für Fluorodifen-GST etwa 25 % hinter denen der Kontrolle zurück.

Auffällig ist auch hier wieder, dass die Aktivität der Fluorodifen-GST ein Vielfaches der übrigen GST-Aktivitäten beträgt.



**Abb. 45:** Umsatzraten der verschiedenen GSTs (Enzymaktivitäten in µkat/mg Protein) in nicht mykorrhizierten Blauschwingelwurzeln (K = Kontrolle) und mit *Acaulospora longula* (Al), *Glomus intraradices* (Gi) und *G. mossea* (Gm) mykorrhizierten Blauschwingelwurzeln. Umsatz von A – CDNB; B – DCNB; C – Fluorodifen und D – NBOC.



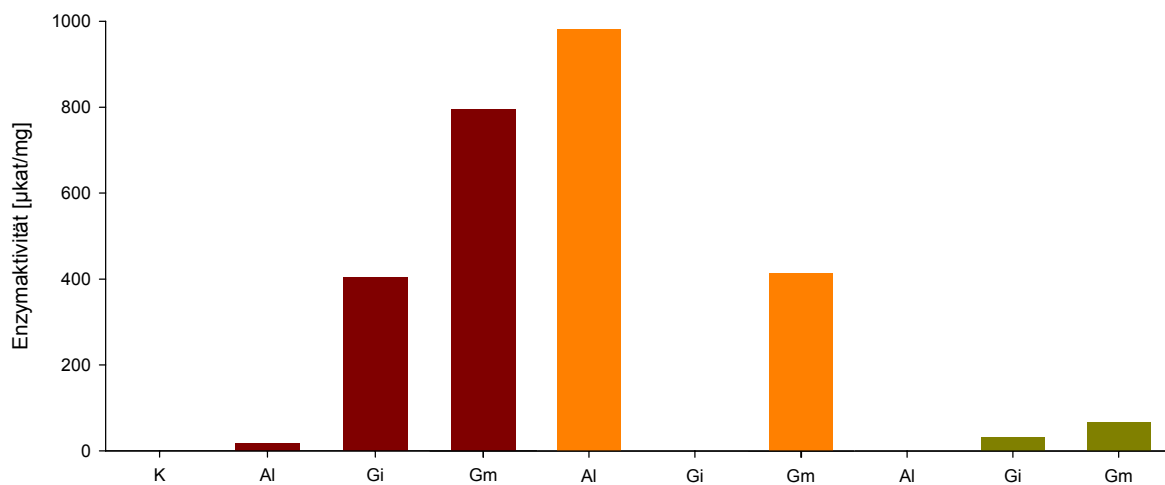
### 3.2.4 Peroxidase-Aktivität

Keine der Kontrollpflanzen zeigt signifikante Peroxidase-Aktivität mit dem Substrat Guajacol (Abb. 46).

Dagegen führt Mykorrhizierung stets zu einer Peroxidase-Aktivität. Die stärkste Aktivität ist meßbar, wenn Wegerich mit *Acaulospora longula* mykorrhiziert ist. Ist diese Pflanze mit einem *Glomus* besiedelt, verringert sich die Aktivität (*G. mossea*) oder geht sogar vollständig zurück (*G. intraradices*).

Auf Gerstenpflanzen trifft der umgekehrte Fall zu. Bei Besiedlung mit *Acaulospora longula* ist die Peroxidase-Aktivität am geringsten, bei einem *Glomus* dagegen deutlich erhöht.

Dieser Trend zeichnet sich auch für die *Festuca*-Wurzeln ab. Auffallend ist hier jedoch, daß die Peroxidase-Aktivitäten nur äußerst gering sind.



**Abb. 46:** Peroxidase-Aktivitäten der verschiedenen Pflanzen (dunkelrot = Gerste, orange = Spitzwegerich, oliv = Blauschwengel) mit den unterschiedlichen Mykorrhizapilzen. Angegeben ist die spezifische Aktivität in µkat/mg. K = Kontrolle, Al = *Acaulospora longula*, Gi = *Glomus intraradices*, Gm = *G. mossea*.

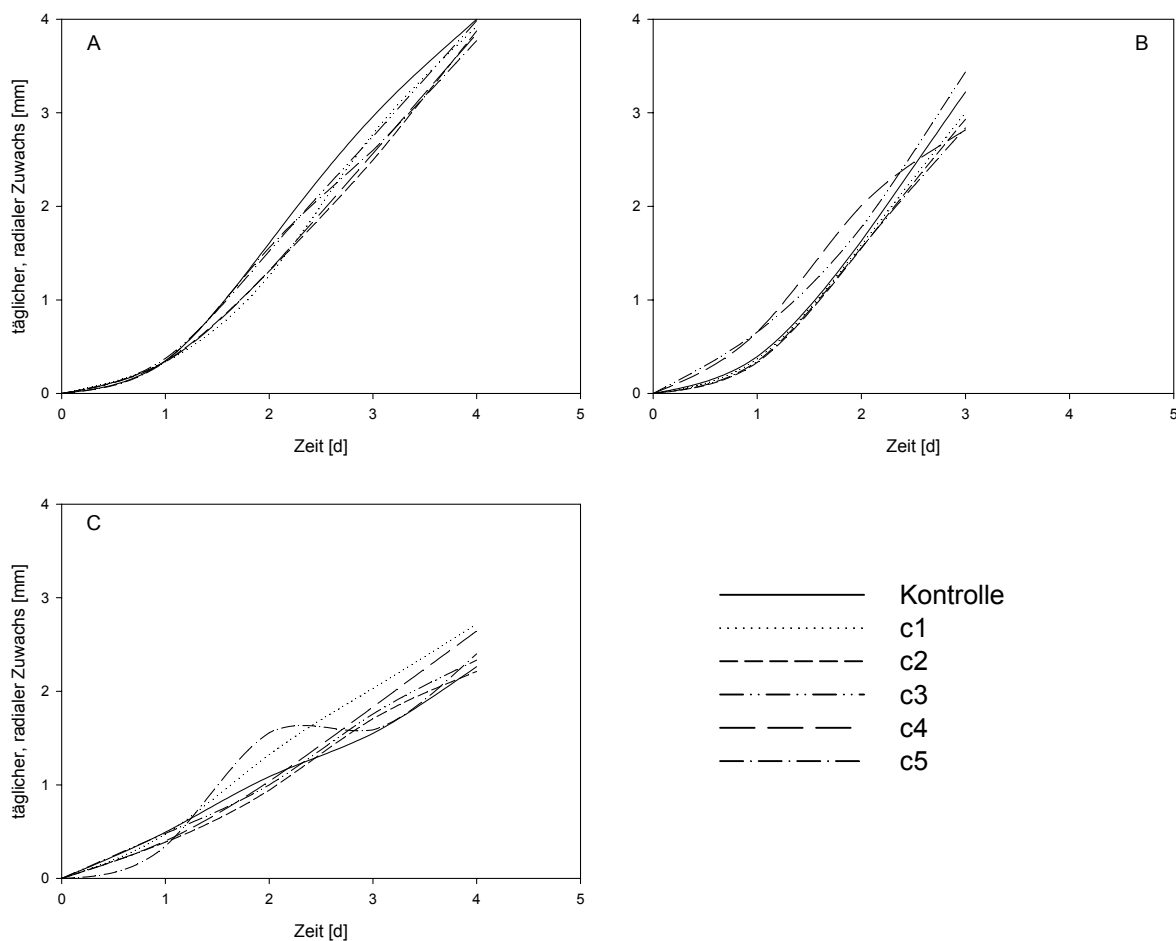
#### 4 Wirkungen auf GSTs in Bodenpilzen

Da mit arbuskulären Mykorrhizapilzen schlecht gearbeitet werden kann, wurden die Einflüsse auf das Wachstum von freilebenden Bodenpilzen untersucht.

##### 4.1 Einfluß des GSH-Konjugates auf den radialen Zuwachs

Es zeigte sich, daß die Konjugate keinen signifikanten Einfluß auf das Wachstum der Bodenpilze haben (Abb. 47). Zwischen der unbeeinflussten Kontrolle und den unterschiedlichen Konzentrationen gibt es keine signifikanten Unterschiede.

Einzige Ausnahme bildet *Fusarium graminearum* bei der Konzentration c5 (Abb. 47C). Der kurzfristige Wachstumsschub gleicht sich über die Zeit jedoch wieder aus und ist nicht signifikant.



**Abb. 47:** Täglich, radialer Zuwachs [mm] von drei Bodenpilzen (A = *Trichoderma* spp., B = *Chaetomium globosum* C = *Fusarium graminearum*) unter GS-X-Einfluß. Eine 15 mM Lösung (= c1) wurde in 10er Schritten von  $10^{-1}$  (= c2) bis  $10^{-4}$  (=c5) verdünnt zugegeben. Angegeben ist der Mittelwert aus drei Platten mit je vier über Kreuz liegenden Meßpunkten.

## 4.2 GSTs in den Bodenpilzen *Chaetomium (globosum)* und *Trichoderma* spp.

### 4.2.1 Zugabe von GS-X

Durch die Zugabe des GSH-Konjugates ist zunächst für beide Pilze ein Einbruch der GST-Aktivitäten feststellbar. Nur in zwei Fällen konnte eine Zunahme gegenüber den Anfangswerten gemessen werden (Abb. 48A1 (*Chaetomium*) – 15 mM und A2 (*Trichoderma*) – 1,5 mM). Im Laufe der Zeit nehmen die Aktivitäten wieder zu, wobei jedoch kein genereller Trend erkennbar ist.

Es scheint weiterhin keine Beziehung zwischen der zeitlichen Entwicklung der Aktivitäten und der Menge des zugegebenen Konjugates zu bestehen.

*Chaetomium* zeigt stets zum Zeitpunkt  $t_0$  die höchsten Aktivitäten, wenn eine geringe Menge des Konjugates zugegeben wurde.

*Trichoderma* zeigt dieses Phänomen nach Zugabe der höher konzentrierten Lösung.

Auffällig ist, daß die Aktivität für CDNB-GST in beiden Fällen nur gering ist, da durch die Zugabe des GSH-konjugierten CDNBs eine Zunahme zu erwarten war.

Die Pilze reagieren auf die GS-X-Gabe ähnlich wie die transformierten Meerrettich-Wurzeln. Auch in den Wurzeln war die Aktivität der CDNB-GST im Gegensatz zur Aktivität der NBOC-GST sehr gering.

Offenbar wird nicht, wie erwartet, die CDNB-GST induziert, sondern die NBOC-GST. Den Beobachtungen zufolge ist dies kein Phänomen, das in einzelnen Pflanzen auftritt, sondern sich über mehrere gänzlich unterschiedliche Organismen-Typen erstreckt.

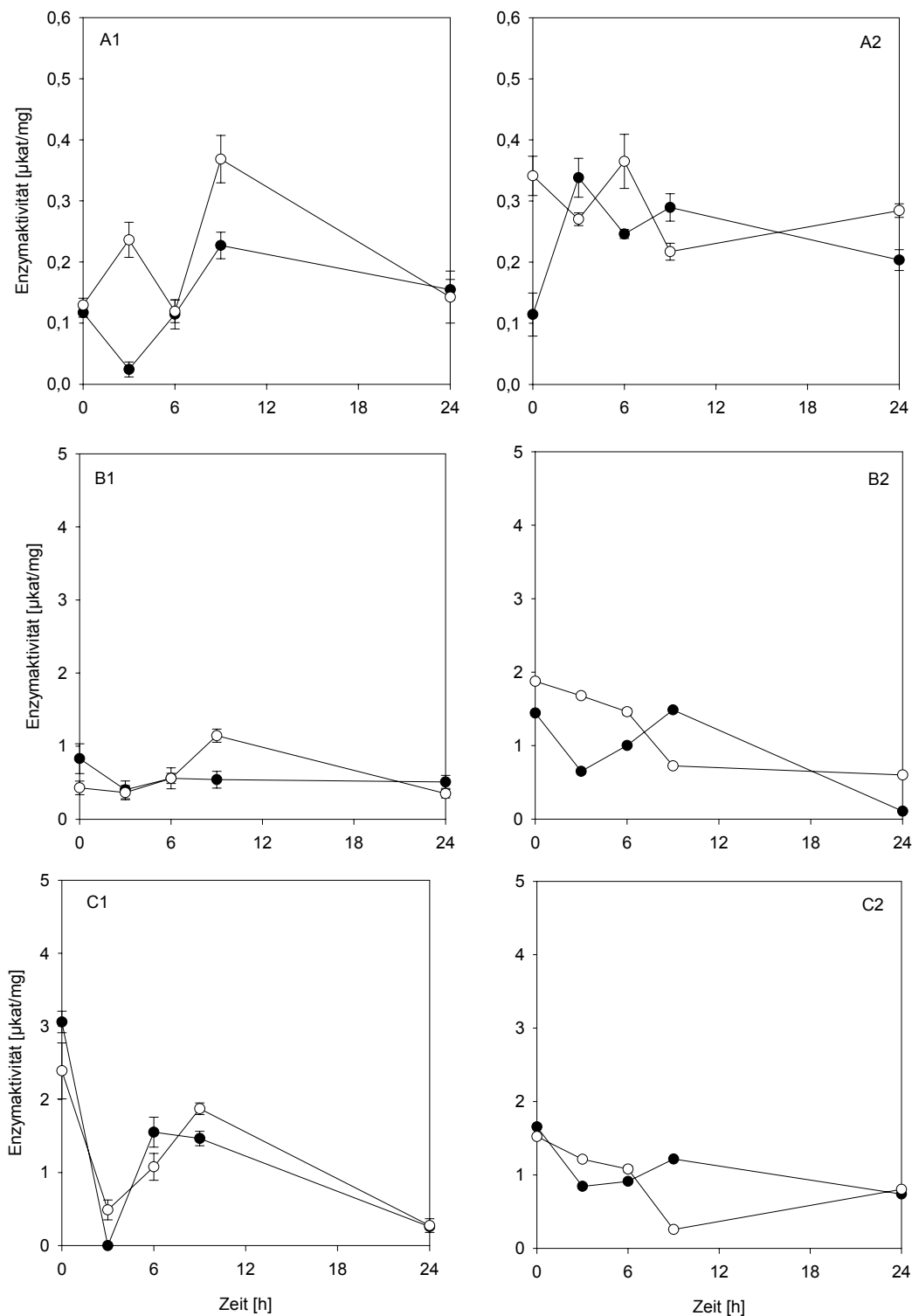


Abb. 48: Zeitliche Entwicklung der Umsatzraten verschiedener GSTs (Enzymaktivitäten in  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein) in Bodenpilzen nach Zugabe von GS-X. Links (1) *Chaetomium globosum*, rechts (2) *Trichoderma* spp. Weiße Punkte = 1,5 mM, schwarze Punkte = 15 mM. Angegeben ist der standardisierte Fehler bei  $n=3$ . Umsatz von A – CDNB; B – NBC und C – NBOC.

#### 4.2.2 Zugabe von Cys-X

Auf die Zugabe von Cys-X reagieren beide Pilze sehr heterogen in Bezug auf ihre GST-Aktivitäten (Abb. 49).

Das Aktivitätsmaximum erreicht *Chaetomium* wiederum 9 Std. nach der Zugabe des geringer konzentrierten Konjugates. In der höher konzentrierten Variante wird zu diesem Zeitpunkt eher die geringste Aktivität gemessen. Fällt die Aktivität in der geringer konzentrierten Variante nach 24 Std. Inkubation stark ab, ist dagegen in der hochkonzentrierten ein Anstieg zu verzeichnen.

Bei *Trichoderma* wird das erste Aktivitätsmaximum bereits nach 6 Std. gemessen – auch wieder in der geringer konzentrierten Variante. Nach einem Rückgang steigen die Aktivitäten ein weiteres Mal stark an.

In der höher konzentrierten Variante fällt vor allem das Einbrechen der Aktivität nach 6 bzw. 9 Std. auf. Es folgt jedoch stets eine Erholung.

Auf die Zugabe des Cys-X reagieren die Pilze mit einer Induktion der NBOC-GST. Dies steht im Gegensatz zu den Reaktionen der Meerrettich-Wurzeln, die nur verhaltene Aktivitäten der NBOC-GST zeigten. Dort war dagegen eine starke Induktion der CDNB-Aktivität meßbar.

Die nach GS-X-Gabe gemachte Beobachtung, daß dieses Konjugat in mehreren unterschiedlichen Organismen die gleichen GSTs induziert, ist auf die Cys-X-Gabe nicht übertragbar. Hier liegt offenbar ein anderer Sachverhalt vor.

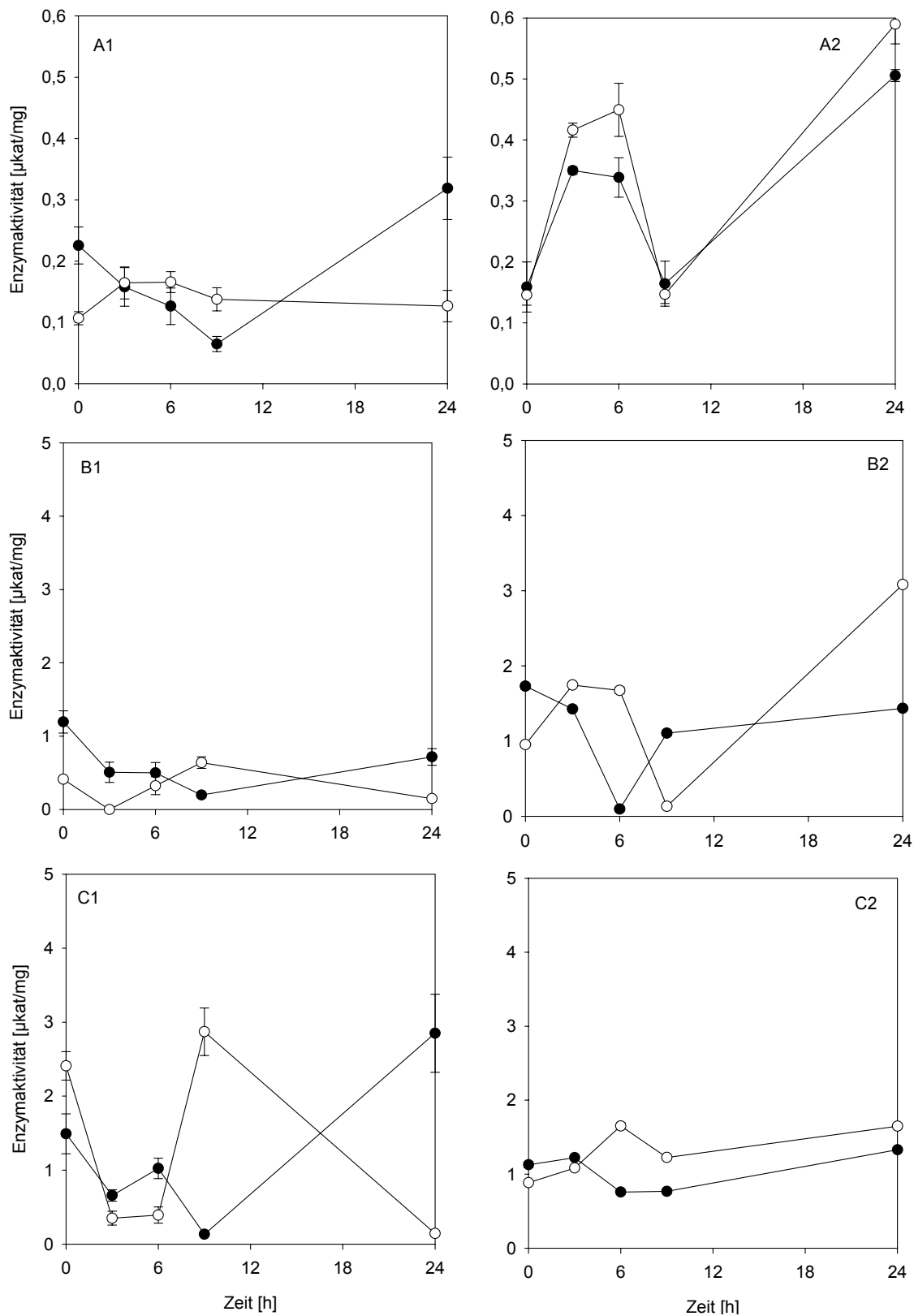


Abb. 49: Zeitliche Entwicklung der Umsatzraten verschiedener GSTs (Enzymaktivitäten in  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein) in Bodenpilzen nach Zugabe von Cys-X. Links (1) *Chaetomium globosum*, rechts (2) *Trichoderma* spp. Weiße Punkte = 1,5 mM, schwarze Punkte = 15 mM. Angegeben ist der standardisierte Fehler bei  $n=3$ . Umsatz von A – CDNB; B – NBC und C – NBOC.

### 4.2.3 Zugabe von CDNB

*Chaetomium* (links) reagiert auf die CDNB-Gabe zunächst mit einem Rückgang der GST-Aktivitäten. In der hochkonzentrierten Variante ist dies besonders ausgeprägt (Abb. 50). Über die Zeit kommt es jedoch wieder zu einem Anstieg. Dabei fällt auf, daß 6 Std. nach der Zugabe der 15 mM Lösung ein Anstieg gegenüber der 3stündigen Inkubation erfolgt. Dies ist in der 1,5 mM Variante nicht zu beobachten.

Erstaunlich ist, daß über die Zeit die gesamten GST-Aktivitäten in *Chaetomium* in der 15 mM Variante auf Null zurückgehen, wogegen sie in der geringer konzentrierten erst bei  $t_{24}$  ihr Maximum erreichen.

*Trichoderma* zeigt 3 Std. nach der Zugabe der hochkonzentrierten CDNB-Lösung für alle Substrate ein Maximum. Im weiteren Verlauf sinken die Aktivitäten wieder ab, um nach 24stündiger Inkubation wieder ein Maximum zu erreichen.

Ist die Lösung geringer konzentriert, tritt das erste Aktivitätsmaximum später ein. Danach folgt ein Abfallen der Aktivitäten.

Im Gegensatz zu *Chaetomium* bleiben in *Trichoderma* die GST-Aktivitäten in der höher konzentrierten Variante bis 24 Std. nach Inkubation auf einem erhöhten Niveau. In der geringer konzentrierten Variante sinken sie dagegen ab.

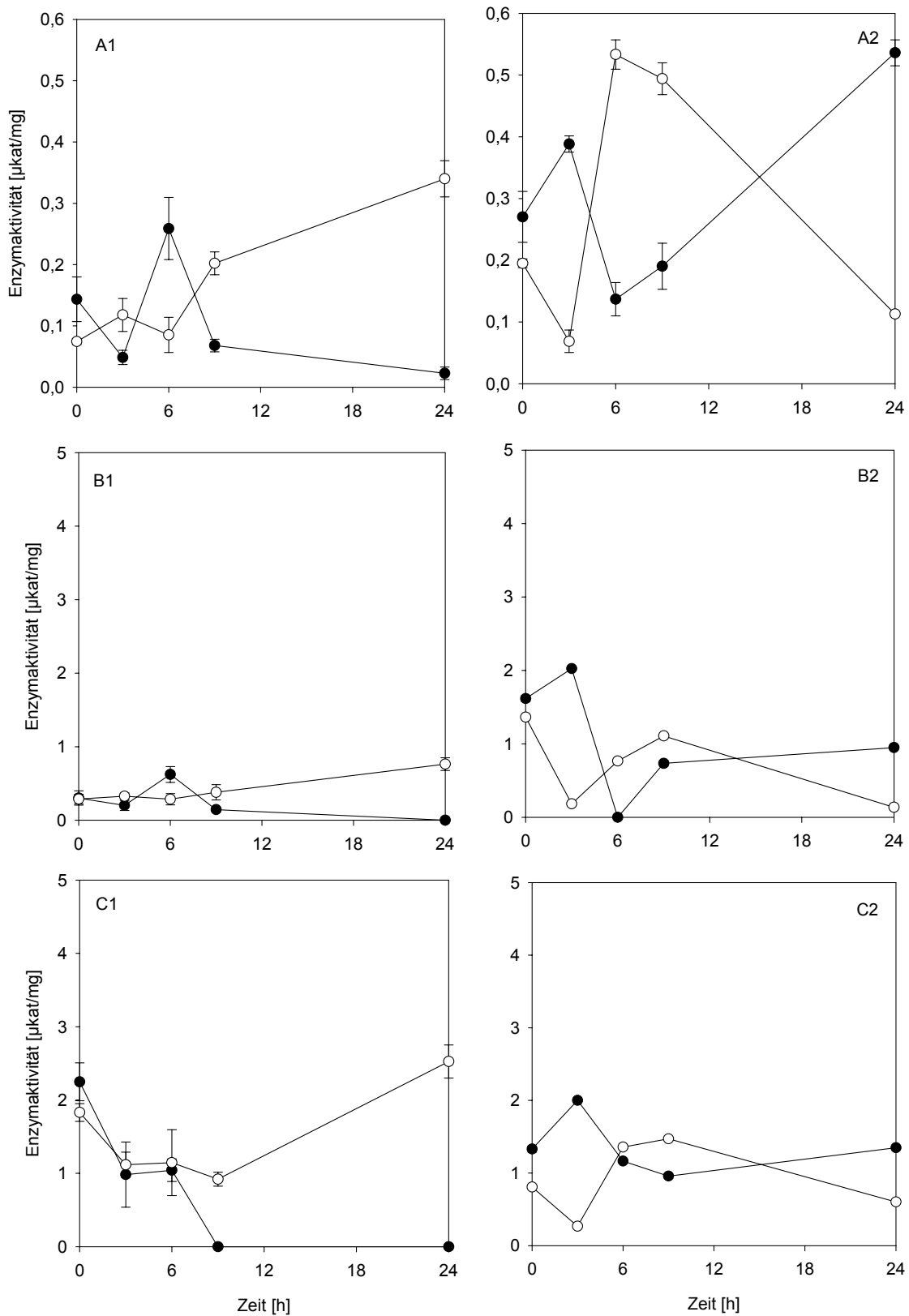


Abb. 50: Zeitliche Entwicklung der Umsatzraten verschiedener GSTs (Enzymaktivitäten in  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein) in Bodenpilzen nach Zugabe von CDNB. Links (1) *Chaetomium globosum*, rechts (2) *Trichoderma* spp. Weiße Punkte = 1,5 mM, schwarze Punkte = 15 mM. Angegeben ist der standardisierte Fehler bei  $n=3$ . Umsatz von A – CDNB; B – NBC und C – NBOC.



## 5 Wirkungen auf Bodenbakterien

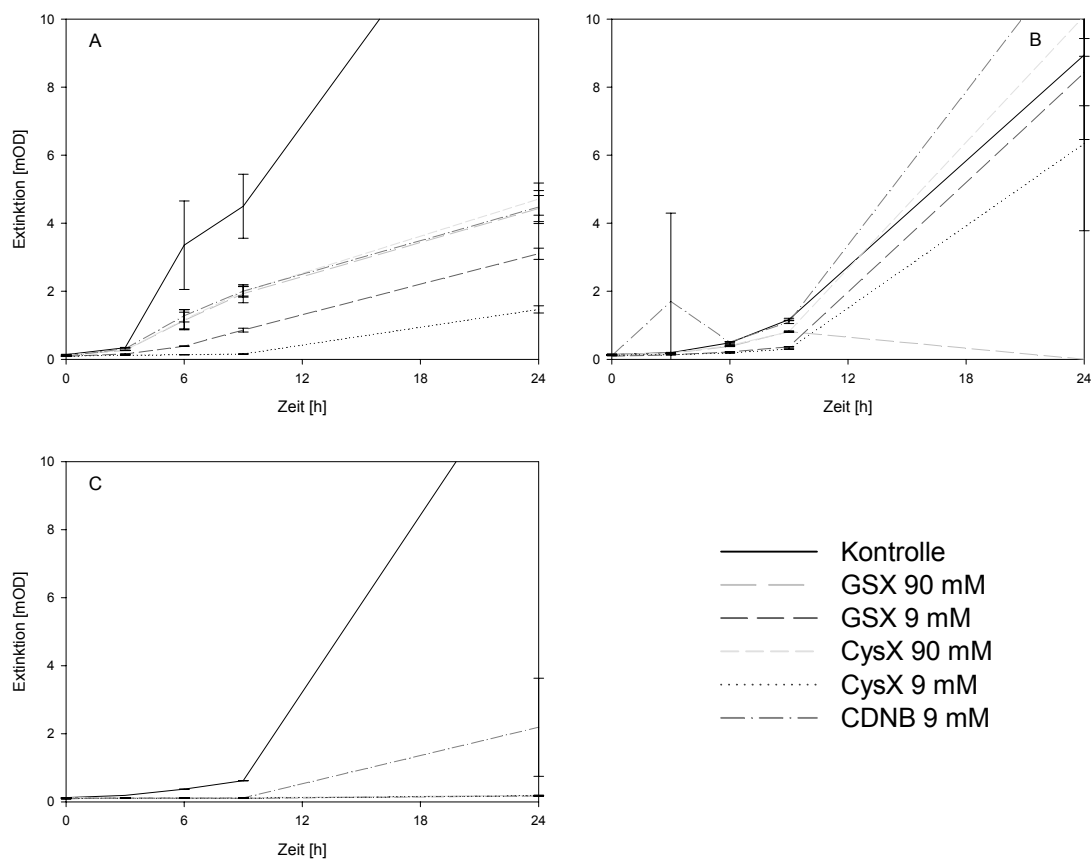
### 5.1 Bakterielles Wachstum in Flüssigkultur

Es zeigte sich, daß sowohl die verschiedenen Konjugate als auch die unterschiedlichen Konzentrationen sehr starken Einfluß auf das bakterielle Wachstum haben. Gegenüber der Kontrolle wachsen die Bakterien deutlich langsamer (Abb. 51).

Eine Ausnahme bildet *Burkholderia cepacia*, deren Wachstum unter CDNB-Einfluß sogar signifikant gesteigert wird (Abb. 51B). Daß das CDNB vergleichsweise positive Effekte auf das Wachstum hat, zeigt sich auch bei *Serratia liquefaciens* und *Burkholderia sacchari* (Abb. 51A und C). Auch ihr Wachstum scheint mit CDNB besser zu sein als mit einem Konjugat.

Die gemessenen Unterschiede zwischen den Konjugaten und CDNB sind jedoch nicht signifikant. Sie alle hemmen das Wachstum der Bakterien signifikant gegenüber der Kontrolle.

Bei Extinktionen über 4 handelt es sich um theoretische Werte. Sie kommen durch eine Verdünnung der Testlösung mit anschließender Umrechnung zustande.



**Abb. 51:** Entwicklung der Extinktion [mOD] der verschiedenen Bakterien-Kulturen (A = *Serratia liquefaciens*, B = *Burkholderia cepacia*; C = *B. sacchari*) nach Zugabe von GS-X, Cys-X und CDNB in den angegebenen Konzentrationen. Abgebildet sind die Extinktionen als Mittelwerte aus n = 3 sowie die Standardabweichungen.

## 5.2 BIOLOG-Versuch

Das BIOLOG®-System ist ursprünglich dafür entwickelt worden, um im medizinischen Bereich auf einfache Weise Bakterien identifizieren zu können. Für jede Gattung, teilweise sogar einzelne Arten, entstehen charakteristische Muster aus gefärbten und ungefärbten Wells in den BIOLOG®-Platten, je nachdem, ob die im Well vorliegende C-Quelle umgesetzt werden konnte. Aus der Literatur ist bekannt, daß diese Platten auch verwendet werden, um Veränderungen der Organismengemeinschaft im Boden nach PSM-Einsatz (z. B. Herbizide) zu messen (Araújo et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden definierte Bakterien in die Platten gegeben. Es sollte überprüft werden, ob einzelne Bakterien-Arten durch Zugabe von GSH-Konjugaten und deren Abbauprodukten  $\gamma$ GC-X und Cys-X sowie der Thiole und Modell-Xenobiotika gezielt im Wachstum gefördert oder gehemmt werden können. Somit sollten Rückschlüsse auf eine Beeinflussung der Rhizosphären-Flora möglich sein.

Sämtliche Meßergebnisse sind als Kreisdiagramme (wie oben beschrieben) abgebildet. Der Maßstab ist in allen Diagrammen gleich. Die Einteilung erfolgte gemäß der 6 chemischen Gruppen, wie in Abb. 52 dargestellt.

Die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse befinden sich im Anhang (V4, S. 174).

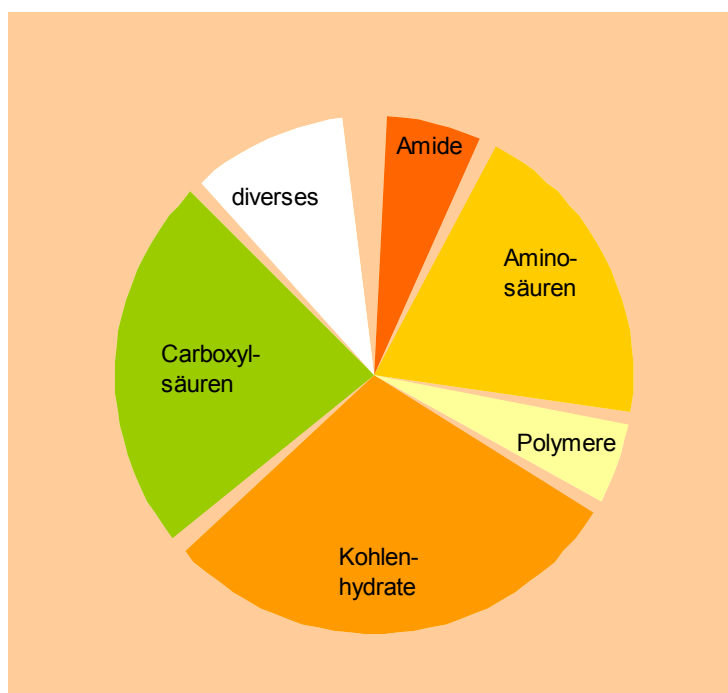


Abb. 52: Einteilung der Kreisdiagramme nach den chemischen Gruppen der BIOLOG® Microplates.

### 5.2.1 *Serratia liquefaciens*

#### Konjugate

Das GSH-Konjugat übt bereits 3 Std. nach Inkubation einen fördernden Einfluß auf die Bakterien aus (Bildtafel 1). Dabei bewirkt der Einfluß der Konzentration im Gesamtbild etwa eine Verdopplung der Bakterien gegenüber der Kontrolle. Es fällt allerdings auf, daß die geringe Konzentration das Wachstum in Kombination mit einer Carboxylsäure (Sebacinsäure) und 2,3-Butanediol stark fördert, wohingegen die höhere Konzentration das Wachstum in Kombination mit Lactulose fördert.

Nach 24 Std. sind die Wachstumsunterschiede geringer. Zeigt die gering konzentrierte Variante ein Muster, das dem nach 3 Std. mehr oder weniger ähnelt, sind die Unterschiede in der höher konzentrierten Variante stärker. In einigen wells konnte schließlich kein Wachstum mehr festgestellt werden.

Einzig unter Sebacinsäure-Einfluß ist noch eine deutliche Förderung des Wachstums meßbar (Bildtafel 1).

Werden die Bakterien mit reinem GS-DNB inkubiert, so wird zunächst das Wachstum gehemmt (Bildtafel 1). Diese Hemmung fällt in der geringer konzentrierten Variante stärker aus als in der höher konzentrierten.

Nach 24 Std. zeigen sich keine Unterschiede, weder gegenüber der Kontrolle noch der verwendeten Konjugat-Konzentration.

Gibt man zu den Bakterien  $\gamma$ GC-DNB, so ist hier das Wachstum zunächst gehemmt (Bildtafel 2). Mehr Konjugat hemmt weniger, vor allem im Zusammenhang mit Carboxylsäuren (Sebacinsäure). Mehr Konjugat führt eher zu einer Wachstumsförderung.

Über die Zeit verschwindet die Hemmwirkung der  $\gamma$ GC-Konjugate. Besonders bei Anwesenheit von Sebacinsäure wird das Wachstum gegenüber der Kontrolle gefördert.

Über die Zeit ist kein Einfluß der Konjugate auf das bakterielle Wachstum meßbar, höher konzentriertes Konjugat scheint aber in allen Fällen einen positiven Einfluß zu haben.

Der Einfluß des Cys-Konjugates ähnelt im Wesentlichen dem Einfluß des  $\gamma$ GC-Konjugates. Das Wachstum ist zunächst gehemmt gegenüber der Kontrolle, später ist es jedoch wieder ausgeglichen. Eine höhere Konjugat-Konzentration hat leicht wachstumsfördernden Einfluß.

Auf das Cystein-Konjugat reagiert *Serratia liquefaciens* ähnlich: in der geringen Konzentration entspricht der Umsatz der unbeeinflussten Kontrolle, hohe Konzentrationen bewirken, daß einige Carboxylsäuren überhaupt nicht mehr genutzt werden können (Bildtafel 2).

Die höher konzentrierten Konjugat-Lösungen haben einen stärkeren Einfluß auf das bakterielle Wachstum als die geringer konzentrierten.

Anfängliche Wachstumsschwierigkeiten werden über die Zeit ausgeglichen. Unter GS-X-Einfluß wird das Wachstum von *Serratia liquefaciens* gefördert. Cys-X und  $\gamma$ GC-X, die sich in ihrer Wirkung kaum unterscheiden, hemmen das Wachstum zunächst, es erfolgt jedoch ein Ausgleich mit Anpassung an die Entwicklung in den Kontrollplatten. Das überdurchschnittliche Wachstum wie unter GS-X-Einfluß wird jedoch nie erreicht.

#### Thiole

Gering konzentriertes GSH kann das Wachstum 3 Std. nach der Zugabe stark fördern, vor allem dann, wenn L-Phenylalanin, D-Galacturonsäure oder  $\alpha$ -Keto-Glutarsäure als weitere Nahrungsquelle angeboten werden (Bildtafel 3a und b).

In Anwesenheit der Kohlenhydrate wachsen die Bakterien nur geringfügig schwächer als in der Kontrolle. In allen übrigen wells ist das Wachstum eher gehemmt.

Ist das GSH höher konzentriert, bleibt das Wachstum deutlich hinter der Kontrolle zurück.

Nach 24 Std. ist das Wachstum stark gefördert. Besonders in der Gruppe der Carboxylsäuren wachsen die Bakterien verstärkt.

Allem Anschein nach ist die Wirkung des Thiols von der Konzentration abhängig, denn in Anwesenheit von mehr GSH wachsen die Bakterien schneller.

Wie schon unter GSH-Einfluß wächst *Serratia liquefaciens* nach  $\gamma$ GC-Zugabe zunächst langsamer (Bildtafel 3 a und b). Ist eine Substanz aus der Gruppe der Aminosäuren zugegen, bestehen kaum Unterschiede zur Kontrolle. Eine Ausnahme bildet L-Ornithin, hier wird das Wachstum stark gefördert.

Auch  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Hydroxybuttersäure, zwei Carboxylsäuren, haben positive Effekte auf das Wachstum. Ist das Thiol höher konzentriert, ergibt sich ein anderes Bild. Hier sind die Unter-

schiede zwischen den einzelnen wells sehr groß. In vielen wells findet gar kein Wachstum statt, in einigen wenigen ist das Wachstum dafür drastisch verbessert.

Wird *Serratia liquefaciens* 24 Std. mit  $\gamma$ GC inkubiert, so hat das z. T. stark fördernden Einfluß auf das bakterielle Wachstum. Nur in wenigen wells stagniert es.

Die Wirkung ist auch hier von der Konzentration abhängig. Je mehr Thiol zu den Bakterien gegeben wird, desto größer ist die Förderung. Es fällt auf, daß in der höher konzentrierten Variante vor allem mehr Carboxylsäuren und Kohlenhydrate umgesetzt werden als in der niedriger konzentrierten.

Auch das Cys unterdrückt zunächst das Wachstum von *Serratia liquefaciens* (Bildtafel 3a und b). Einzig in Verbindung mit  $\alpha$ -Keto-Glutarsäure, D-Galacturonsäure oder Urocansäure, bzw.  $\alpha$ -Keto-Valeriansäure und L-Alaninamid in der höher konzentrierten Variante, ist das Wachstum stark gefördert.

War bei GSH- und  $\gamma$ GC-Zugabe das Wachstum entweder in den Kohlenhydrat- oder Aminosäure-haltigen wells genauso wie in der Kontrolle, so ist es nach Cys-Zugabe in den wells beider Gruppen ausgeglichen.

Wird die Cys-Konzentration erhöht, verschwindet diese Auffälligkeit und schlägt in eine geringfügige Wachstumsminderung um. Steht neben dem Cys auch  $\alpha$ -Keto-Glutarsäure oder D-Galacturonsäure als Nahrungsquelle zur Verfügung, erfährt das Wachstum eine starke Förderung.

Über die Zeit nimmt das Wachstum vor allem in der gering konzentrierten Variante zu. Das Muster ähnelt dem von gering konzentriertem  $\gamma$ GC nach 24 Std. Ist das Cys höher konzentriert, ist das Wachstum zwar auch gefördert, doch nicht so stark wie bei der geringeren Cys-Gabe (Bildtafel 3 a und b).

Anfängliche Wachstumsschwierigkeiten werden im Laufe der Zeit ausgeglichen.

Es ist kein Trend erkennbar, ob das Thiol oder dessen Konzentration einen entscheidenden Einfluß hat.

Die Auswirkungen der Thiole auf das bakterielle Wachstum sind gänzlich anders als die der Konjugate.

#### Modell-Xenobiotika

Das freie, unkonjugierte CDNB hat, gering konzentriert, in den ersten 3 Std. einen erstaunlich positiven Effekt auf das Wachstum. Steht noch D-Glucuronsäure zur Verfügung, wächst *Serratia liquefaciens* sogar besser als die Kontrolle (Bildtafel 4).

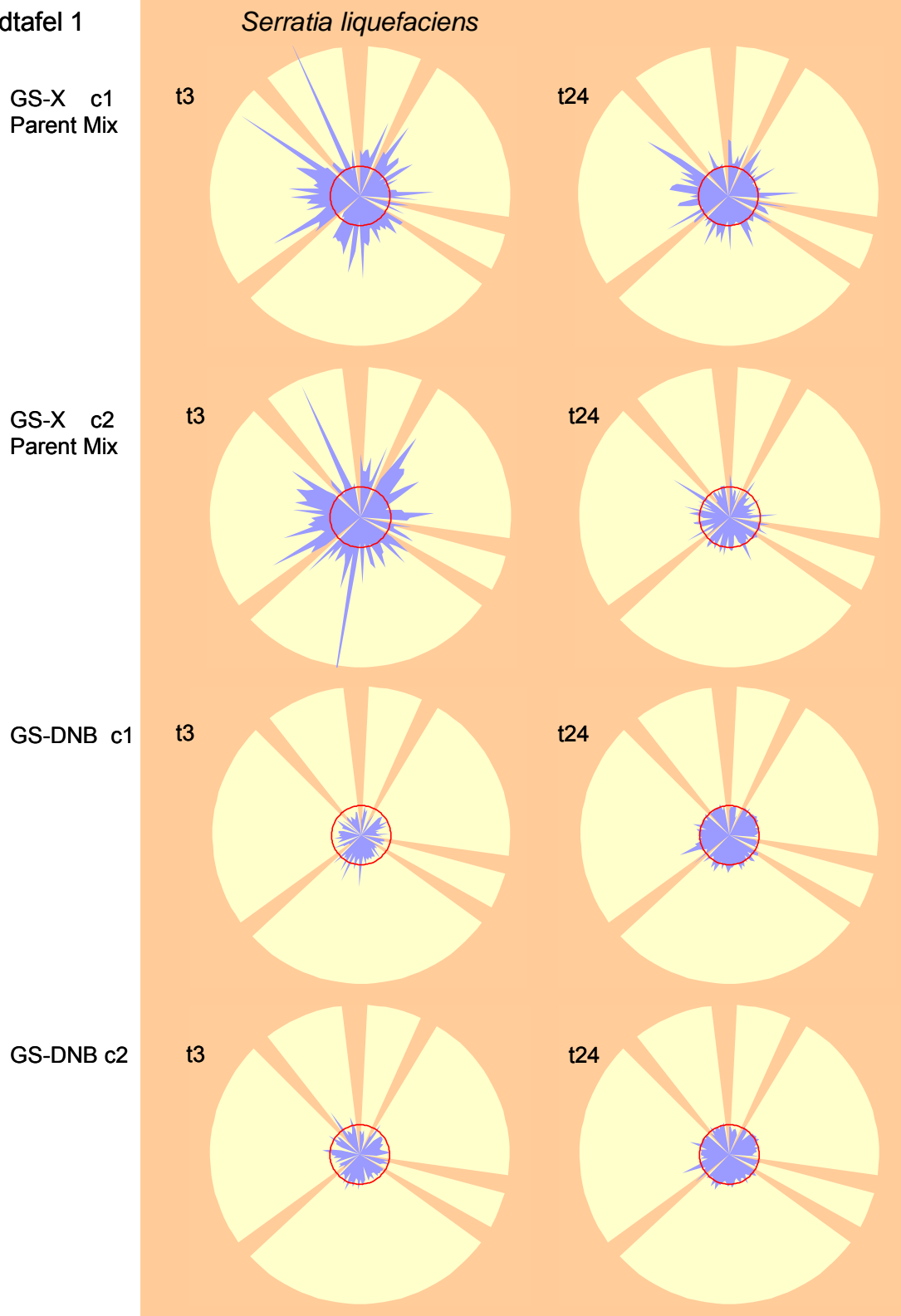
Ist das CDNB höher konzentriert, wird das Wachstum von *Serratia liquefaciens* deutlich gehemmt.

Nach 24 Std. entsteht ein Muster in der gering konzentrierten Variante, daß Ähnlichkeiten mit denen der Thiole ausweist. Es tritt eher eine Wachstumsförderung auf.

Das DCNB dagegen hemmt das Wachstum von *Serratia liquefaciens* in beiden verwendeten Konzentrationen. Vereinzelt treten in der gering konzentrierten Variante Förderungen auf. Diese verschwinden jedoch im Laufe der Zeit (Bildtafel 4).

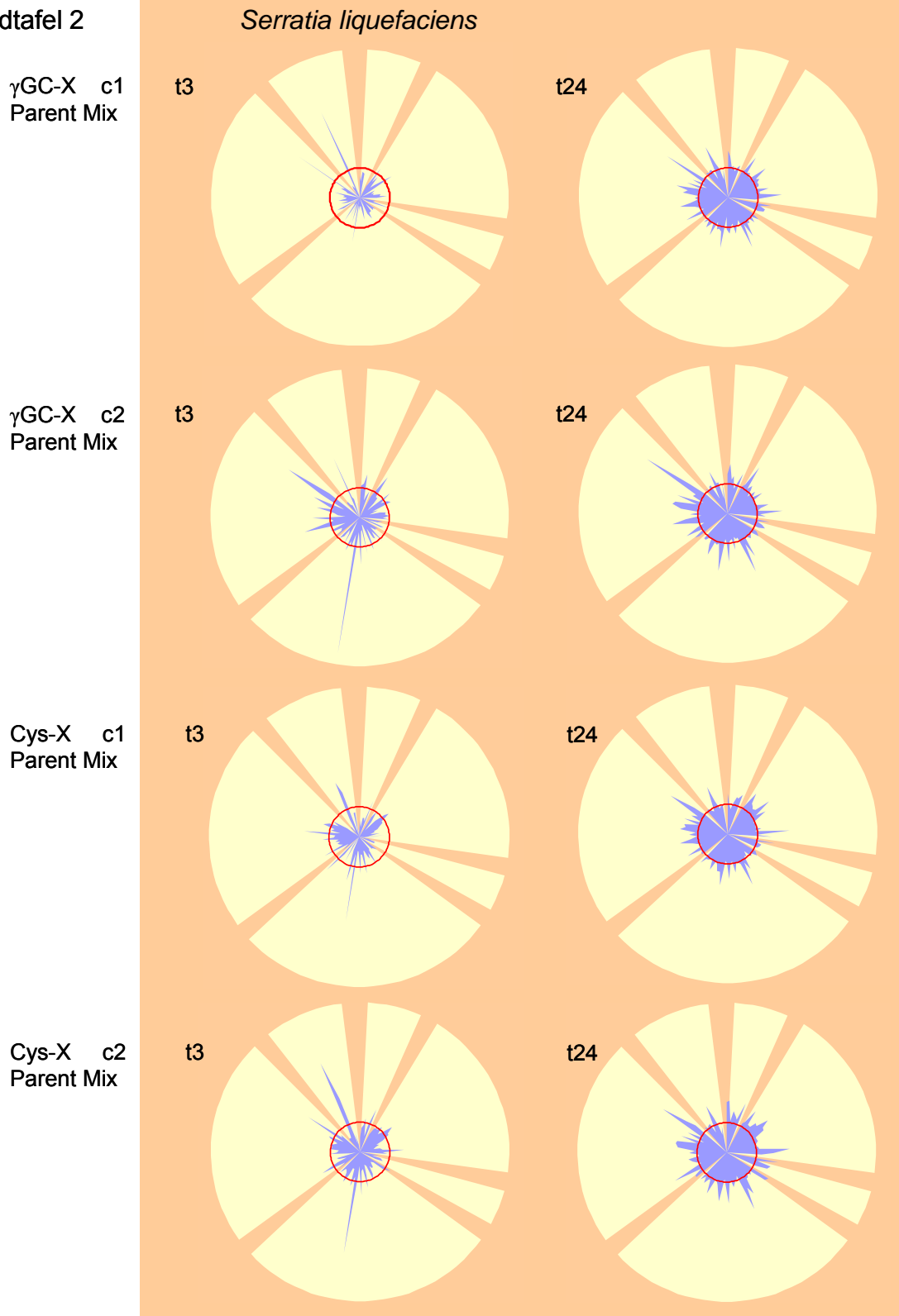
CDNB kann das Wachstum von *Serratia liquefaciens* fördern, eine >2 mM konzentrierte Lösung hat jedoch hemmenden Einfluß. DCNB unterdrückt dagegen das bakterielle Wachstum.

Bildtafel 1



**Legende:** Die Bildtafeln zeigen die Veränderungen des bakteriellen Wachstums nach Zugabe der links angegebenen Lösung ( $c1 = 0,45 \text{ mM}$ ,  $c2 = 2,2 \text{ mM}$ ).  $t3 = 3 \text{ Std.}$  Inkubation,  $t24 = 24 \text{ Std.}$  Inkubation. Der rote Ring gibt die unbeeinflusste Kontrolle als Verhältnis zu sich selbst an. Blau dargestellt ist das Verhältnis von Behandlung zur Kontrolle. Die Kreisdiagramme sind in die 6 chemischen Gruppen der C-Quellen in den Platten unterteilt.

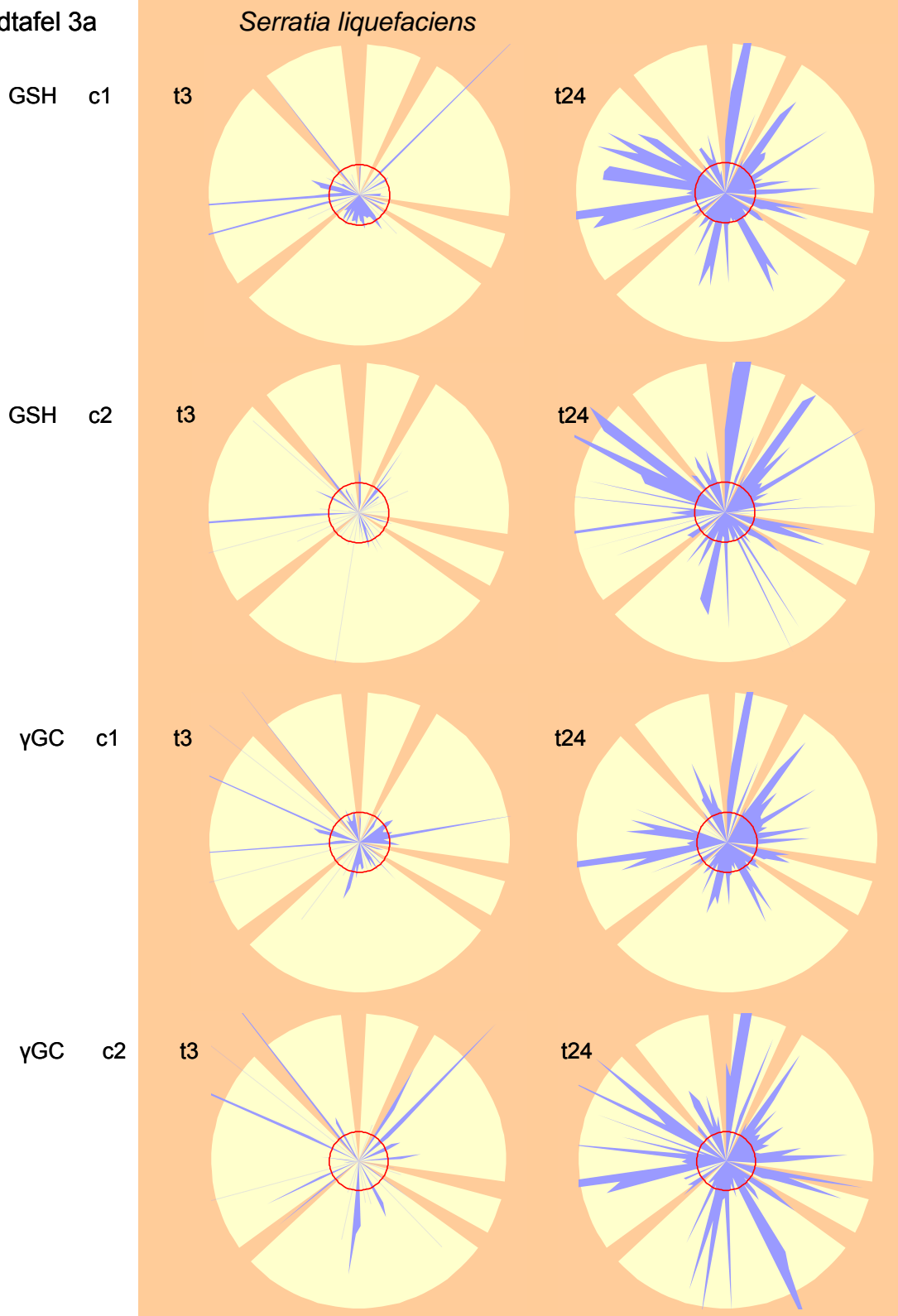
Bildtafel 2



**Legende:** Die Bildtafeln zeigen die Veränderungen des bakteriellen Wachstums nach Zugabe der links angegebenen Lösung (c1 = 0,45 mM, c2 = 2,2 mM). t3 = 3 Std. Inkubation, t24 = 24 Std. Inkubation. Der rote Ring gibt die unbeeinflusste Kontrolle als Verhältnis zu sich selbst an. Blau dargestellt ist das Verhältnis von Behandlung zur Kontrolle. Die Kreisdiagramme sind in die 6 chemischen Gruppen der C-Quellen in den Platten unterteilt.

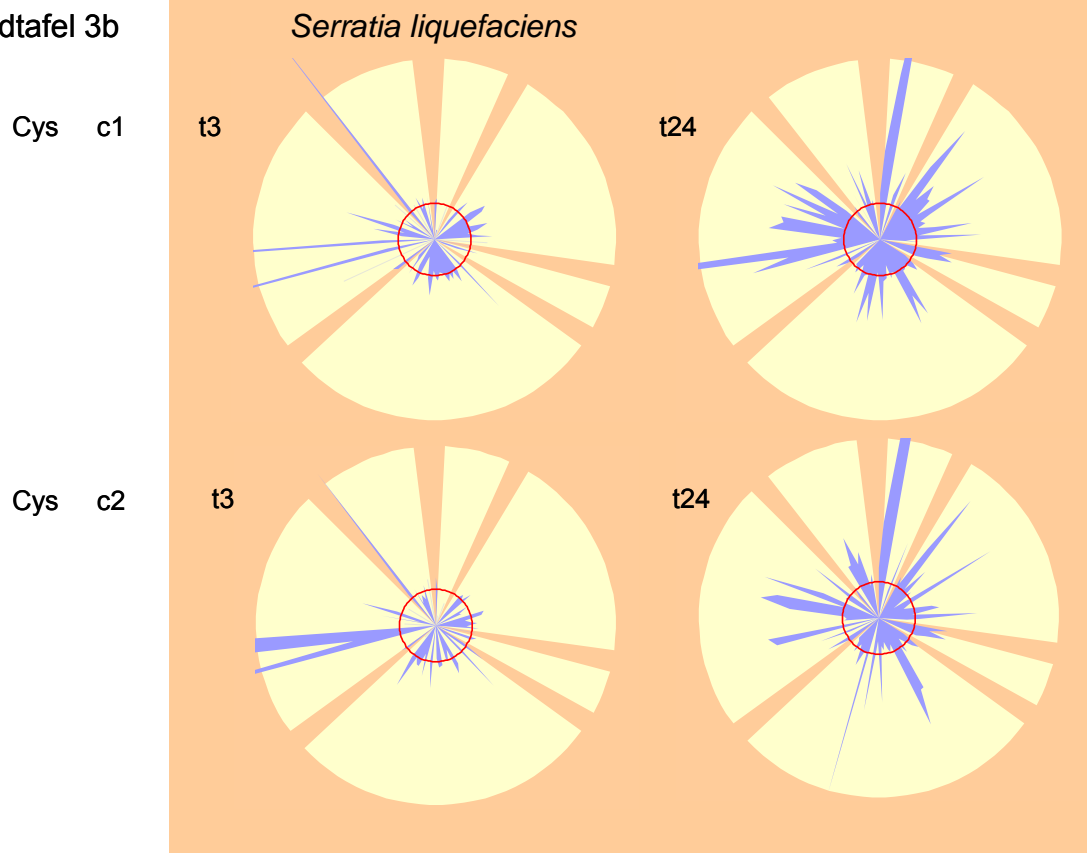


Bildtafel 3a



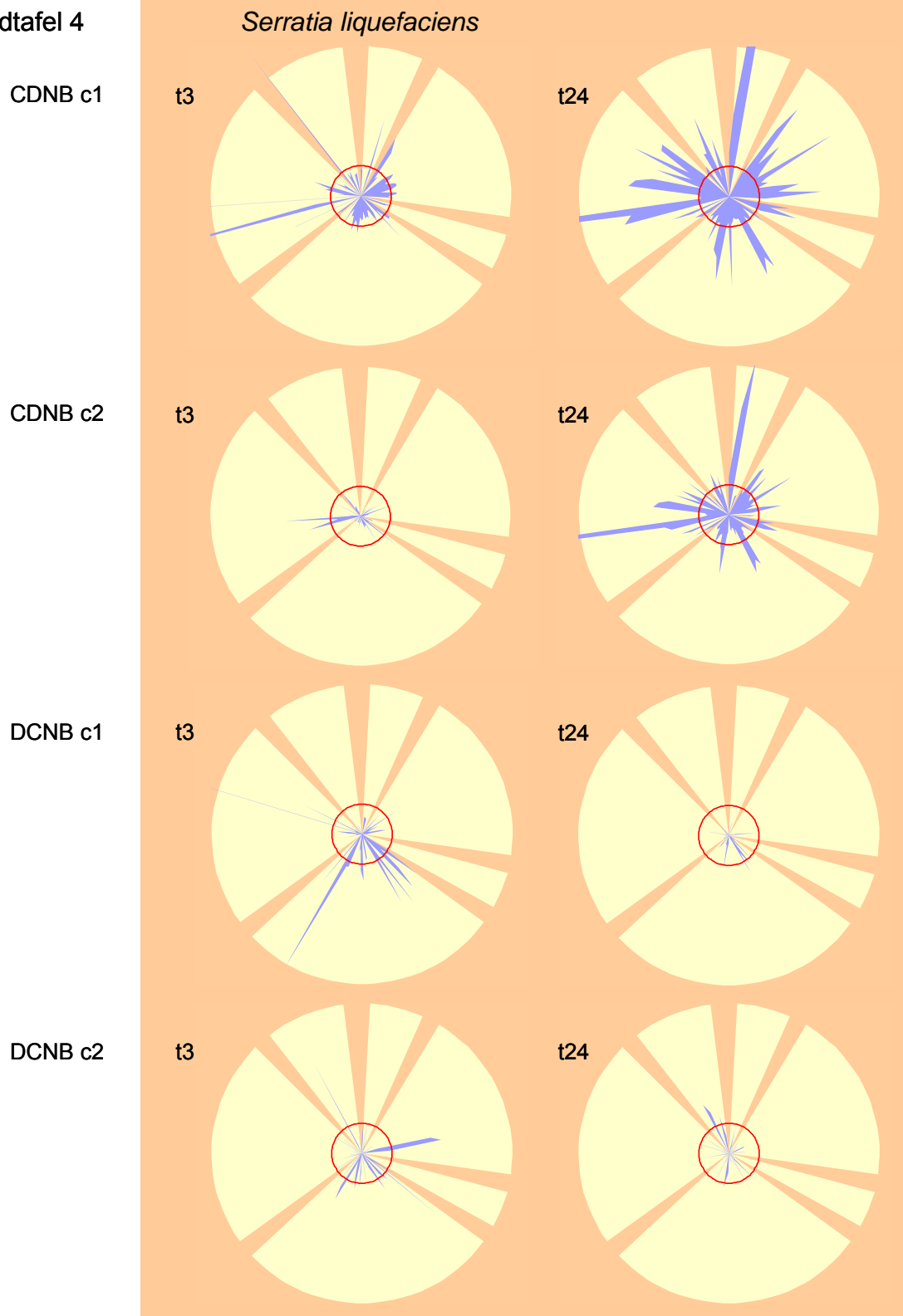
**Legende:** Die Bildtafeln zeigen die Veränderungen des bakteriellen Wachstums nach Zugabe der links angegebenen Lösung (c1 = 0,45 mM, c2 = 2,2 mM). t3 = 3 Std. Inkubation, t24 = 24 Std. Inkubation. Der rote Ring gibt die unbeeinflusste Kontrolle als Verhältnis zu sich selbst an. Blau dargestellt ist das Verhältnis von Behandlung zur Kontrolle. Die Kreisdiagramme sind in die 6 chemischen Gruppen der C-Quellen in den Platten unterteilt.

Bildtafel 3b



**Legende:** Die Bildtafeln zeigen die Veränderungen des bakteriellen Wachstums nach Zugabe der links angegebenen Lösung ( $c1 = 0,45 \text{ mM}$ ,  $c2 = 2,2 \text{ mM}$ ).  $t3 = 3 \text{ Std.}$  Inkubation,  $t24 = 24 \text{ Std.}$  Inkubation. Der rote Ring gibt die unbeeinflusste Kontrolle als Verhältnis zu sich selbst an. Blau dargestellt ist das Verhältnis von Behandlung zur Kontrolle. Die Kreisdiagramme sind in die 6 chemischen Gruppen der C-Quellen in den Platten unterteilt.

Bildtafel 4



**Legende:** Die Bildtafeln zeigen die Veränderungen des bakteriellen Wachstums nach Zugabe der links angegebenen Lösung (c1 = 0,45 mM, c2 = 2,2 mM). t3 = 3 Std. Inkubation, t24 = 24 Std. Inkubation. Der rote Ring gibt die unbeeinflusste Kontrolle als Verhältnis zu sich selbst an. Blau dargestellt ist das Verhältnis von Behandlung zur Kontrolle. Die Kreisdiagramme sind in die 6 chemischen Gruppen der C-Quellen in den Platten unterteilt.

### 5.2.2 *Burkholderia cepacia*

#### Konjugate

*Burkholderia cepacia* reagiert auf das GSH-Konjugat relativ verhalten, zeigt aber einen deutlichen Wachstumsschub, sobald Glucose-1-Phosphat im well enthalten ist (Bildtafel 5).

Ist die Konjugat-Lösung höher konzentriert, sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Substraten größer, auch der fördernde Einfluß tritt deutlicher hervor.

Die Unterschiede zwischen den beiden Konzentrationsstufen verwischen im Laufe der Zeit, und es entstehen zwei nahezu identische Muster.

Der Einfluß des GSH-Konjugates auf *Burkholderia cepacia* ist stets ein positiver, der sich in einer Förderung des Wachstums äußert.

Wird zu *Burkholderia cepacia* gering konzentrierte GS-DNB-Lösung gegeben, ist das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle in den ersten 3 Std. ausgeglichen. Eine Erhöhung der Konzentration bewirkt eine Förderung (Bildtafel 5).

24 Std. nach Inkubation ist das bakterielle Wachstum unter Einfluß der gering konzentrierten Lösung in allen wells stark gehemmt. Ist die Lösung höher konzentriert, bestehen keine Unterschiede zur unbeeinflussten Kontrolle.

Nach Zugabe von  $\gamma$ GC-X bleibt das bakterielle Wachstum in den ersten 3 Std. hinter der Kontrolle deutlich zurück. Ausnahmen bilden die wells, in denen Thymidin (gering) bzw. Glucose-1-Phosphat (hoch) enthalten ist. Dort wird das Wachstum gefördert (Bildtafel 6).

Nach 24 Std. ist das Wachstum der gering konzentrierten Variante fast vollständig unterdrückt. In der höher konzentrierten Variante zeichnet sich vereinzelt eine leichte Wachstumsförderung ab.

Das gering konzentrierte Cys-Konjugat unterdrückt das Wachstum von *Burkholderia cepacia* während der ersten 3 Std. Bei Zugabe höherer Konzentrationen reicht das Wachstum fast an das der Kontrolle heran, in Ausnahmefällen (Thymidin/Glucose-1-Phosphat) ist das Wachstum deutlich verbessert (Bildtafel 6).

Über die Zeit gleichen sich in der gering konzentrierten Variante die Unterschiede an, und das Wachstum ist nur geringfügig anders als das in den Kontrollplatten.

Hochkonzentriertes Cys-X bewirkt über die Zeit eine recht starke Wachstumsförderung.

Die höher konzentrierten Parent-Mix-Lösungen bewirken langfristig eine leichte Wachstumsförderung. GS-DNB kann, gering konzentriert, das Wachstum hemmen, höher konzentriert hat es keinen Einfluß auf *Burkholderia cepacia*.

#### Thiole

In den ersten 3 Std. wird das Wachstum von *Burkholderia cepacia* durch das gering konzentrierte GSH nur vereinzelt gefördert. Wird das Thiol höher konzentriert zugegeben, ist diese Wirkung leicht abgeschwächt. Generell scheint GSH das Wachstum zunächst zu hemmen (Bildtafel 7a und b).

Mit der Zeit kommt es jedoch in beiden Varianten zu einer starken Förderung. Diese ist unter Einfluß des gering konzentrierten GSH heftiger.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für das  $\gamma$ GC. In den ersten 3 Std. kommt es nur in wenigen Fällen zu einer Förderung des Wachstums, wobei geringer konzentriertes  $\gamma$ GC besser fördert als gering konzentriertes GSH (Bildtafel 7a und b).

Nach 24 Std. ist das Wachstum von *Burkholderia cepacia* stark gefördert. Auch hier ist es unter Einfluß des gering konzentrierten  $\gamma$ GC besser.

Unter Cys-Einfluß wird das Wachstum deutlich gehemmt (Bildtafel 7a und b). In der höher konzentrierten Variante kann es in Einzelfällen zu einer Förderung kommen (D-Gluconsäure,  $\beta$ -Hydroxybuttersäure).

Über die Zeit zeichnet sich der gleiche Trend ab wie für die anderen Thiole auch. Das Wachstum wird stark gefördert. Im Falle des Cys ist jedoch nicht eindeutig, ob die Förderung bei weniger Cys stärker ist.

Das Wachstum von *Burkholderia cepacia* ist nach Thiol-Zugabe stark vermindert. Es folgt aber eine kräftige Wachstumsförderung.

Diese Förderung betrifft für alle Thiole stets die gleichen wells, so daß zwischen den Thiolen keine Unterschiede bestehen.

Einzig die Konzentration scheint einen leichten Einfluß zu haben. Dies ist jedoch nicht gesichert.

#### Modell-Xenobiotika

Das Wachstum von *Burkholderia cepacia* wird zu Beginn des Versuchs größtenteils durch das CDNB gehemmt. Nur in Ausnahmefällen (Essigsäure, D,L-Milchsäure,  $\alpha$ -D-Lactose) wird das Wachstum gefördert (Bildtafel 8).

Ist das Modell-Xenobiotikum höher konzentriert, fällt die hemmende Wirkung schwächer aus. Auch hier kann es u. U. zu einer relativ starken Förderung kommen.

Nach 24 Std. Inkubation liegt das Wachstum beider Behandlungen deutlich über dem der Kontrolle. Unterschiede zwischen den Konzentrationsstufen gibt es keine, unabhängig von der Konzentration wird das Wachstum sehr stark gefördert.

Die bei CDNB beobachtete, anfängliche Hemmwirkung ist unter DCNB-Einfluß geringer. Es scheint sogar eher eine wachstumsfördernde Wirkung vorzuliegen, die in der höher konzentrierten Variante sogar noch deutlicher ist.

Über die Zeit ist in allen wells bakterielles Wachstum feststellbar, es ist sogar leicht verbessert gegenüber der Kontrolle.

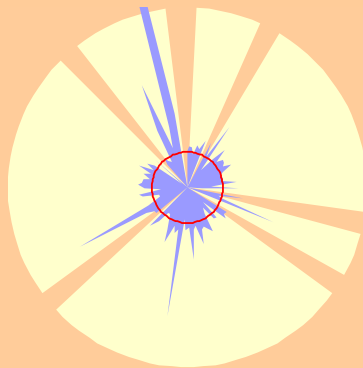
Ist das DCNB höher konzentriert, ist das Wachstum - verglichen mit der gering konzentrierten Variante – schlechter, bezogen auf die Kontrolle ausgeglichen.

Mit CDNB kann das Wachstum von *Burkholderia cepacia* stark gefördert werden, wohingegen DCNB das Wachstum nur geringfügig verbessert.

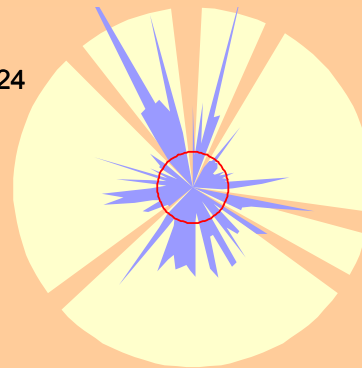
Bildtafel 5

*Burkholderia cepacia*GS-X c1  
Parent Mix

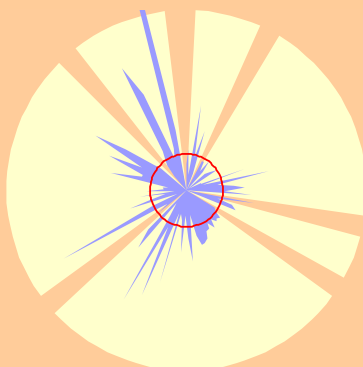
t3



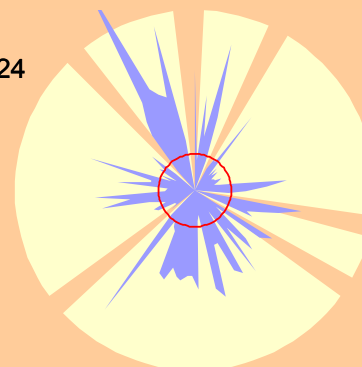
t24

GS-X c2  
Parent Mix

t3

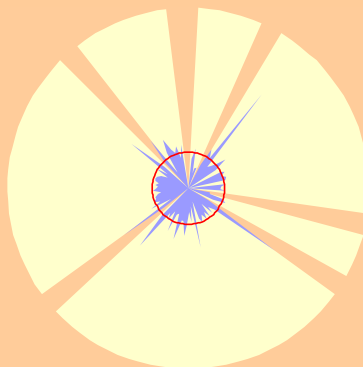


t24

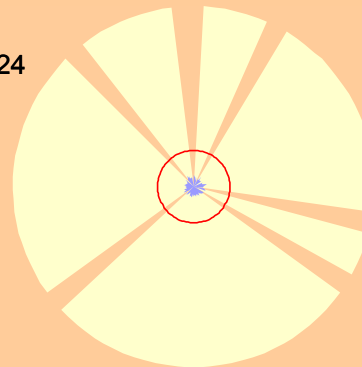


GS-DNB c1

t3

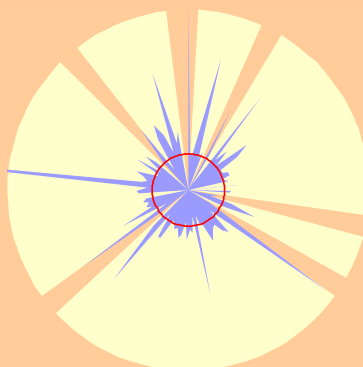


t24

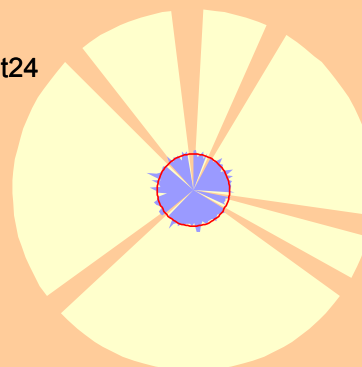


GS-DNB c2

t3



t24



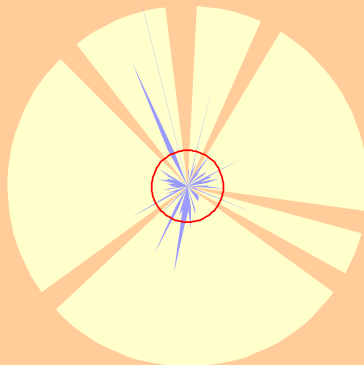
**Legende:** Die Bildtafeln zeigen die Veränderungen des bakteriellen Wachstums nach Zugabe der links angegebenen Lösung (c1 = 0,45 mM, c2 = 2,2 mM). t3 = 3 Std. Inkubation, t24 = 24 Std. Inkubation. Der rote Ring gibt die unbeeinflusste Kontrolle als Verhältnis zu sich selbst an. Blau dargestellt ist das Verhältnis von Behandlung zur Kontrolle. Die Kreisdiagramme sind in die 6 chemischen Gruppen der C-Quellen in den Platten unterteilt.

Bildtafel 6

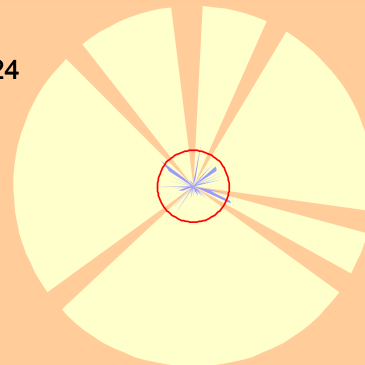
*Burkholderia cepacia*

$\gamma$ GC-X c1  
Parent Mix

t3

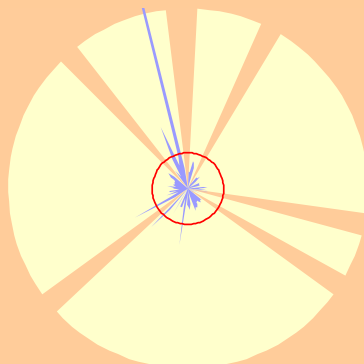


t24

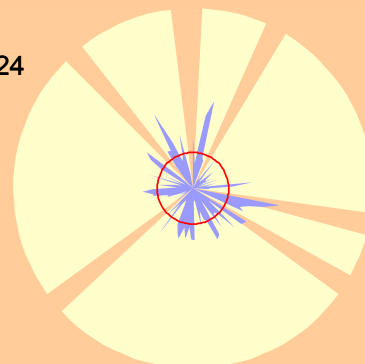


$\gamma$ GC-X c2  
Parent Mix

t3

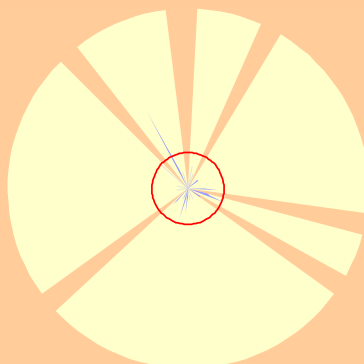


t24

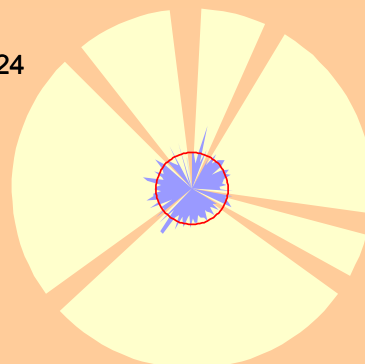


Cys-X c1  
Parent Mix

t3

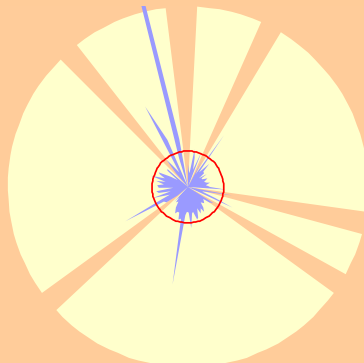


t24

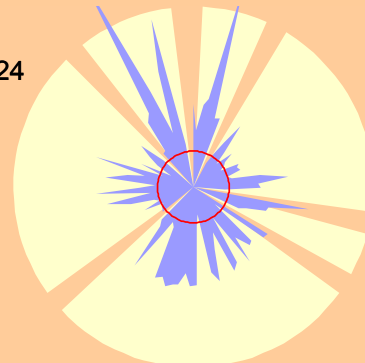


Cys-X c2  
Parent Mix

t3



t24



**Legende:** Die Bildtafeln zeigen die Veränderungen des bakteriellen Wachstums nach Zugabe der links angegebenen Lösung (c1 = 0,45 mM, c2 = 2,2 mM). t3 = 3 Std. Inkubation, t24 = 24 Std. Inkubation. Der rote Ring gibt die unbeeinflusste Kontrolle als Verhältnis zu sich selbst an. Blau dargestellt ist das Verhältnis von Behandlung zur Kontrolle. Die Kreisdiagramme sind in die 6 chemischen Gruppen der C-Quellen in den Platten unterteilt.

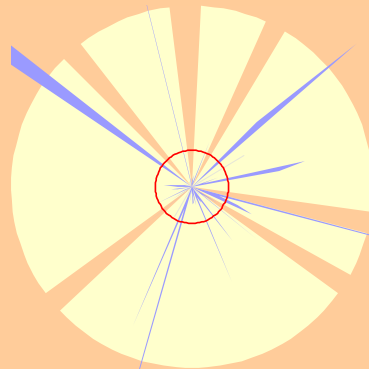


Bildtafel 7a

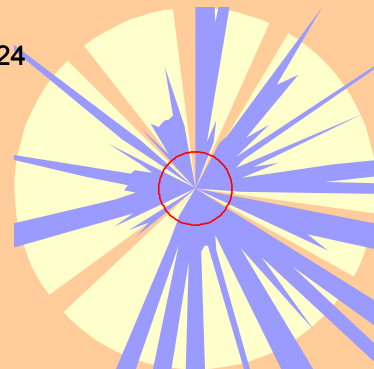
*Burkholderia cepacia*

GSH c1

t3

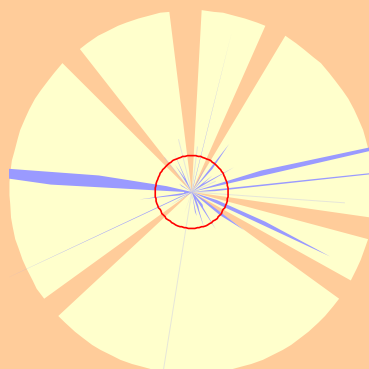


t24

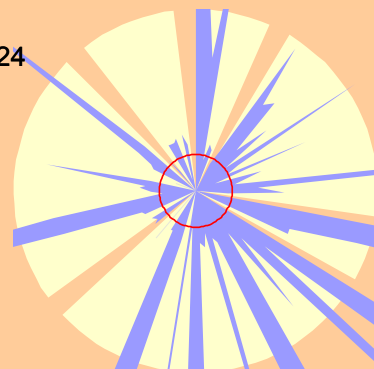


GSH c2

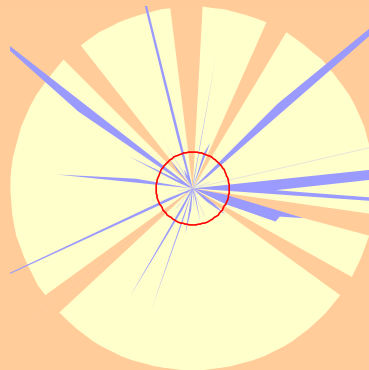
t3



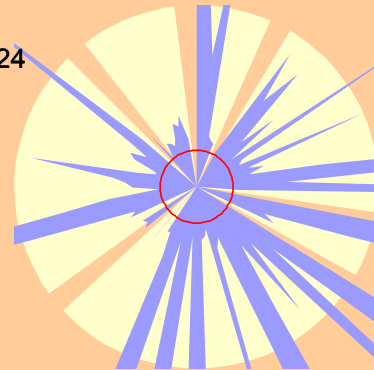
t24

 $\gamma$ GC c1

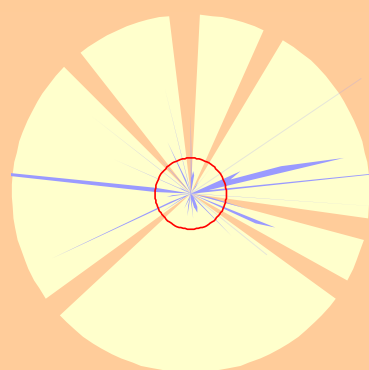
t3



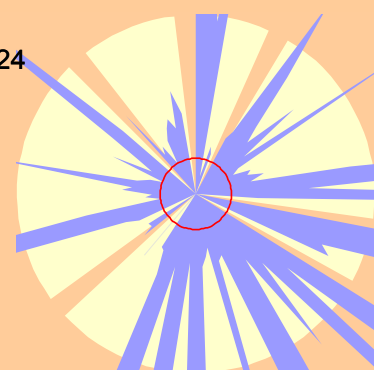
t24

 $\gamma$ GC c2

t3

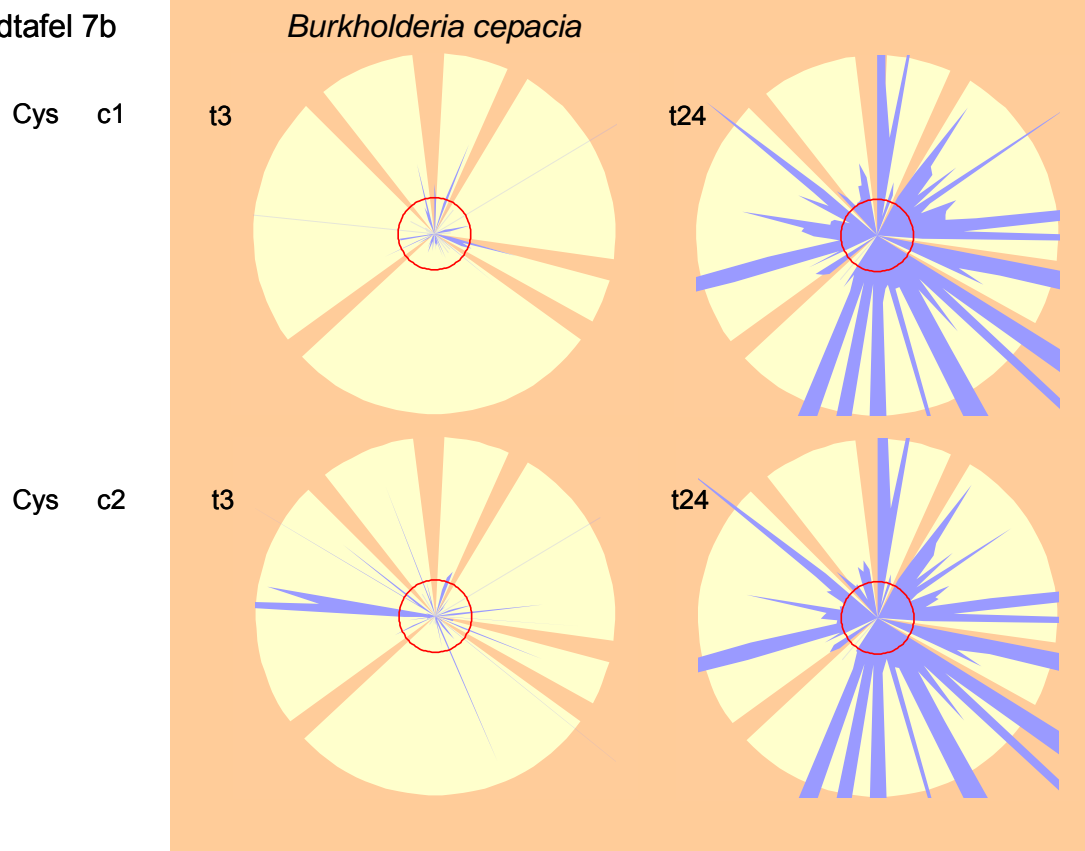


t24



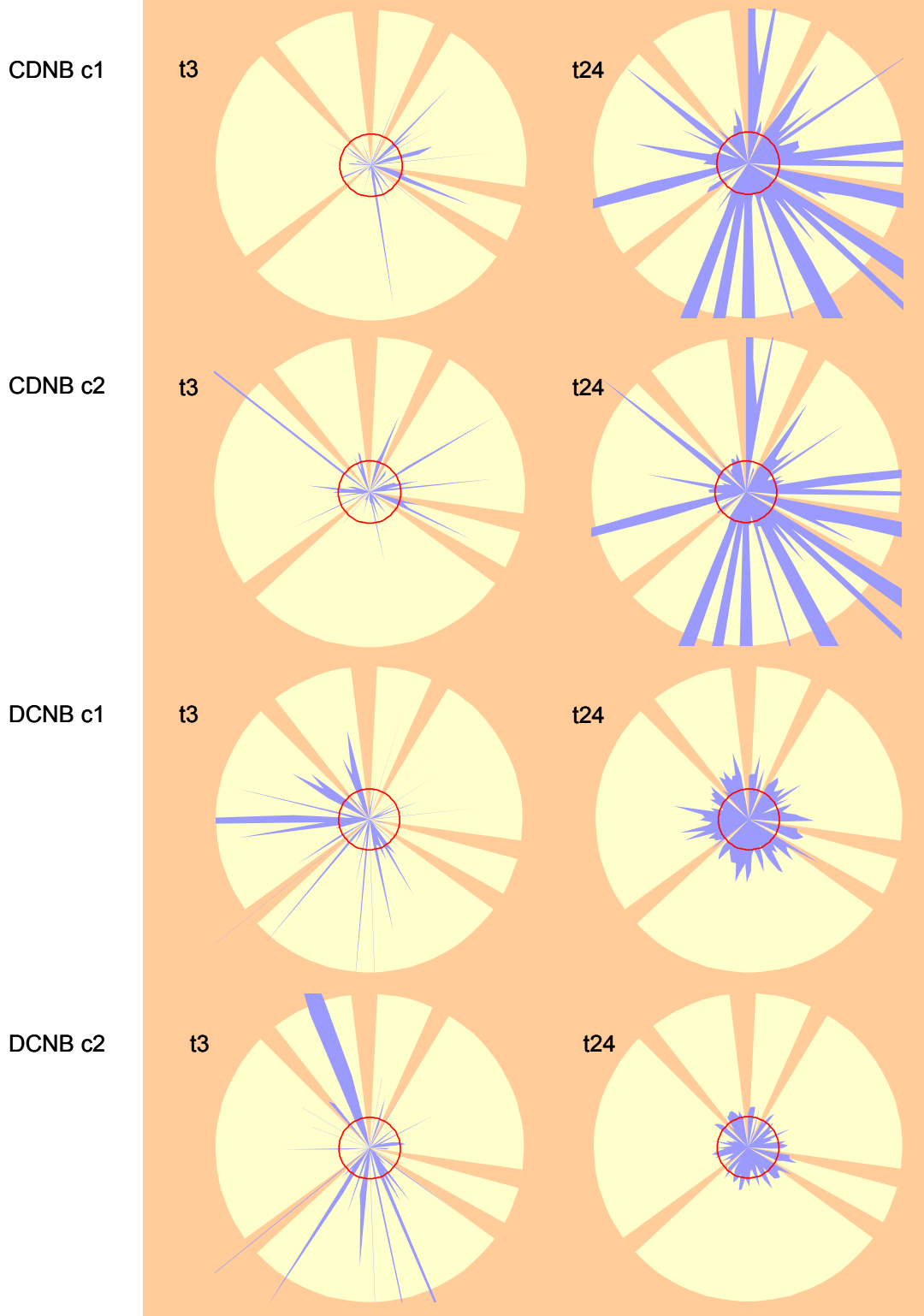
**Legende:** Die Bildtafeln zeigen die Veränderungen des bakteriellen Wachstums nach Zugabe der links angegebenen Lösung (c1 = 0,45 mM, c2 = 2,2 mM). t3 = 3 Std. Inkubation, t24 = 24 Std. Inkubation. Der rote Ring gibt die unbeeinflusste Kontrolle als Verhältnis zu sich selbst an. Blau dargestellt ist das Verhältnis von Behandlung zur Kontrolle. Die Kreisdiagramme sind in die 6 chemischen Gruppen der C-Quellen in den Platten unterteilt.

Bildtafel 7b



**Legende:** Die Bildtafeln zeigen die Veränderungen des bakteriellen Wachstums nach Zugabe der links angegebenen Lösung (c1 = 0,45 mM, c2 = 2,2 mM). t3 = 3 Std. Inkubation, t24 = 24 Std. Inkubation. Der rote Ring gibt die unbeeinflusste Kontrolle als Verhältnis zu sich selbst an. Blau dargestellt ist das Verhältnis von Behandlung zur Kontrolle. Die Kreisdiagramme sind in die 6 chemischen Gruppen der C-Quellen in den Platten unterteilt.

Bildtafel 8

*Burkholderia cepacia*

**Legende:** Die Bildtafeln zeigen die Veränderungen des bakteriellen Wachstums nach Zugabe der links angegebenen Lösung (c1 = 0,45 mM, c2 = 2,2 mM). t3 = 3 Std. Inkubation, t24 = 24 Std. Inkubation. Der rote Ring gibt die unbeeinflusste Kontrolle als Verhältnis zu sich selbst an. Blau dargestellt ist das Verhältnis von Behandlung zur Kontrolle. Die Kreisdiagramme sind in die 6 chemischen Gruppen der C-Quellen in den Platten unterteilt.

### 5.2.3 *Burkholderia sacchari*

#### Konjugate

Auf das GS-X reagiert *Burkholderia sacchari* sehr differenziert. 3 Std. nach der Zugabe kommt es in einigen wells zu einem sprunghaften Anstieg des Wachstums gegenüber der Kontrolle. Dieser Wachstumsschub ist in der höher konzentrierten Variante noch ausgeprägter (Bildtafel 9).

Besonders drastisch entwickelt sich das Wachstum über die Zeit. Dann kommt es zu einer regelrechten Explosion des Wachstums.

Die GS-DNB-Lösung zeigt kaum Wirkung auf das bakterielle Wachstum. In der gering konzentrierten Variante bleibt das Wachstum gegenüber der Kontrolle leicht zurück, höher konzentriert entspricht das Wachstum etwa dem der Kontrolle (Bildtafel 9).

Diese leichten Unterschiede verwischen mit der Zeit, und es ist keine Beeinflussung der Konjugat-Lösung gegenüber der Kontrolle meßbar.

Die bei GS-X (Parent Mix) festgestellte, anfängliche Wachstumsförderung zeigt sich noch deutlicher nach Zugabe von  $\gamma$ GC-X. In Kombination mit  $\beta$ -Methyl-D-Glucosid erfährt das Wachstum eine starke Förderung. Der Einfluß ist in der höher konzentrierten Variante deutlicher (Bildtafel 10).

Im Laufe der Zeit ist das Wachstum zwar generell verbessert gegenüber der unbehandelten Kontrolle, im Vergleich zu GS-X jedoch schwächer.

Wie auch schon für die anderen Konjugate festgestellt, ist auch für das Cys-X zu verzeichnen, daß das Wachstum extrem gefördert werden kann. Traf dies für die anderen Konjugate besonders zu, wenn ein Substrat aus der Gruppe der Kohlenhydrate beteiligt war, so gilt dies im Fall des Cys-X für Aminosäuren wie z. B. L-Phenylalanin, L-Alanin oder L-Pyroglutaminsäure (Bildtafel 10).

Wird die Konjugat-Konzentration erhöht, ergibt sich ein vollständig anderes Bild. Nun erfolgt die Förderung vor allem dann, wenn eine Substanz aus der Gruppe der Kohlenhydrate, z. B.  $\beta$ -Methyl-D-Glucosid, zugegen ist.

Über die Zeit gleichen sich die anfänglichen Wachstumsförderungen an. Im Gegensatz dazu wird das Wachstum in anderen wells stark gefördert.

Unter Einfluß des gering konzentrierten Cys-X ist das Wachstum besser als unter hoch konzentriertem.

Die Konjugat-Lösungen haben auf *Burkholderia sacchari* vergleichbare Wirkungen wie auch auf *Burkholderia cepacia*. Die Parent-Mix-Lösungen fördern das Wachstum langfristig, während GS-DNB keinen Einfluß hat.

Auffallend ist, daß die *Burkholderien* stets kräftiger wachsen als *Serratia liquefaciens*.

#### Thiole

Das Wachstum von *Burkholderia sacchari* ist nach Zugabe von GSH leicht verbessert. Ist das GSH höher konzentriert, fällt diese Förderung schwächer aus (Bildtafel 11a und b).

Über die Zeit kehrt sich dieses Phänomen um. In der gering konzentrierten Variante ist auch das Wachstum geringer. Bezogen auf die Kontrolle wächst *Burkholderia sacchari* unter Thiol-Einfluß jedoch deutlich besser.

Auf das  $\gamma$ GC reagiert *Burkholderia sacchari* mit einem explosionsartigen Wachstum innerhalb der ersten 3 Std. Erstaunlicherweise reagiert das Bakterium auf eine höhere Gabe eher mit einer Wachstumshemmung (Bildtafel 11a und b).

Im Laufe der Zeit relativiert sich die Wachstumsförderung. Dann ist in der hochkonzentrierten Variante die Förderung größer.

Wird zu den Bakterien Cys gegeben, bleibt das Wachstum in beiden Konzentrationsstufen während der ersten 3 Std. leicht hinter der Kontrolle zurück (Bildtafel 11a und b).

Stehen Malonsäure oder  $\alpha$ -Hydroxybuttersäure alternativ zur Verfügung, ist das Wachstum stark gefördert.

Ob die gering konzentrierte Variante stärker wächst als die höher konzentrierte, bleibt spekulativ.

Nach 24 Std. sind die Unterschiede zur Kontrolle größer. Durch das Cys ist das Wachstum von *Burkholderia sacchari* auf jeden Fall verstärkt.

Auch hier ist nicht eindeutig, ob die höher konzentrierte Variante eine stärkere Förderung erzeugt.

Die Thiole fördern das bakterielle Wachstum. Unterschiede zwischen den Konzentrationen sind nur gering.

Unter  $\gamma$ GC-Einfluß explodiert das Wachstum von *Burkholderia sacchari* innerhalb von 3 Std.

#### Modell-Xenobiotika

Von dem CDNB geht zunächst eine stark wachstumsfördernde Wirkung aus. Vor allem in Kombination mit i-Erythritol und/oder L-Glutaminsäure ist das Wachstum von *Burkholderia sacchari* stark verbessert (Bildtafel 12).

Wird höher konzentrierte CDNB-Lösung zugegeben, ist die fördernde Wirkung weniger stark, aber doch deutlich vorhanden.

Nach 24stündiger Inkubation ist die Förderung durch das geringer konzentrierte CDNB deutlich verringert, bleibt jedoch unter den bereits erwähnten Substraten i-Erythritol und L-Glutaminsäure uneingeschränkt bestehen.

Wird DCNB zu den Bakterien gegeben, findet in der geringer konzentrierten Variante gegenüber der Kontrolle in den ersten 3 Std. ein besseres Wachstum statt. Das Wachstum ist jedoch vollständig unterdrückt, sobald das DCNB höher konzentriert ist.

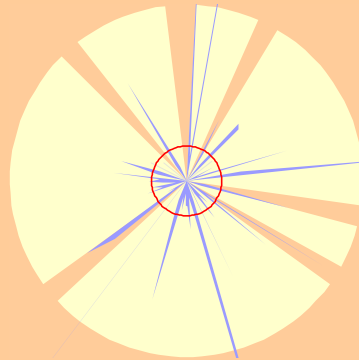
Die anfängliche stimulierende Wirkung des gering konzentrierten DCNBs schlägt im Laufe der Zeit in eine klare Hemmwirkung um. Nur in Ausnahmefällen ist das Wachstum annähernd so gut wie in der Kontrolle (D-Glucononsäure).

Von CDNB kann *Burkholderia sacchari* nur in Ausnahmen gefördert werden. DCNB unterdrückt das Bakterienwachstum vollständig.

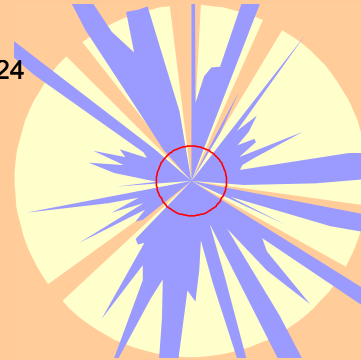
Bildtafel 9

*Burkholderia sacchari*GS-X c1  
Parent Mix

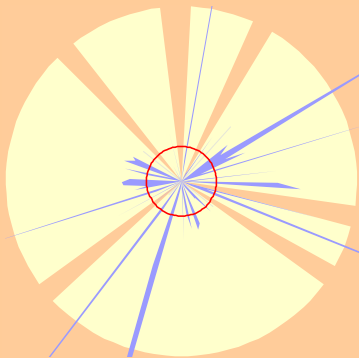
t3



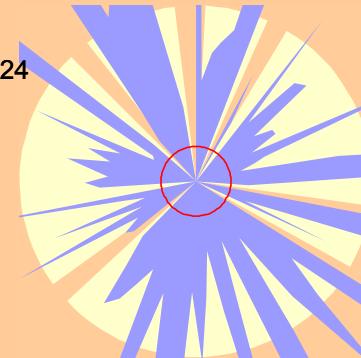
t24

GS-X c2  
Parent Mix

t3

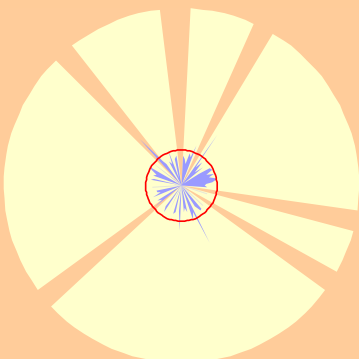


t24

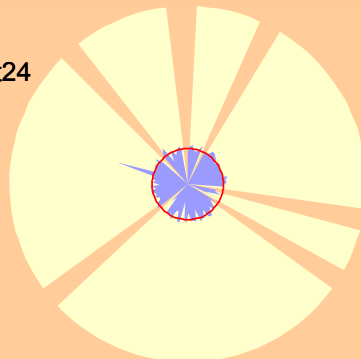


GS-DNB c1

t3

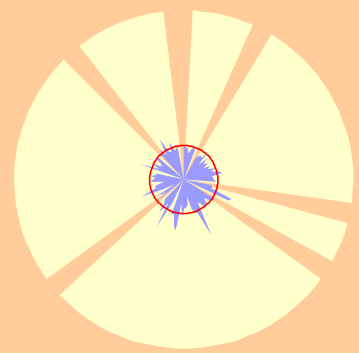


t24

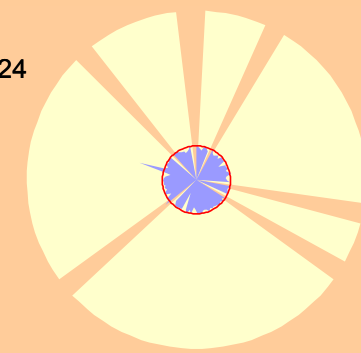


GS-DNB c2

t3



t24



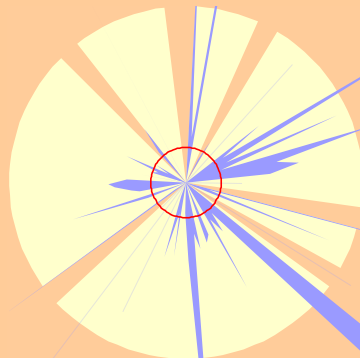
**Legende:** Die Bildtafeln zeigen die Veränderungen des bakteriellen Wachstums nach Zugabe der links angegebenen Lösung (c1 = 0,45 mM, c2 = 2,2 mM). t3 = 3 Std. Inkubation, t24 = 24 Std. Inkubation. Der rote Ring gibt die unbeeinflusste Kontrolle als Verhältnis zu sich selbst an. Blau dargestellt ist das Verhältnis von Behandlung zur Kontrolle. Die Kreisdiagramme sind in die 6 chemischen Gruppen der C-Quellen in den Platten unterteilt.

Bildtafel 10

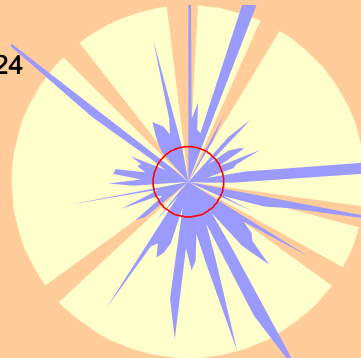
*Burkholderia sacchari*

$\gamma$ GC-X c1  
Parent Mix

t3

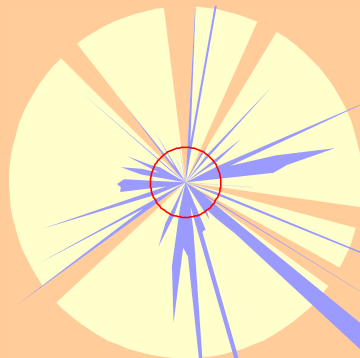


t24

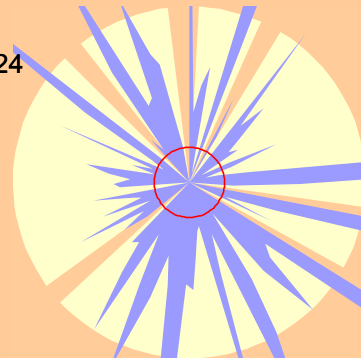


$\gamma$ GC-X c2  
Parent Mix

t3

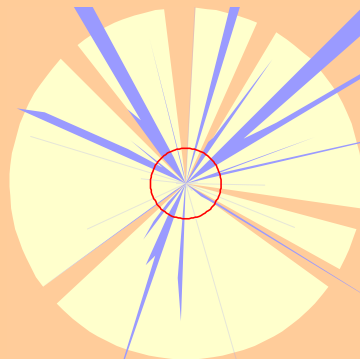


t24

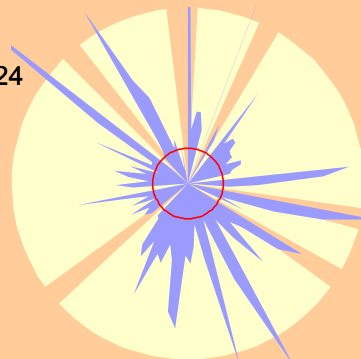


Cys-X c1  
Parent Mix

t3

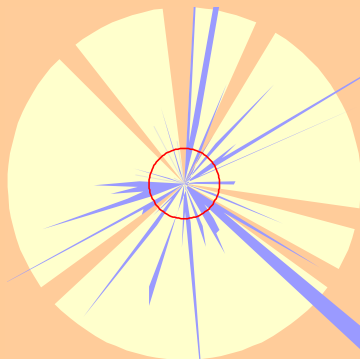


t24

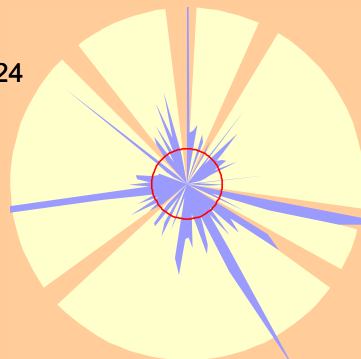


Cys-X c2  
Parent Mix

t3



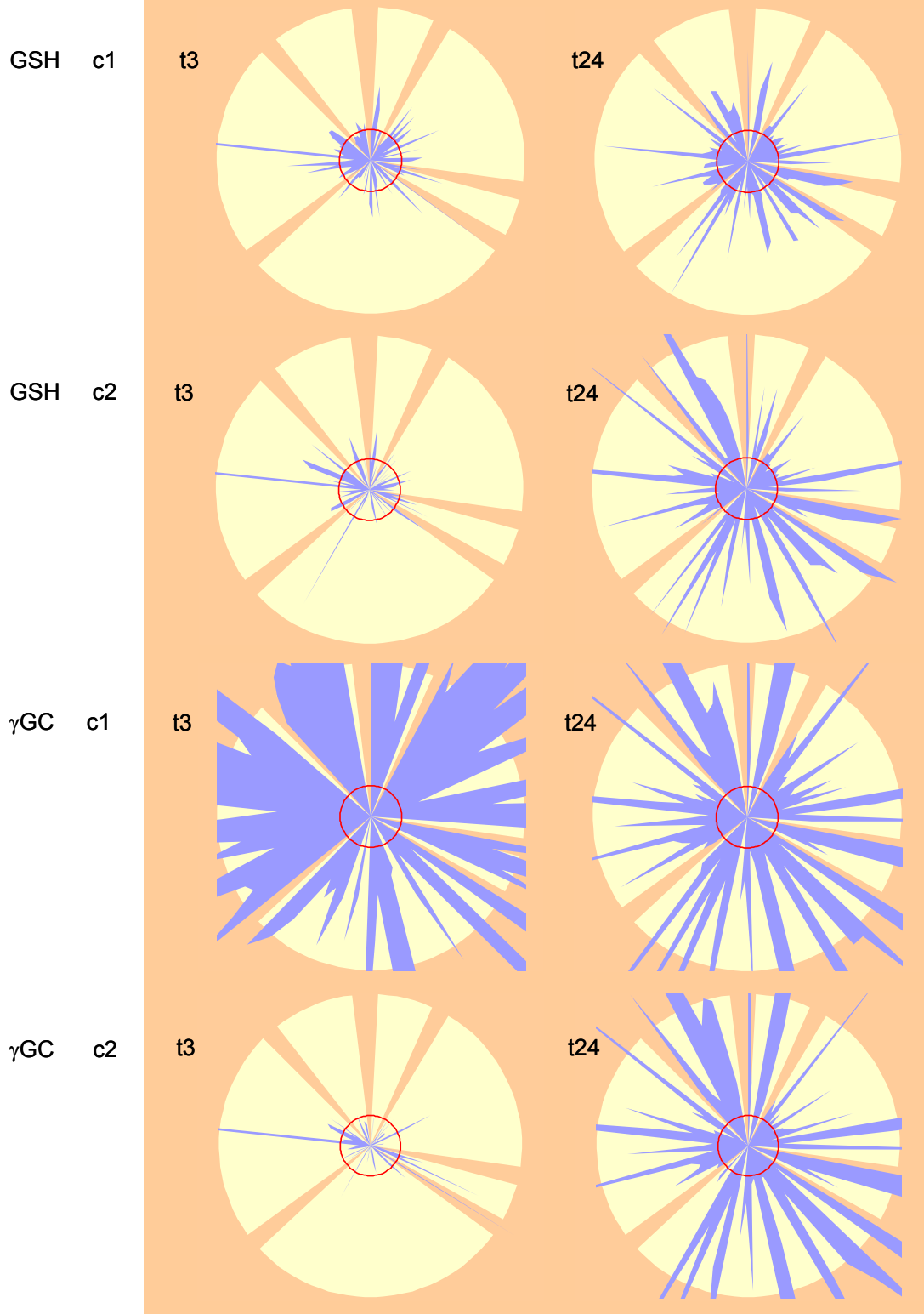
t24



**Legende:** Die Bildtafeln zeigen die Veränderungen des bakteriellen Wachstums nach Zugabe der links angegebenen Lösung (c1 = 0,45 mM, c2 = 2,2 mM). t3 = 3 Std. Inkubation, t24 = 24 Std. Inkubation. Der rote Ring gibt die unbeeinflusste Kontrolle als Verhältnis zu sich selbst an. Blau dargestellt ist das Verhältnis von Behandlung zur Kontrolle. Die Kreisdiagramme sind in die 6 chemischen Gruppen der C-Quellen in den Platten unterteilt.

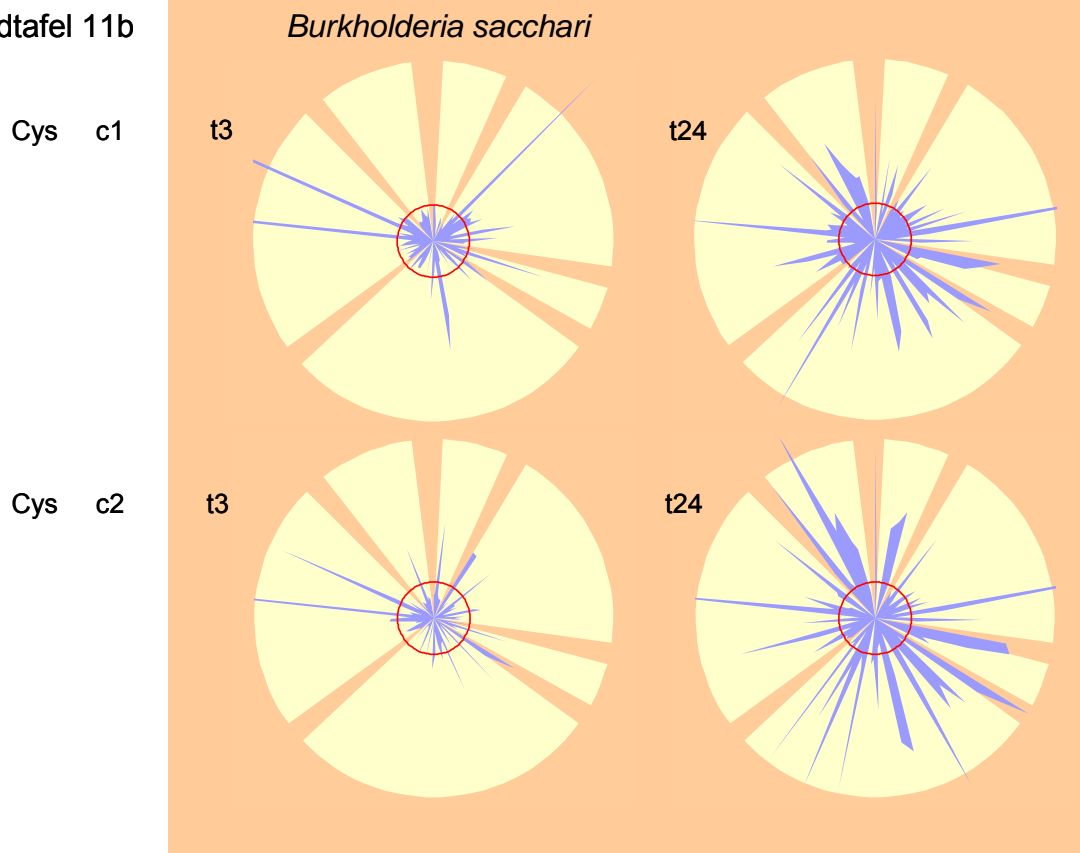


Bildtafel 11a

*Burkholderia sacchari*

**Legende:** Die Bildtafeln zeigen die Veränderungen des bakteriellen Wachstums nach Zugabe der links angegebenen Lösung (c1 = 0,45 mM, c2 = 2,2 mM). t3 = 3 Std. Inkubation, t24 = 24 Std. Inkubation. Der rote Ring gibt die unbeeinflusste Kontrolle als Verhältnis zu sich selbst an. Blau dargestellt ist das Verhältnis von Behandlung zur Kontrolle. Die Kreisdiagramme sind in die 6 chemischen Gruppen der C-Quellen in den Platten unterteilt.

Bildtafel 11b



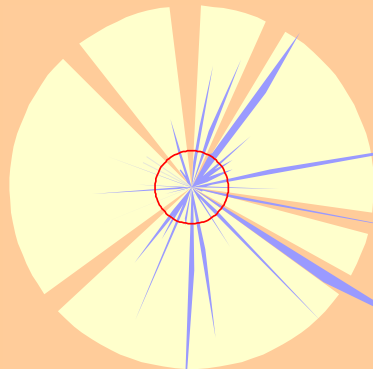
**Legende:** Die Bildtafeln zeigen die Veränderungen des bakteriellen Wachstums nach Zugabe der links angegebenen Lösung (c1 = 0,45 mM, c2 = 2,2 mM). t3 = 3 Std. Inkubation, t24 = 24 Std. Inkubation. Der rote Ring gibt die unbeeinflusste Kontrolle als Verhältnis zu sich selbst an. Blau dargestellt ist das Verhältnis von Behandlung zur Kontrolle. Die Kreisdiagramme sind in die 6 chemischen Gruppen der C-Quellen in den Platten unterteilt.

Bildtafel 12

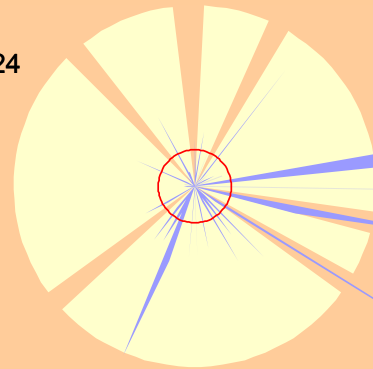
*Burkholderia sacchari*

CDNB c1

t3

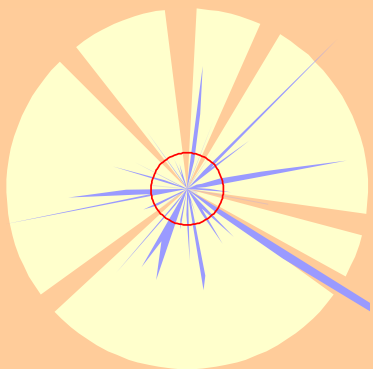


t24

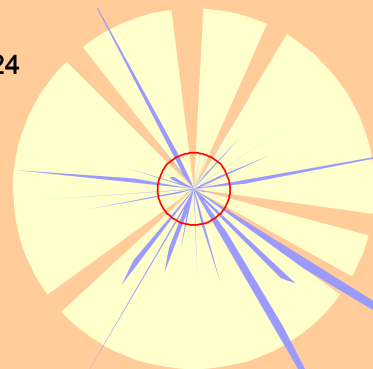


CDNB c2

t3

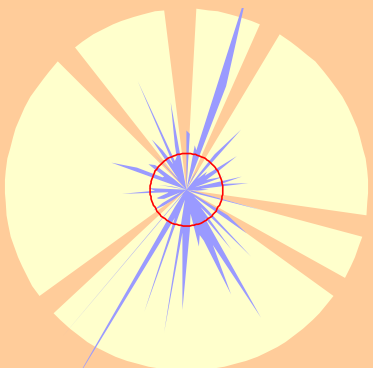


t24

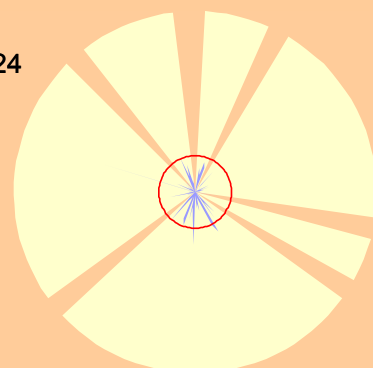


DCNB c1

t3

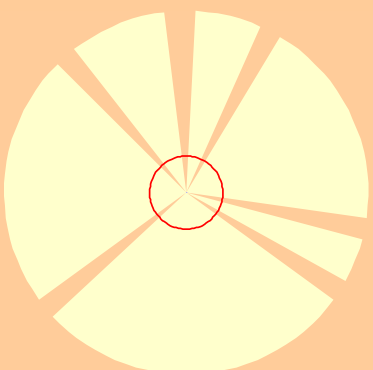


t24

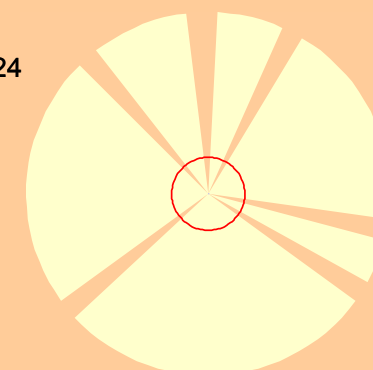


DCNB c2

t3



t24



**Legende:** Die Bildtafeln zeigen die Veränderungen des bakteriellen Wachstums nach Zugabe der links angegebenen Lösung (c1 = 0,45 mM, c2 = 2,2 mM). t3 = 3 Std. Inkubation, t24 = 24 Std. Inkubation. Der rote Ring gibt die unbeeinflusste Kontrolle als Verhältnis zu sich selbst an. Blau dargestellt ist das Verhältnis von Behandlung zur Kontrolle. Die Kreisdiagramme sind in die 6 chemischen Gruppen der C-Quellen in den Platten unterteilt.

## 6 Toxintest

Um die Wirkung der Konjugate auf höhere Pflanzen zu testen, wurden Experimente mit Tomatenstecklingen und -pflanzen durchgeführt. Das Pflanzenmaterial stand in 1,5 und 15 mM Lösungen von GSH-X, Cys-X und CDNB. Über einen Zeitraum von 10 Tagen wurden die Reaktionen der Stecklinge und Pflanzen bonitiert (vgl. Boniturschema Tab. 6, S. 45).

Weiterhin wurden Tomatenblätter für 24 Std. mit diesen Lösungen inkubiert, um anschließend Veränderungen in den GST-Aktivitäten zu bestimmen.

Für alle Symptome gilt, daß sie in den Stecklingen und Pflanzen, die in der hochkonzentrierten Lösung standen, stets am stärksten ausgeprägt sind. Stets waren die Reaktionen in der CDNB-Lösung am heftigsten.

Weiterhin reagierten die Stecklinge stärker als die Pflanzen, wobei aber in keinem der Fälle eine mittlere Boniturstufe von 2 überschritten wurde.

Sowohl Stecklinge als auch bewurzelte Pflanzen reagierten auf das GSH-Konjugat tendenziell stärker als auf das Cys-Konjugat. Dies trifft hauptsächlich für die geringer konzentrierte Variante zu.

### 6.1 Visuelle Symptome

Es zeigte sich, daß über die Zeit alle Stecklinge verwelkten. Sogar die Kontroll-Stecklinge welkten, jedoch nicht in dem Maße wie die übrigen Probeglieder (Abb. 53).

Von den bewurzelten Pflanzen zeigten lediglich die in der hochkonzentrierten Lösung ausgeprägte Welkeerscheinungen. In der hochkonzentrierten Konjugat-Lösung wurde nur ein leichtes Einrollen einzelner Blätter ausgebildet. Alle übrigen Pflanzen reagierten kaum, anfängliche Welke wurde sogar über die Zeit wieder ausgeglichen.

Auch die Chlorose war ein Symptom, das alle Stecklinge zeigten. Dieses Symptom wurde von den Stecklingen in der CDNB-Lösung besonders stark ausgeprägt. Alle übrigen Stecklinge zeigten nur schwache Verfärbungen (Abb. 53).

Wie schon die Chlorose, wurde auch die Nekrose von allen Tomatenstecklingen schwach ausgebildet. Stark nekrotisch waren vor allem die Pflanzen in den GS-DNB-Lösungen (Abb. 53).

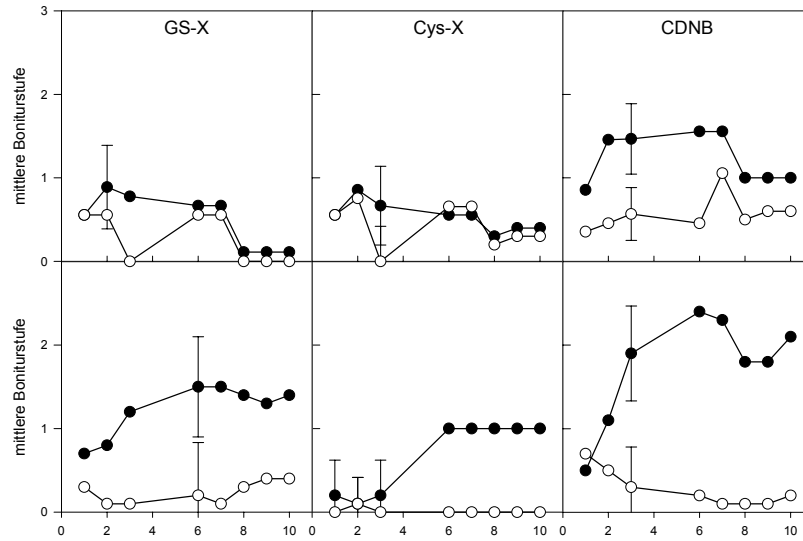
**Legende zu Abb. 53 (folgende Seite): Entwicklung der visuellen Symptome in Tomatenstecklingen und bewurzelten Tomatenpflanzen. Abgebildet sind die täglichen Boniturstufen als Mittelwert aus 10 Versuchsgliedern abzüglich der unbeeinflussten Kontrolle und die dazugehörigen Standardfehler.**

Abb. 53:

Welke

Stecklinge

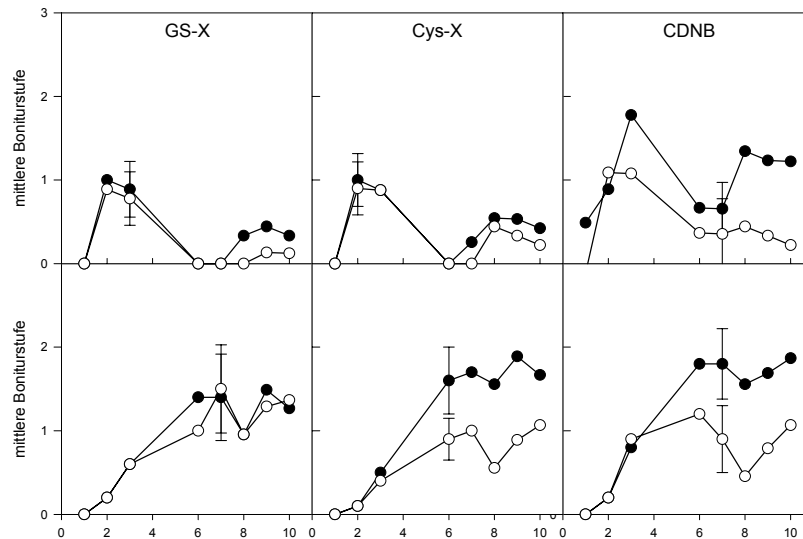
Pflanzen



Chlorose

Stecklinge

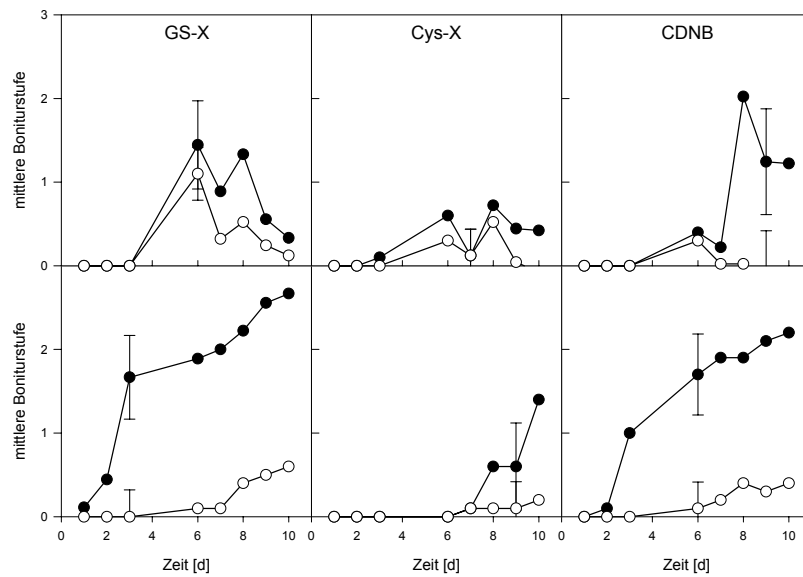
Pflanzen



Nekrose

Stecklinge

Pflanzen



## 6.2 Entgiftungskapazität von Tomatenpflanzen nach Induktion mit Fremdstoff-Metaboliten

Nachdem die Reaktionen der Tomatenpflanzen auf die Konjugate und das CDNB rein optisch bestimmt wurden, liegt es nahe, daß mit diesem Versuchsmaterial auch enzymatische Tests durchgeführt wurden.

Aus Tomatenblättern, die 24 Std. in der Konjugat- bzw. CDNB-Lösung standen ( $c_1 = 15 \text{ mM}$ ,  $c_2 = 1,5 \text{ mM}$ ), wurden Enzyme extrahiert und die Umsatzraten verschiedener Substrate gemessen.

Es zeigte sich, daß die CDNB-GST-Aktivität durch die Konjugate und besonders das CDNB induziert werden kann. Die Aktivitäten sind in den Behandlungen stets höher als in der Kontrolle (Abb. 54). Dabei ist auffällig, daß eine höhere Konzentration nicht automatisch mit einer stärkeren Induktion einhergeht (vgl. Cys-X  $c_1$ ).

Bezeichnend ist, daß das CDNB stärkeren Einfluß auf die Enzymaktivität hat als dessen Konjugate.

### 6.2.1 GSTs in Tomaten nach Induktion mit Fremdstoff-Metaboliten

Die Aktivität der CDNB-GST liegt in allen Behandlungen über der der unbeeinflussten Kontrolle. Wie bereits gezeigt, bewirkt besonders die Zugabe von CDNB eine Steigerung der Aktivität.

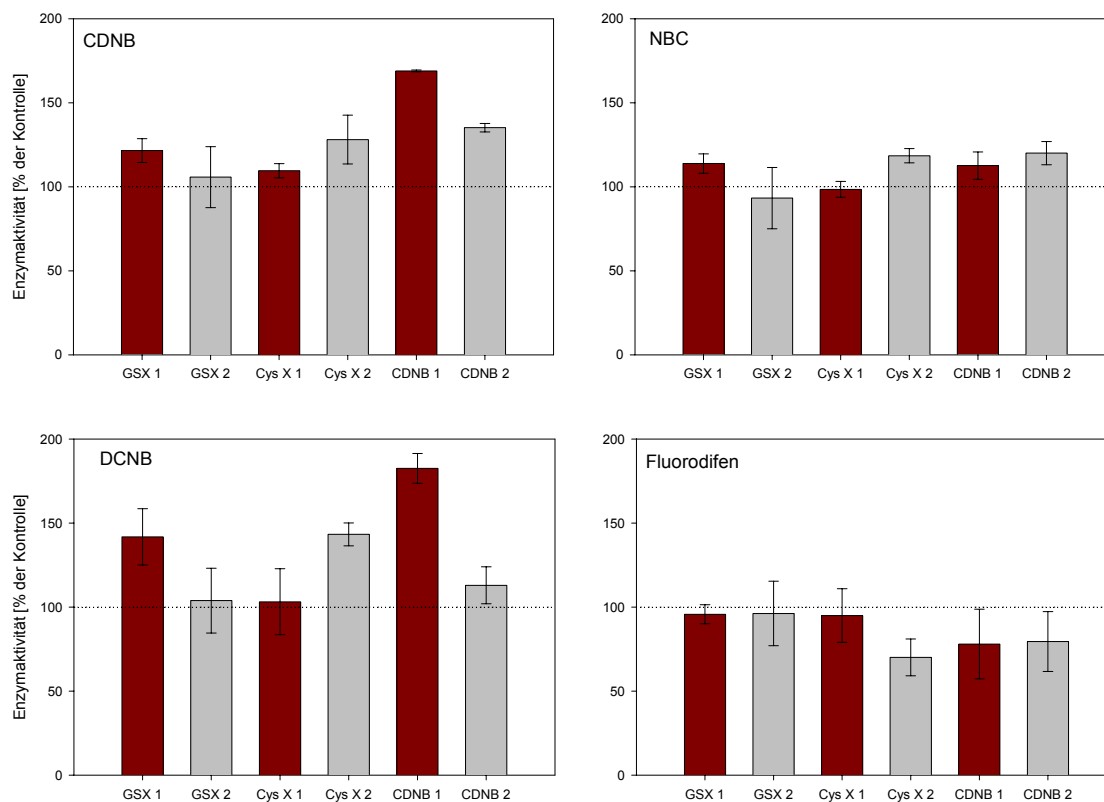
Für GS-X und CDNB zeichnet sich ab, daß eine höhere Konzentration eine stärkere Induktion der Enzymaktivität bewirkt. Die Unterschiede zwischen den Konzentrationen sind bei der begrenzten Probenzahl jedoch nur für Inkubation mit CDNB signifikant.

Für den Umsatz von DCNB zeichnet sich der gleiche Trend wie für den CDNB-Umsatz ab. Bei Inkubation mit CDNB ist die größte Aktivitätszunahme gegenüber der Kontrolle meßbar. Höhere Konzentrationen von GSX und CDNB bewirken eine größere Steigung der Aktivität als geringere Konzentrationen.

In ähnlicher Weise wird die Aktivität der NBC-GST von GS-X1 gesteigert, in der geringeren konzentrierten Variante jedoch gehemmt.

Cys-X hat nur in geringer Konzentration einen positiven Einfluß. Durch das pure CDNB wird die Aktivität stets gefördert, auch hier induziert die geringere Konzentration leicht stärker.

Auf den Umsatz von Fluorodifen haben das CDNB und seine Konjugate einen leicht hemmenden Einfluß. Die Enzymaktivitäten bleiben stets hinter der Kontrolle zurück. Dabei ist es lediglich bei Cys-X von Bedeutung, ob es hoch oder niedrig konzentriert zugegeben wurde. Wurde der Umsatz anderer Substrate durch die geringe Konzentration Cys-X gefördert, so wird der Umsatz von Fluorodifen stärker gehemmt.



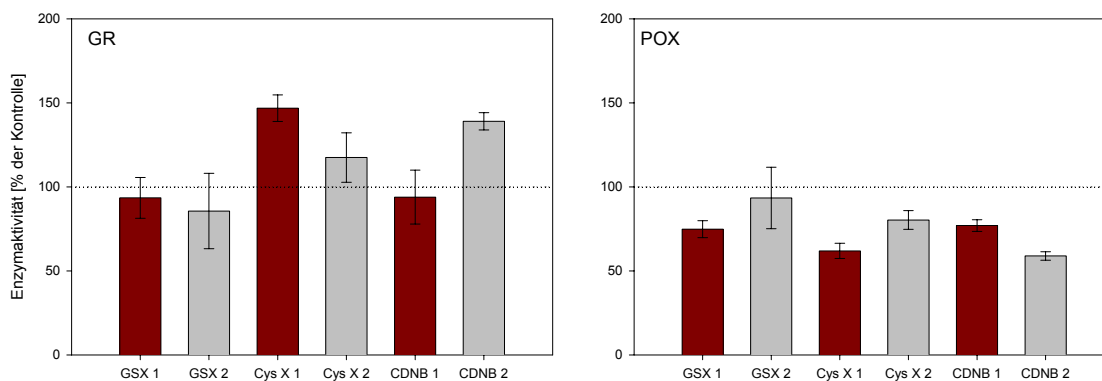
**Abb. 54:** Aktivitäten verschiedener GSTs in Tomatenblättern nach 24stündiger Inkubation mit GS-X, Cys-X und CDNB (jeweils zwei Konzentrationen,  $c_1 = 10 \times c_2$ ). Angegeben sind die prozentualen Enzymaktivitäten bezogen auf die unbeeinflusste Kontrolle (gepunktete Linie = 100%) und die Standardabweichung für  $n = 3$  ( $\alpha = 0,05$ ).

### 6.2.2 Sonstige Entgiftungsenzyme in Tomatenblättern nach Induktion mit Fremdstoff-Metaboliten

Die GSH-Reduktase-Aktivität wird durch das GSH-Konjugat gehemmt, ebenso durch das hochkonzentrierte CDNB. Cys-X und gering konzentriertes CDNB bewirken dagegen eine Förderung der Aktivität (Abb. 55).

Die Peroxidase-Aktivität ist durch die Zugabe von CDNB, GS-X und Cys-X stark unterbunden. Dieser Effekt der Hemmung ist bei den hochkonzentrierten Konjugaten größer als bei den niedriger konzentrierten.

CDNB dagegen hemmt stärker, wenn es niedriger konzentriert ist (Abb. 55).



**Abb. 55:** Aktivitäten von Glutathion-Reduktase (GR) und Guajacol-Peroxidase (POX) in Tomatenblättern nach 24stündiger Inkubation mit GS-X, Cys-X und CDNB (jeweils zwei Konzentrationen,  $c_1 = 10 \times c_2$ ). Angegeben sind die prozentualen Enzymaktivitäten bezogen auf die unbeeinflusste Kontrolle (gepunktete Linie = 100%) und die Standardabweichung für  $n = 3$  ( $\alpha = 0,05$ ).



## IV Diskussion

### 1 Synthese

Pflanzen entgiften einen Großteil an Giftstoffen über die Konjugation mit GSH (Marrs 1997; Lamoureux & Rusness 1986). Die so gebildeten Konjugate können in der Vakuole zwischen gespeichert und dort weiter abgebaut werden. Dabei entstehen als erste Metabolite  $\gamma$ GC-X und in der Folge Cys-X (Abb. 56).

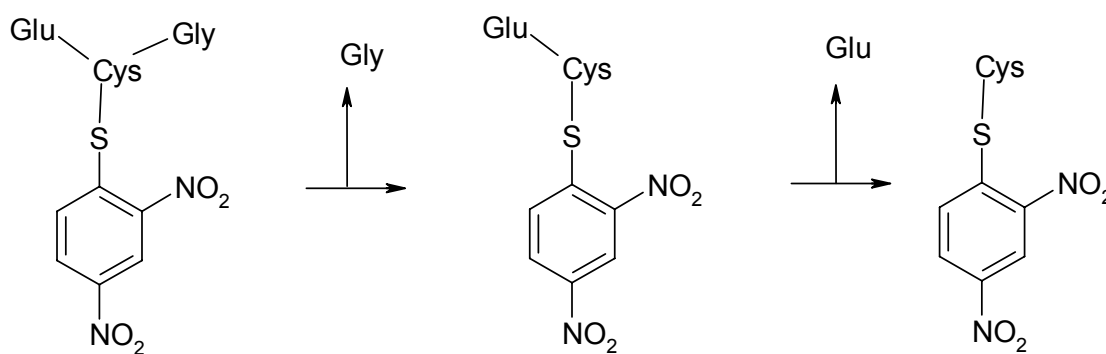


Abb. 56: Konjugation von GSH und CDNB zu GS-DNB und die nachfolgenden Metaboliten  $\gamma$ GC-DNB und Cys-DNB.

Für die *in vitro*-Synthese von GSH-Konjugaten und ihren Abbauprodukten liegen einige Protokolle vor, die sich jedoch nicht bewährt haben. Verschiedene Autoren (Wolf 1996; O'Connell 1988; Lamoureux & Rusness 1980) berichten, daß eine spontane, nicht-enzymatische Konjugat von GSH und CDNB in Anwesenheit von NaOH beschleunigt wird. Eigene Tests im Photometer haben jedoch gezeigt, daß auf diese Weise kein Konjugat entsteht. Vielmehr wird das CDNB chemisch stark verändert – der Reaktionsansatz ohne Thiol färbte sich innerhalb kürzester Zeit orange bis braun, was auf Phenol-Bildung schließen läßt – so daß es nicht mehr mit GSH zu dem gewünschten Konjugat reagieren kann.

Ebenso kritisch ist die oft erwähnte Zugabe von  $\text{NH}_3$  zum Reaktionsansatz zu bewerten, denn Messungen der Konjugationsraten im Photometer zeigten keine Reaktion. Wie auch bei der Zugabe von NaOH erfolgt ein starker Farbumschlag, der jedoch keinen Hinweis auf erfolgreiche Konjugation darstellt.

Besser ist der Ansatz von Scheer (2003) geeignet. Bei der Reaktion von GSH und CDNB in einem physiologischen Puffer (z. B. KPP, NaPP oder Tris/HCl) mit pH-Werten zwischen 7,5 und 7,8 entstehen sogar sehr große Konjugat-Mengen.

Für die Aufreinigung der Konjugate wird die Fraktionierung über SPE-Säulen empfohlen. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der präparativen HPLC ist, daß mehr Lösung in kürzerer Zeit aufgereinigt werden kann. Bei der präparativen HPLC kann man – je nach Säule und Pumpvolumen – 5 ml pro Lauf trennen. In Abhängigkeit vom Gradienten kann dies 30 min. und mehr Zeit in Anspruch nehmen.

Verwendet man dagegen SPE-Säulen auf einer Vakuumstation, kann man in der gleichen Zeit die 4fache Menge an Lösung aufreinigen. Die Reinheit der gesammelten Fraktionen wird anschließend z. B. per analytischen HPLC überprüft. Da es sich dabei nun lediglich um eine qualitative Analyse handelt, ist mit einem Autosampler eine Messung über Nacht möglich, was eine sehr große Zeitersparnis mit sich bringt.

Eine Aufreinigung mit Dichlormethan ist kritisch zu sehen. Es hat sich gezeigt, daß die Konjugat-Lösungen mehrfach mit diesem starken Lösungsmittel ausgeschüttelt werden müssen, um das Xenobiotikum aus der Lösung zu entfernen. Im Falle des GSH-Konjugates ist dies relativ gut möglich, für das Cys-Konjugat allerdings nicht praktikabel. Da die Konjugationsrate nur sehr gering ist, liegt noch viel freies CDNB im Reaktionsansatz vor, das dann nur in vielen Waschsritten herausgelöst werden kann.

Ungeachtet dessen entstehen bei dieser Methode der Aufreinigung große Mengen Lösungsmittelabfall, die wenig umweltverträglich sind und nur kostenintensiv entsorgt werden können.

Für die Konjugat-Lösung, die bei Versuchen mit lebenden Organismen eingesetzt werden sollen, ergibt sich, daß eine 100%ige Herauslösung des Xenobiotikums auf diese Weise nicht gewährleistet ist. Es besteht außerdem die Gefahr, daß das Dichlormethan seinerseits nicht zur Gänze von der Lösung getrennt werden kann. Damit erzeugt man im Testorganismus mit verbleibendem Xenobiotikum oder Dichlormethan eine Stresssituation mit entsprechenden Reaktionen, die nicht gewollt sind.

Wie bei der chemischen Synthese allgemein üblich, ist auch hier anzuraten, einen Reaktionspartner im Überschuß in den Ansatz zu geben. Nur so ist sein Reaktionsvermögen groß ge-

nug, um mit dem zweiten Partner quantitativ zu reagieren. Grundlage dieser Theorie, die sich auch in der Praxis bestätigt hat, ist das Massenwirkungsgesetz.

Daher ist es auch bei der Konjugation von Modell-Xenobiotikum (CDNB) und einem Thiol (GSH,  $\gamma$ GC, Cys) sinnvoll, einen Reaktionspartner mehrfach konzentriert in die Reaktion einzubringen.

In den vorliegenden Protokollen ist dies i. d. R. das Modell-Xenobiotikum. Der Grund liegt darin, daß bei einer anschließenden Aufreinigung mit Dichlormethan das lipophile Xenobiotikum in das Lösungsmittel übergeht, während das Konjugat in der wäßrigen Phase verbleibt. Das wasserlösliche Thiol dagegen kann man auf diese Art nicht aus dem Ansatz lösen.

Besser ist eine Aufreinigung via präparative HPLC. Dort erscheint ein zweiter Peak im Chromatogramm, so daß sich Konjugat und nicht konjugiertes Xenobiotikum leicht voneinander trennen lassen. Das freie Thiol ist in der HPLC-UV nicht detektierbar – eine Trennung somit schwierig.

Für die hier durchgeführten Versuche wurde jedoch ein Ansatz verwendet, der einen Überschuß an Thiol vorsieht. Es wurde postuliert, daß in keinem Fall eine 100%ige Konjugation erfolgt, also stets beide Konjugationspartner als freie Moleküle in der Lösung vorliegen. Wird auf eine Aufreinigung verzichtet, so hat ein Überschuß an Thiol den Vorteil, daß der Versuchsorganismus für die Entgiftung des freien CDNBs kein eigenes GSH verbrauchen muß, sondern auf das von außen zugegebene zurückgreifen kann. Der Organismus gerät also nicht unmittelbar in eine Mangelsituation, deren Reaktionen die Reaktion auf das Konjugat überdecken. Da das Thiol wasserlöslich ist, sollte es bei der Reinigung mit SPE-Säulen bereits in der ersten Fraktion (= 0% Acetonitril) von der Säule gespült werden. Verwirft man diese Fraktion, sind alle weiteren frei von Thiol.

Nach wie vor kritisch ist die Synthese des Cys-Konjugates, bei der sowohl das S-Cys-DNB als auch das N-Cys-DNB entstehen. Eine Differenzierung dieser Substanzen ist jedoch sehr wichtig, da das S-Cys-DNB im Organismus weiter abgebaut werden kann, wohingegen das N-Cys-DNB ein endständiger Metabolit ist, der in Pflanzen keinem weiteren Abbau unterliegt (Lamoureux et al. 1993).

Hier konnte leider keine vollständige Klarheit geschaffen werden. Eine Messung der Konjugation im Photometer ist wenig aufschlußreich, da keine sichere Unterscheidung zwischen S-Cys-DNB und anderen Reaktionsprodukten möglich ist. Es gibt Hinweise darauf, daß das S-Cys-DNB und N-Cys-DNB ihre Absorptionsmaxima bei unterschiedlichen Wellenlängen haben, dies ist jedoch nicht gesichert. Außerdem werden optische Eigenschaften wie das Ab-

sorptionsmaximum sehr stark von dem verwendeten Puffer beeinflusst. Dieser Sachverhalt bringt auch seine Schwierigkeiten bei der Detektion mit HPLC mit sich. Das S-Cys-DNB und das N-Cys-DNB sind nicht eindeutig mittels HPLC trennbar. Dies liegt vor allem auch daran, daß beide Moleküle die gleiche Masse haben und strukturell sehr ähnlich sind. Dadurch weisen sie gleiche Elutionseigenschaften auf C18-Material mit den Laufmitteln H<sub>2</sub>O und Acetonitril auf. Folglich ist auch eine Aufreinigung mit SPE-Säulen unmöglich.

Besser ist eine qualitative Trennung mittels CE. Das S-Cys-DNB und das N-Cys-DNB tragen in Abhängigkeit vom pH-Wert unterschiedliche Ladungen, weshalb sie sich im elektrischen Feld voneinander trennen (vgl. Titrationskurve Abb. 13, S. 29).

Erste Untersuchungen haben gezeigt, daß dieses Verfahren erst dann schlüssige Auskünfte liefert, wenn eine quantitative Synthese beider Substanzen gewährleistet ist, doch dazu sind die verwendeten Protokolle nicht ausreichend geeignet.

Es erscheint zwar in allen Analyseverfahren ein eindeutiges Signal, dies hat sich dann aber stets als N-Cys-DNB herausgestellt. Das S-Cys-DNB entsteht in den meisten Synthesen offenbar zu so geringen Teilen, daß es weder per HPLC noch mit der CE detektierbar ist.

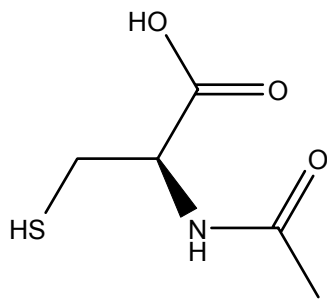
Vorläufig läßt sich nur bestätigen, daß die Konjugation nicht in saurem Milieu stattfindet. Messungen mit der CE haben jedoch bisher nur ergeben, daß nahezu ausschließlich das N-Cys-DNB gebildet wird. Von dem S-Cys-DNB finden sich nur Spuren.

Um die Ausbeute der Synthese zu steigern, empfiehlt es sich, statt des L-Cys das N-Acetyl-Cystein (Abb. 57) zu verwenden<sup>6</sup>. Bei diesem Molekül ist die Aminogruppe des Cys bereits mit einer Acetyl-Gruppe blockiert, kann somit also nicht mehr mit dem CDNB reagieren. Die Konjugation erfolgt damit an der Thiolgruppe zum S-Cys-DNB. Um das gewünschte Konjugat zu erhalten, muß anschließend die Acetyl-Gruppe von der Aminogruppe entfernt werden, was durch Kochen mit HCl erreicht werden kann (Clausen, persönliche Mitteilung 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte diese Methode leider nicht mehr evaluiert werden.

---

<sup>6</sup> Für diesen Vorschlag sei Dr. Clausen vom IÖC herzlich gedankt.



**Abb. 57: N-Acetyl-Cystein ( $C_5H_9NO_3S$ ; 163,19 u)**

Möglich ist auch, zunächst das GS-DNB herzustellen und aufzureinigen und dann mit Hilfe von peptidolytischen Enzymen das Molekül zu zerschneiden. Problematisch sind hier allerdings die ständige Verfügbarkeit des Enzyms und dessen hohe Kosten.

## 2 Transport und Translokation

Durch den Einsatz von Herbiziden in der landwirtschaftlichen Produktion sind die Kulturpflanzen Streß ausgesetzt, dem sie durch Induktion von GSTs begegnen. Über diese Entgiftungsenzyme werden die Herbizide im Organismus unschädlich gemacht.

Da erst seit kurzer Zeit klar ist, daß die entstehenden Fremdstoff-Metabolite nicht in der pflanzlichen Vakuole endgelagert werden, sondern sowohl dort einem Abbau unterliegen (Wolf et al. 1996) als auch über den Langstreckentransport innerhalb der Pflanze vom Ort der Entgiftung (Blatt) zur Wurzel transloziert werden können (Scheer 2003), wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst diese Translokation näher untersucht. Wie sich zeigte, wird das GSH-Konjugat viel schneller transportiert als das deutlich kleinere Cys-Konjugat. Es liegt demnach echter Transport und keine Diffusion vor. Dabei scheint es keine Rolle zu spielen, durch welches Gewebe die Substanzen befördert werden. Der Transport ist durch alle getesteten Gewebe (Gerstenwurzeln mit und ohne Wurzelspitze, vollständige Gerstenkeimlinge mit und ohne Wurzelspitze) deutlich meßbar.

Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß das pflanzliche Gewebe auf den Transport von GSH-haltigen Molekülen spezialisiert ist. Aus der Literatur ist bekannt, daß Pflanzen die Sulfat-Aufnahme über die Wurzel regulieren, indem sie ab einer bestimmten Konzentration das in den Blättern gebildete GSH, die ungiftige Transportform des Schwefels, in die Wurzel leiten. Dadurch wird die Wurzel veranlaßt, keinen weiteren Schwefel aufzunehmen. Wird wieder mehr Sulfat eingebaut, erfolgt ein Rücktransport des GSHs aus der Wurzel in den Sproß, und es wird wieder Sulfat aus dem umgebenden Medium aufgenommen (Saito 2004; Herschbach 2000).

Neuere Literatur weist ferner auf die Präsenz von GS-spezifischen, nach außen gerichteten ABC-Transportern im Plasmalemma hin, was diese Thesen stützt (Zhang et al. 2004; Bourbonloux et al. 2000).

Diese Signalfunktion des GSH konnte noch an anderer Stelle bestätigt werden (Schröder & Stampfl 1999). Hier wurde außerdem gezeigt, daß das  $\gamma$ GC als kleinere Untereinheit des GSHs diese Signalfunktion nicht innehat.

Es ist auch erklärbar, warum das Cys nicht so gut transportiert wird, obwohl es doch Bestandteil des GSHs ist. Cys ist zwar eine wichtige S-haltige Verbindung innerhalb des Organismus, weist aber auch toxische Eigenschaften auf (Heldt 2003).

Da mit dem Transport von GSH offenbar lebenswichtige Prozesse z. B. in der Biosynthese von Aminosäuren verbunden sind, liegt die Vermutung nahe, daß GSH bzw. GSH-haltige Moleküle sehr gut durch das Gewebe transportiert werden, um als Signale dienen zu können.

Die Versuche mit der PITMAN-Kammer bestätigen diese Vermutungen und erklären die Ergebnisse mit Hilfe der Literatur.

Durch die Eigenschaften des GSHs als Botenstoff in der S-Aufnahme wird deutlich, warum das GSH-Konjugat so gut durch das in die PITMAN-Kammer eingespannte Gewebe transportiert wird. Der Transport wird begünstigt, sobald auch Photosynthese-betreibendes Blattgewebe verwendet wird. Offenbar sind im Blatt ABC-Transporter vorhanden, die die Phloembeladung fördern.

Erstaunlich in dieser Versuchsreihe ist, daß ein GSH-haltiges Molekül wie das GS-DNB so gut transportiert wird. Offenbar ist es ausreichend, wenn bestimmte Seiten des Moleküls mit den im Gewebe enthaltenen Transportern in Kontakt gelangen. Ist ein Teil des GSH-Moleküls mit einem Xenobiotikum maskiert, hat dies keinen negativen Einfluß auf den Transport.

Demnach sind für den Transport andere Molekülbereiche zuständig als für die Konjugation mit Fremdstoffen. Ist bei der Konjugation die Thiolgruppe des GSHs als reaktiver Bereich beteiligt, ist es beim Langstreckentransport offenbar ein anderer.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch schon an anderer Stelle gemacht (van Bel 2003; Bourbonloux et al. 2000; Martinoia et al. 1993; Ishikawa 1987).

Mit einer Verringerung der Konjugat-Konzentration um den Faktor 10 in Kompartiment A konnte gezeigt werden, daß der Transport der GSH-haltigen Moleküle in jedem Fall gewährleistet ist und wenig konzentrationsabhängig ist. Selbst eine Überkonzentration führt nicht zu einer Überladung des Gewebes, bei der das System zusammenbricht und kein Transport mehr stattfindet. Eine Erhöhung der zu transportierenden Konjugat-Menge mündet vielmehr in gesteigerten Transportraten.

Interessanterweise konnte keine Wiederaufnahme der Konjugate aus wäßrigem Medium in die Wurzel und anschließender Rücktransport in den Sproß beobachtet werden. Diese Beobachtungen machte auch Scheer (2003) und belegt weiterhin, daß Fremdstoffe entweder frei in den Sproß transloziert werden oder als Konjugate nur dann transloziert werden, nachdem sie vom apikalen Meristem der Wurzelspitze konjugiert wurden. Lamoureux & Rusness (1995) berichten analog von einer Abgabe freier Herbizid-Wirkstoffe und deren Konjugaten

über die Wurzel mit anschließender Wiederaufnahme. Es darf aber nicht übersehen werden, daß die Herbizide i. d. R. in einer Formulierung vorliegen, die der Pflanze eine leichte Aufnahme ermöglichen (Hock 1995). Darüber hinaus sind die Konjugate aber auch größer als das ursprüngliche Wirkstoff-Molekül, so daß eine Aufnahme erschwert wird.

Die gesamte Wurzel erscheint jedoch hoch organisiert zu sein und in der Lage, sehr selektiv aus dem umgebenden Medium aufzunehmen.

Daß bei all diesen Versuchen echter, symplastischer Transport vorliegt, wird durch zwei Beobachtungen gestützt. Einerseits wird das große Molekül schneller transportiert als das kleinere. Würde es sich um diffusive Effekte handeln, müßte es gemäß dem BUNSENSchen Ausströmungsgesetz genau umgekehrt sein: kleine Moleküle diffundieren besser durch das Gewebe als große.

Außerdem konnte der Transport mit KCl-Lösung gehemmt werden. Unter Einfluß dieser Salzlösung schließen sich die Plasmodesmen im Gewebe. Sind diese Durchtritte zwischen den Zellen verschlossen, kann ein Transport lediglich über den Apoplast erfolgen. Da jedoch nach KCl-Zugabe keine weitere Konjugatzunahme in Kompartiment C festgestellt werden konnte, fällt diese Möglichkeit des Transportes aus. Ob sich die Plasmalemma-ständigen, GSH-abhängigen ABC-Transporter auf die gleiche Weise mit Vanadat oder Na-Azid hemmen lassen (Zhang et al. 2004), wie Scheer 2003 für Tonoplasten-ständige ABC-Transporter in lebendem Gewebe zeigen konnte, ist in weiterführenden Studien noch zu klären.

In den Versuchen mit der PITMAN-Kammer zeigte sich aber auch, daß eine besondere Funktion von der Wurzelspitze ausgeht. Wurde die Spitze an den Wurzeln belassen, war der Konjugat-Transport oft noch gesteigert gegenüber den dekaptierten Wurzeln.

Dies zeigt aber vor allem, daß Pflanzen in der Lage sind, Fremdstoff-Metabolite auszuscheiden. Die Metabolite werden eben nicht ausschließlich in das Gewebe eingelagert oder weiter metabolisiert, sondern aktiv mit Exudaten aus dem Organismus herausgeschleust. Damit wird außerdem den Arbeiten von Rusness et al. (1998) Rechnung getragen, die die Abgabe von Herbizid-Molekülen über die Wurzel an den Boden festgestellt haben.

Kann die Pflanze also die Fremdstoff-Metabolite an den Boden abgeben, so ergibt sich daraus eine nicht unerhebliche Beeinflussung für die Rhizosphären-Organismen.

Dies konnte in den unterschiedlichsten Versuchen gezeigt werden.



### 3 Wirkungen auf GSTs

#### 3.1 Meerrettich-Wurzeln

Seit langem schon ist bekannt, daß Pflanzen auf äußere Einflüsse reagieren, indem sie Entgiftungsenzyme (z. B. GSTs und Peroxidasen) hochregulieren (Edwards et al. 2000; Messner & Schröder 1999). Dies wird als generelle Antwort auf Streß angesehen. Es kann sich dabei sowohl um abiotische als auch biotische Faktoren handeln, wobei biotischer Streß, z. B. Angriff von Mikroorganismen, oft eine Hypersensitive Reaktion mit Nekrosebildung auslöst, die ein weiteres Vordringen des angreifenden Organismus im betroffenen Gewebe verhindern soll (Morel & Dangl 1997; Dempsey & Klessig 1995; Ryals et al. 1995).

Die hier untersuchten transformierten Meerrettich-Wurzeln zeigen Reaktionen, die in dieser Art nicht erwartet wurden. Auf die Besiedlung mit dem Bodenbakterium *Serratia liquefaciens* reagierte die Wurzel nicht mit erhöhter GST-Aktivität, sondern eher mit einer verringerten. Dies zeigt sich in den Wurzeln zum Zeitpunkt t<sub>0</sub>, die mit GS-X behandelt wurden.

Möglich ist, daß durch die Vor-Inkubation der Wurzeln die Reaktion auf die Bakterien vorzeitig ablief. Die eigentlichen Messungen wurden gestartet, als sich die Bakterien bereits in den Wurzeln etabliert hatten, die unmittelbaren Reaktionen der Wurzeln auf die Besiedlung waren also in den hier durchgeführten Versuchen gar nicht meßbar.

In dieser Versuchsreihe sollte aber auch nicht die Reaktionen der Pflanzen auf den bakteriellen Angriff gemessen werden, da die PGPR *Serratia liquefaciens* mit ihren positiven Einflüssen auf die Wurzeln nicht als Streßfaktor, der die GSTs induziert, betrachtet wird. Vielmehr sollte der Einfluß der Fremdstoff-Metabolite auf sterile bzw. PGPR-besiedelte Wurzeln untersucht werden und ob mit der bakteriellen Besiedlung eine Veränderung der Reaktionen einhergeht.

Es zeigte sich, daß die Metabolite eine sehr ausgeprägte Abwehrreaktion mit Änderungen in der GST-Expression auslösen.

Dabei scheinen selektiv spezielle Isoformen der GST von der Induktion betroffen zu sein. Das zeigt sich besonders nach Zugabe von GS-X, wenn die Umsatzraten für NBOC drastisch steigen, während der Umsatz von DCNB gegen Null geht. Dies ist differentielle Induktion, und es wurde erwartet, daß durch die Inkubation mit einem CDNB-Konjugat der Umsatz für CDNB bzw. ein chemisch sehr ähnliches Substrat wie DCNB stark induziert wird. Aus der Literatur ist bekannt, daß Pflanzen auf Pathogen-Befall mit einem oxidativen burst reagieren (Flocco & Giulietti 2003; Hancock et al. 2002 und 2001; Sasabe et al. 2000; Messner & Schröder 1999;

Wojtaszek 1997; Tenhaken et al. 1995), in dessen Folge z. B. GSTs induziert werden. Eine mit diesem burst vergleichbare Reaktion der Entgiftungsenzyme wurde daher erwartet.

Das Gegenteil wurde jedoch gefunden. Die Reaktionen der Wurzeln sind in Abhängigkeit von zugegebenem Konjugat und bakterieller Besiedlung ganz unterschiedlich. Bestehen zwischen sterilen und besiedelten Wurzeln nach Zugabe von GS-X kaum Unterschiede, so ist unter  $\gamma$ GC- und Cys-X-Einfluß sehr wohl ein Unterschied meßbar.

Wurde zu den Wurzeln  $\gamma$ GC-X gegeben, nehmen die GST-Aktivitäten in den besiedelten Wurzeln stark zu. Für den Umsatz von DCNB und NBOC ist jeweils 3 Std. nach Inkubation ein oxidativer burst meßbar, d. h. die starke Exkretion von  $H_2O_2$  ins Medium (Messner & Schröder 1999). Auch hier ist die NBOC-Aktivität deutlich höher als die anderer Isoformen der GST.

Die stärkste Reaktion konnte nach Zugabe des Cys-X gemessen werden. Hier reagieren jedoch nicht, wie in den anderen Versuchen, die besiedelten Wurzeln mit einem burst, sondern die sterilen. Über die Zeit reagieren die *Serratia liquefaciens* besiedelten Wurzeln sogar eher ausgeglichen.

Weiterhin ist nun kein Anstieg des NBOC-Umsatzes mit einem Rückgang des DCNB-Umsatzes meßbar. Vielmehr sind ein extremer Anstieg für den CDNB-Umsatz und ein völliger Rückgang des NBC-Umsatzes feststellbar.

Nach Zugabe von GS-X reagieren die Meerrettich-Wurzeln offenbar mit einem oxidativen burst. Die Peroxidase-Aktivität steigt transient stark an und geht dann rasch wieder auf Kontrollwerte zurück. Diese Reaktion erfolgt in den sterilen Wurzeln heftiger, aber auch 3 Std. später als in den *Serratia liquefaciens* besiedelten Wurzeln. Wurden die Wurzeln mit  $\gamma$ GS-X behandelt, reagieren ausschließlich die *Serratia liquefaciens* inokulierten. Auch hier tritt ein oxidativer burst auf. Ist zu den Wurzeln Cys-X gegeben worden, wird die Peroxidase-Aktivität der sterilen Wurzeln innerhalb der ersten 3 Std. vollständig gehemmt, die der *Serratia* besiedelten Wurzeln geht langsam zurück.

Da diese Abwehrreaktion in aller Regel rasch abläuft, kann ausgeschlossen werden, daß es sich bei den gemessenen Aktivitäten um Reaktionen auf die Inkubation mit *Serratia liquefaciens* handelt. Die Wurzeln waren zu Beginn der Messungen bereits 24 Std. mit dem Bakterium inokuliert, ein eventueller oxidativer burst gegen die Bakterien wäre somit schon abgeklungen. Zeigte sich in anderen Versuchsreihen (z. B. bei den Konjugat-behandelten Toma-

tenblättern und Bodenpilzen) eine Aktivitätszunahme in Abhängigkeit vom Metabolisierungsgrad der Konjugate, weisen die Meerrettich-Wurzeln ein gegenteiliges Verhalten auf. Die Peroxidase-Aktivität nimmt, je weiter das Konjugat abgebaut ist, stetig zu. Die sterilen Wurzeln haben nach GS-X-Zugabe ihr Aktivitätsmaximum nach 6 Std., wurde  $\gamma$ GC-X zugegeben, zeigt sich keine Veränderung über die Zeit, und auf das Cys-X reagieren sie mit einer Abnahme der Aktivität.

In den besiedelten Wurzeln scheinen diese Reaktionen versetzt einzutreten. Nach GS-X-Zugabe wird die stärkste Peroxidase-Aktivität bereits nach 3 Std. gemessen, nach  $\gamma$ GC-X-Zugabe nach 6 Std. – wenn die sterilen Wurzeln keine Veränderung mehr zeigen – und auf die Cys-X-Gabe wird mit einer langfristigen Absenkung der Peroxidase-Aktivität reagiert. Ein weiterer Abbauschritt des Konjugates würde in den *Serratia liquefaciens* besiedelten Wurzeln vermutlich auch zu einer drastischen Abnahme der Peroxidase-Aktivität führen.

Diese Versuchsreihe hat gezeigt, daß die Fremdstoff-Metaboliten GS-X,  $\gamma$ GC-X und Cys-X starke Veränderungen im GST-Muster in Pflanzenwurzeln hervorrufen.

Auffällig ist, daß mit steigendem Metabolisierungsgrad der Konjugate die Heftigkeit der Reaktion zunimmt. Konnten nach GS-X-Zugabe Enzymaktivitäten bis 4  $\mu$ kat/mg Konjugationsrate gemessen werden, sind es nach  $\gamma$ GC-X-Zugabe schon über 25 und nach Cys-X-Zugabe bis zu 100  $\mu$ kat/mg. Dies liegt vermutlich daran, daß durch den Abbau der Thiol-Konjugate der Xenobiotikum-Wirkstoff wieder deutlicher als solcher erkennbar ist. Als GSH-Konjugat ist der Wirkstoff maskiert und wird von der Pflanze nicht mehr als Giftstoff erkannt. Liegt dagegen ein Cys-Konjugat vor, fällt der Masken-Effekt weg und die Pflanze reagiert entsprechend auf den toxischen Fremdstoff.

In diesem Zusammenhang muß beachtet werden, daß Konjugat-Reste und vor allem CDNB-Reste an den Wurzeln, die dann über die gesamte Extraktion verschleppt werden, eine Steigerung der GST-Aktivität bewirken können (Schröder et al. 1994). Diese Beobachtung kann allerdings hier nur teilweise bestätigt werden. CDNB-Menge und Thiol-Gehalt waren in allen drei Versuchsreihen identisch, es kann also eine stets gleiche Behandlungstärke vorausgesetzt werden. Dennoch ist die Reaktionsstärke in allen Wurzeln stark verschieden. Induktion und Hemmung der einzelnen GSTs sind somit tatsächlich auf die einzelnen, chemisch unterschiedlichen Thiol-Konjugate sowie die Besiedlung mit *Serratia liquefaciens* zurückzuführen. Beeinflussung der GST-Aktivitäten durch äußere Faktoren konnte schon von verschiedenen Stellen berichtet werden. Eine Steigerung der GST-Aktivitäten in Pflanzen wird vor allem

nach Herbizid-Behandlung beobachtet. Untersuchungen dazu wurden an Mais durchgeführt (Dean et al. 1995; Irzyk & Fuerst 1993), vergleichbare Ergebnisse lieferten auch Arbeiten mit Weizen (Edwards & Cole 1996; Mauch & Dudler 1993).

Die Tatsache, daß mit gesteigerter GST-Aktivität auch die Abwehrfähigkeit von Pflanzen verbessert werden kann (Edwards et al. 2000; Schröder 2001), macht man sich hauptsächlich in der Entwicklung von Safenern zunutze. Diese PSM werden dazu entwickelt, die Kulturpflanzen gegen äußere Einflüsse zu stärken (DeRidder et al. 2002; Gaillard et al. 1994). Untersuchungen haben ergeben, daß dieser Stärkungseffekt vor allem durch die Steigerung der GST-Aktivitäten entsteht (Theodoulou et al. 2003; DeRidder et al. 2002).

Diese hohe GST-Aktivität kann so z. B. zu einer Resistenz gegen Atrazin führen (Anderson & Gronwald 1989). Änderungen im GST-Muster unter dem Einfluß von Safenern zeigten sich auch in Fichten-Nadeln aus exponierten Waldstandorten (Schröder & Wolf 1996).

Einige weitere Induktoren für GSTs sind Salicylsäure (Garreton et al. 2002; Messner & Schröder 1999; Dempsey & Klessig 1995), Phytohormone wie Auxin und Ethylen (Droog et al. 1993), Schwermetalle (Schröder & Stampfl 1999; Zenk 1996), Phytoalexine (Li et al. 1997) und natürliche Streßmetabolite (Skipsey et al. 1997).

Daß GSTs auch inhibiert werden können, ist bisher nur an Säugern gezielt untersucht worden (Ploemen 1994). Alle übrigen Autoren haben maximal einen zeitlich bedingten Rückgang, jedoch keine echte Hemmung der GSTs messen können.

In den Versuchen mit den Meerrettich-Wurzeln konnte sowohl eine positive als auch eine negative Beeinflussung der GSTs gemessen werden. Die Enzyme werden dabei nicht von völlig „artfremden“ Substanzen beeinflusst, sondern von ihren eigenen Produkten. Äußert sich die Beeinflussung in einer Hemmung der Aktivität, ist dies auf eine Produkthemmung zurückzuführen. Das bedeutet, daß ein Zuviel an GS-X die GST-Aktivität herabsenkt. Dies konnte bisher nur *in vitro* gezeigt werden (Lamoureux & Rusness 1986). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, daß dieses Phänomen auch *in vivo* auftritt.

Die Abbauprodukte des GS-X führen jedoch zu einer starken Steigerung der Aktivität. Da eine hohe GST-Aktivität ein Indikator für starken Streß ist, kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß  $\gamma$ GC- und Cys-X sehr große Streßfaktoren für die Pflanze sind. Gleichzeitig sagt eine hohe GST-Aktivität aber auch aus, daß die Pflanzen sehr gut in der Lage sind, den Streß abzuwehren. Das Phänomen der GST-Induktion durch GSH-Konjugate wird gerade in der Entwicklung von Safenern ausgenutzt (Riechers et al. 1996). Mit den Konjugaten wird die

GST-Aktivität stark erhöht, was der Pflanze bei der Abwehr von Streß (z. B. Herbizid-Behandlung) sehr zugute kommt.

Die Beobachtung, daß GSH-Konjugate einen gewissen Streßfaktor für die Pflanze bedeuten, steht im Widerspruch zu der Aussage Sandermanns, der fordert, daß die Konjugate nicht mehr phytotoxisch sind (Sandermann 1983).

Die Toxizität der Konjugate wird jedoch vor allem im Säuger-Organismus beschrieben (De-kant 2003; van Bladeren 2000; Schneider et al. 1999). Es wird sogar berichtet, daß GSH-Konjugate DNA-Addukte hervorrufen können (Wheeler et al. 2002).

In der Diskussion um Beeinflussung der GSTs in Pflanzenwurzeln und Wirkung von Thiol-Konjugaten auf Wurzeln spielen wurzellosoziierte Bakterien eine wichtige Rolle. Die besiedelten Wurzeln zeigten generell eine raschere und heftigere Reaktion als die sterilen Wurzeln. Damit sind die Wurzeln, die eine Symbiose mit einem Mikroorganismus eingegangen sind, besser gegen äußere Einflüsse geschützt und verfügen über ein höheres Entgiftungspotential. Die positive Bedeutung von Bakterien für die Entgiftungskapazität und Abwehr in Pflanzen ist an verschiedenen Stellen beschrieben worden (Normander & Prosser 2000; Tenhaken et al. 1995; Zablutowicz et al. 1995; Levine et al. 1994).

Bakterien haben aber vor allem deshalb diese positive Wirkung auf Wurzeln, da sie die Substanzen oft selbst abbauen und entgiften (Parales et al. 2000; Shima et al. 1997) und so einen regelrechten Schutzwall um die Wurzeln bilden. Fremdstoffe in der Rhizosphäre werden von den Bakterien an der Rhizoplane entgiftet, bevor die Xenobiotika überhaupt die Wurzel erreichen.

Inwieweit bei den hier durchgeführten Versuchen ausschließlich pflanzliche GSTs extrahiert wurden, ist unsicher. Es ist nicht gänzlich auszuschließen, daß zu geringen Teilen auch GSTs aus den Bakterien extrahiert und gemessen wurden. Da aber auch in der Natur Pflanzenwurzel und Bakterien nicht voneinander zu trennen sind und eine Einheit bilden, spielt es für die *in vivo* Bedingungen keine größere Rolle, welcher Organismus die Entgiftungsenzyme zur Verfügung stellt. Entscheidend ist, daß mit einer bakteriellen Besiedlung eine Steigerung der Entgiftungskapazität einhergeht, die in den unbesiedelten Wurzeln nicht meßbar ist.

Es wird jedoch ausgeschlossen, daß die Transformation der Meerrettich-Wurzeln selbst die Ursache für die hohen Enzymaktivitäten ist. Schmidt et al. konnten 1988 zeigen, daß sich pflanzliche Zellkulturen sehr gut eignen, um den Abbau von PSM zu untersuchen. Die Wurzeln zeigen keine Effekte, die nicht auch in vergleichbarer Weise in der Natur auftreten.

### 3.2 GSTs in mykorrhizierten Pflanzenwurzeln

Die GST-Aktivitäten variieren sehr stark zwischen den verschiedenen Pflanzen und zwischen den einzelnen Mykorrhizapilzen. Gerste zeigt hohe CDNB- und Fluorodifen-Umsatzraten, die von *Acaulospora longula* total unterdrückt werden. Dieser Pilz steigert allerdings den Umsatz von DCNB um ein Vielfaches. Pilze der Gattung *Glomus* bewirken generell leichte Aktivitätssteigerungen. Die Unterschiede gegenüber den Kontrollen sind jedoch geringer als bei *Acaulospora longula*.

Für Spitzwegerich-Wurzeln zeigt sich ein anderes Bild. Sie haben nur geringe GST-Aktivitäten, die mit einem Mykorrhizapilz erhöht werden. Vor allem der Umsatz von CDNB wird teilweise extrem gesteigert. Dies gilt auch für den Umsatz von NBOC, wenn die Wurzeln mit *Acaulospora longula* mykorrhiziert sind. Die *Glomus*-Arten unterdrücken diesen Umsatz.

In den Blauschwengelwurzeln zeigt sich ein deutlicher Trend. Die Kontrollwurzeln haben für alle getesteten Substrate hohe Umsatzraten, die mit den Mykorrhizapilzen ausnahmslos gehemmt werden.

Für alle drei getesteten Pflanzen zeigte sich, dass sie sehr hohe Umsatzraten für das Herbizid Fluorodifen besitzen. Dieses Gräser-Herbizid fand bis vor einigen Jahren in der landwirtschaftlichen Praxis Anwendung, die Reaktionen der Pflanze und ihrer Rhizosphäre sind damit also durchaus von Bedeutung.

Wie sich zeigte, verfügen Gerste, Spitzwegerich und Blauschwengel über extrem hohe GST-Aktivitäten, es wurde ein Fluorodifen-Umsatz von 200 mkat/mg gemessen.

Damit sind die hier verwendeten Pflanzen sehr gut in der Lage, Dinitrophenylether wie das Fluorodifen zu entgiften.

Durch die Besiedlung mit *Acaulospora longula* werden diese hohen Aktivitäten in allen Pflanzen stark herabgesenkt, während *Glomus intraradices*-Besiedlung sie in Blauschwengel auf Kontroll-Niveau hält. Einzig *Glomus mossea* kann in Spitzwegerich noch eine Steigerung der Aktivität bewirken.

Für Pflanzen bedeutet dies, dass eine Mykorrhizierung die Fähigkeit zur Entgiftung von Herbiziden wie dem Fluorodifen stark beeinflusst. Gerade im Falle von Kulturpflanzen (z. B. Gerste) ist dies jedoch nicht erwünscht.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Pflanzen, die mit einem Mykorrhizapilz besiedelt sind, generell Herbizid-Angriff besser standhalten als unbesiedelte Pflanzen, da über den Pilz eine

bessere Nährstoffversorgung der Pflanze gewährleistet ist (Bethlenfalvay et al. 1996a und 1996b). Ob dies auch für die mit der Mykorrhizierung einhergehende Herabsetzung der GST-Aktivitäten gegenüber Fluorodifen zutrifft, kann aus den vorliegenden Studien nicht bewertet werden.

Die Wirkungen der Mykorrhizapilze sind demzufolge stark abhängig von der Pflanze, die sie besiedeln. Eine allgemein gültige Aussage über die oft erwähnten positiven Wirkungen läßt sich auf der Grundlage der hier erhobenen Daten nicht treffen. Besonders erstaunlich ist, daß es in einer Pflanze zu einer vollständigen Verringerung sämtlicher GST-Aktivitäten kommen kann, wie für den Blauschwengel gezeigt.

In der Literatur finden sich überwiegend Hinweise auf die positiven Auswirkungen von Mykorrhizapilzen auf Pflanzen. Durch die Pilze wird die Oberfläche der Pflanzenwurzeln um ein Vielfaches vergrößert, wodurch mehr Wasser und mehr Nährstoffe aus dem Boden aufgenommen werden können. Die aufgenommenen Substanzen werden vom Pilz an die Pflanze weitergeleitet, die ihrerseits den Pilz mit C-haltigen Produkten aus der Photosynthese versorgt (Varma & Hock 1999; Smith & Read 1997).

Die Mykorrhizierung bringt aber noch weitere Vorteile für die Pflanze. Schon seit langem ist bekannt, daß Pflanzen, die mit einem Mykorrhizapilz eine Symbiose eingegangen sind, deutlich toleranter gegen Schwermetalle sind als nicht-mykorrhizierte Pflanzen (Hildebrandt et al. 1999). Die positive Wirkung von Mykorrhiza wird auch in Zusammenhang von Herbizid-Behandlung erwähnt (Bethlenfalvay 1996a und b). Es zeigte sich, daß mykorrhizierte Pflanzen die Herbizidbehandlung besser überstehen, da sie über den Pilz besser nährstoffversorgt sind.

Mit der Mykorrhizierung geht auch eine verbesserte Fähigkeit zur Abwehr einher. Garcia-Garrido & Ocampo berichten, daß sämtliche bekannte Abwehrmechanismen in der Pflanze exprimiert werden (Garcia-Garrido & Ocampo 2002).

In Verbindung mit der Induktion der Aktivität von Entgiftungsenzymen aus der Familie der GST wurden Mykorrhizapilze bislang nicht diskutiert. Zwar ist bekannt, daß auch diese Pilze diese Enzyme besitzen. Wie sich aber das GST-Muster der Pflanzen in Abhängigkeit mit einem derartigen Pilz verändert, ist bislang nicht veröffentlicht worden.

Wie anfangs bereits erwähnt, sind die Effekte stark abhängig vom Pilz und von der Pflanze.

Die GST-Aktivität ist ein Indikator für Streß bzw. reagiert ein Organismus mit einer Erhöhung der GST-Aktivität auf äußere Einflüsse (Schröder 2001; Edwards et al. 2000).

Es ist möglich, daß auch Mykorrhizapilze zunächst einen Streßfaktor für die Pflanze darstellen, der eine Steigerung der Enzymaktivitäten induziert. Ein derartiger Effekt wurde von Mauch & Dudler als Reaktion auf pilzliche Pathogene in Weizen festgestellt (Mauch & Dudler 1993). Die Pathogen-Abwehr zeigt generell den Verlauf eines oxidativen burstes, nach einer erfolgreichen Abwehr (nach etwa 3 Std.) werden die beteiligten Enzyme im Regelfall wieder herunterreguliert. Im Rahmen der Dissertation konnte aber auch an anderer Stelle gezeigt werden, daß dies nicht immer zutrifft. Auch die transformierten Meerrettich-Wurzeln zeigten 24 Std. nach Inokulation mit *Serratia liquefaciens* noch erhöhte GST-Aktivitäten gegenüber den sterilen Kontrollwurzeln (Diekmann et al. 2004).

Es wird auch postuliert, daß die Pflanzen mit erhöhter GST-Aktivität Streß besser begegnen können (Riechers et al. 1996). Damit wären die positiven Auswirkungen der Mykorrhizierung bestätigt.

Da dies jedoch nicht in jedem Fall zutrifft, am konkreten Beispiel mit mykorrhizierten Blauschwingelwurzeln sogar stets zu einer verminderten GST-Aktivität führt, müssen andere Faktoren angeführt werden, die einen Vorteil der Mykorrhizierung bedeuten.

Denkbar ist, daß die positive Wirkung des Pilzes dadurch zustande kommt, daß die Streßfaktoren die Pflanze über den Pilz erst gar nicht erreichen. Eine Induktion von Entgiftungsenzymen in der Pflanze ist also überflüssig. Für diese Versuchsreihe kann ausgeschlossen werden, daß pilzliche GSTs gemessen wurden. Eine Trennung von Pilz und Pflanze erfolgte zwar nicht, da dies für die arbuskuläre Mykorrhiza nicht ohne weiteres möglich war. Es ist jedoch fraglich, ob mit der Methode zur Extraktion pflanzlicher GST (Schröder et al. 1990) auch pilzliche GSTs extrahiert werden können, liegt hierfür doch ein anderes Protokoll vor (Bieber 2000). Darüber hinaus ist fraglich, ob der Anteil pilzlicher GST gegenüber dem der Pflanzen so groß ist, daß ein Einfluß bei den Substrat-Tests im Photometer meßbar ist.

Peroxidase-Aktivität für Guajacol ist in nicht-mykorrhizierten Wurzeln von Gerste, Spitzwegerich und Blauschwingel nicht exprimiert. *Acaulospora longula* erzeugt in Wegerich-Wurzeln dagegen sehr hohe Aktivität, ebenso die beiden *Glomus*-Arten in Gerste. *Glomus* induziert auch in Blauschwingel Peroxidase-Aktivität, dies jedoch nur verhalten.

*Acaulospora longula* ist offenbar ein Mykorrhizapilz, der in dikotylen Pflanzen (Spitzwegerich) die Peroxidase stark aktiviert. Dies scheint auch dauerhaft und keine Abwehrreaktion auf Pathogene zu sein, da die Besiedlung der Pflanze lange zurücklag. Selbiges gilt für *Glomus* in monokotylen Pflanzen (Gerste, Blauschwingel).



Eine Erhöhung der Peroxidase-Aktivität ist als klassische Abwehrreaktion gegen Pathogene lange bekannt und wird auch während der Besiedlung einer Pflanzenwurzel mit Mykorrhizapilzen beobachtet (Salzer et al. 1999). Üblicherweise nimmt die Aktivität über die Zeit aber wieder ab und bleibt nicht dauerhaft auf einem erhöhten Niveau wie im vorliegenden Fall.

Es ist allerdings möglich, daß die Pflanzen zu einem Zeitpunkt geerntet wurden, an dem die Pilze sehr mykorrhizierungsfreudig waren, und die Hyphen an sehr vielen Stellen die Wurzel befielen. Dieser Invasion wurde von Pflanzenseite mit einer Steigerung der Peroxidase-Aktivität begegnet. Vermutlich würde die Reaktion in einem Inokulum, das eine geringere Pilz-Dichte aufweist, schwächer ausfallen.

## **4 Toxintest**

### **4.1 Visuelle Symptome**

Der Toxintest sollte die Giftigkeit von CDNB als Modell-Xenobiotikum und dessen Stoffwechselprodukte GS-X und Cys-X charakterisieren.

Es zeigte sich, daß sowohl Tomatenstecklinge als auch vollständige Tomatenpflanzen Schadsymptome in Form von Welke, Chlorose und Nekrose zeigen. Dabei sind die Reaktionen in den hochkonzentrierten Varianten stets am heftigsten.

Entscheidend bei diesem Versuch ist jedoch, daß die Pflanzen und Stecklinge in den Konjugat-Lösungen nur bis zu einem gewissen Grad reagieren. Das Maximum an Reaktion ist i. d. R. mit Boniturstufe 2 (vgl. Tab. 6; S. 45) erreicht.

Anders dagegen die Pflanzen in der CDNB-Lösung, die als Positivkontrolle betrachtet werden können. Hier werden die einzelnen Symptome teilweise vollständig, d. h. über das gesamte Gewebe verbreitet, ausgebildet.

Erstaunlich bei diesem Versuch ist, daß sogar die bewurzelten Pflanzen Reaktionen zeigten. Die Ausbildung dieser Schadsymptome im Sproß kann nur deshalb erfolgen, weil die Pflanzen die Substanzen zuvor aufgenommen und in das Sproßgewebe transloziert haben. Dies steht im Widerspruch zu den Beobachtungen aus der PITMAN-Kammer, wo gezeigt werden konnte, daß Wurzeln nicht in der Lage sind, Thiol-Konjugate aufzunehmen.

Für diese Ergebnisse kann es verschiedene Erklärungen geben. Bei der Tomate handelt es sich um eine dikotyle Pflanze aus der Familie der Nachtschattengewächse, die Gerste ist ein monokotyles Süßgras. Es ist denkbar, daß beide Pflanzen unterschiedliches Wurzelgewebe mit unterschiedlichen Aufnahmekapazitäten haben. Gerste könnte z.B. selektiver Stoffe aus dem

Boden aufnehmen als Tomate. Den Reaktionen der Tomaten nach zu urteilen sind die Gersten mit dieser Fähigkeit klar im Vorteil. Die Pflanze nimmt nur Stoffe auf, die ihr einen Nutzen bringen können. Giftstoffe, die sie am Ende gar selbst entgiftet und erfolgreich ausgeschieden hat, können nicht wieder in den Organismus gelangen.

Es zeigte sich aber auch, daß sich die Tomatenpflanzen nach einiger Zeit wieder erholt haben, nachdem sie in die Testlösungen gestellt wurden. Sehr deutlich ist dies bei der Ausbildung der Welke zu sehen. Nach etwa einer Woche war das Symptom weniger ausgeprägt als während der ersten 5 Tage (Abb. 53).

Denkbar ist weiterhin, daß die großen Tomatenpflanzen im Gewächshaus im Vergleich zu den kleinen Gerstenkeimlingen im Labor deutlich erhöhte Transpirationsraten hatten. Um Trockenstreß zu vermeiden, waren die Pflanzen gezwungen, große Mengen Flüssigkeit aufzunehmen. Offenbar war den Pflanzen ein ausgeglichener Wasserhaushalt wichtiger als der Schutz vor Giftstoffen.

Für eine Klärung der Frage, ob dikotyle Pflanzenwurzeln GSH-Konjugate aufnehmen und transportieren, ist es sinnvoll, die Studien mit der PITMAN-Kammer entsprechend auszuweiten. Im vorliegenden Fall sind wohl eher Randeffekte, die auf allgemeinen Streß der Pflanzen zurückzuführen sind, gemessen worden und keine Effekte durch die Konjugat-Lösungen.

Was die Wirkungen der Testlösungen im Einzelnen anbelangt, entspricht der Test den Erwartungen.

Die CDNB-Lösung erzeugt die heftigsten Reaktionen. Da es als Modell-Xenobiotikum betrachtet wird, ist die Reaktion der dikotylen Tomate nicht überraschend.

Erstaunlich ist dagegen, daß die Versuchsglieder in den Thiol-Lösungen fast ebenso stark reagierten wie in der CDNB-Lösung. Hier wären deutlich abgeschwächtere Reaktionen zu erwarten gewesen. Das Modell-Xenobiotikum ist zwar durch Konjugation mit GSH und Cys innerhalb der Pflanze entgiftet (Marrs 1997; Lamoureux & Rusness 1986), werden diese Substanzen jedoch wieder in den Organismus zurückgeschleust, geht von ihnen eine schädigende Wirkung aus.

Die von Sandermann (1983) erwähnte Ungiftigkeit der Konjugate kann somit nur eingeschränkt bestätigt werden. Würde es sich um ungiftige Substanzen handeln, dürften die Symptome gar nicht oder nur sehr schwach ausgeprägt sein. Da dies jedoch nicht der Fall ist, können die Fremdstoff-Metabolite nicht als völlig unbedenklich eingestuft werden.

Eingeschränkt wird die Phytotoxizität allerdings durch die Tatsache, daß ein gewisses Schadmaß nicht überschritten wird. Die Pflanzen sind offenbar in der Lage, über die Zeit mit dem Streßfaktor Konjugat zurechtzukommen. Anders ist es bei der Xenobiotikumlösung, hier werden die Schadsymptome voll ausgebildet, und die Pflanze stirbt.

#### 4.2 Enzymologische Untersuchungen

Die Reaktionen der Tomatenblätter auf die Behandlung mit GS-X-, Cys-X- und CDNB-Lösung zeigen keinen deutlichen Trend. Veränderungen in den Enzymaktivitäten auf die GS-X-Lösungen scheinen nicht signifikant zu sein, ebenso die Reaktionen auf die hochkonzentrierte Cys-X-Lösung. Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß die höher konzentrierte Lösung die Umsatzraten für CDNB, DCNB und NBC steigern.

Auf die Zugabe der CDNB-Lösung und niedrig konzentrierte Cys-X-Lösung reagieren die Tomaten wiederum mit einer Steigerung der Enzymaktivitäten (CDNB, DCNB, NBC) und einem Rückgang des Fluorodifen-Umsatzes. Unter diesen Bedingungen sind die Effekte jedoch – verglichen mit der Kontrolle – signifikant.

Durch das GS-X ist keine Beeinflussung der Glutathion-Reduktase (GR) meßbar. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle bestehen durch eine hohe Gabe an Cys-X und niedrig konzentrierte CDNB-Lösung. Die Peroxidase-Aktivität wird von allen Lösungen gehemmt, einzig niedrig konzentrierte GS-X-Lösung hat keinen Einfluß.

Aus verschiedenen Quellen ist bekannt, daß die GSTs in Tomaten induziert werden können. So berichten Kuzniak et al. (2004) von einer Steigerung der GST-Aktivität nach Befall mit *Botrytis cinerea*. Mittova et al. (2003) konnten feststellen, daß in Salz-toleranten Tomaten die GST besonders exprimiert sind. Keiner der Autoren konnte dagegen eine Veränderung in der GR-Aktivität messen.

Beide Autoren-Gruppen haben ihre Versuchspflanzen über mehrere Tage behandelt. Dies erschien im vorliegenden Fall jedoch nicht geeignet, da die Tomaten im Toxintest z. T. so heftig reagierten, daß eine Enzymextraktion nicht mehr repräsentativ gewesen wäre.

## 5 Wirkungen der Konjugate auf Mikroorganismen

### 5.1 GSTs in Pilzen nach Konjugat-Zugabe

Die Reaktionen der Bodenpilze *Chaetomium (globosum)*, *Fusarium graminearum* und *Trichoderma* spp. fallen ganz unterschiedlich aus. Je nach zugegebener Substanz und dessen Konzentration reagieren die Pilze mit einer Steigerung oder Hemmung der GST-Aktivitäten. Auffällig in dieser Versuchsreihe war, daß die Pilze kaum in der Lage sind, das CDNB umzusetzen. In Pflanzen finden sich stets hochaktive GSTs, die diese Substanz entgiften können. Pilze dagegen haben eher GSTs, die hohe Umsatzraten für NBC und/oder NBOC zeigen.

Ungeachtet dessen sind auch für die Pilze Effekte meßbar, wie sie auch schon für transformierte Meerrettich-Wurzeln festgestellt wurden. Die Pilze reagieren ebenso wie die Wurzeln auf das Cys-Konjugat stärker als auf das GSH-Konjugat. Mit steigendem Metabolisierungsgrad wird das ursprünglich entgiftete Xenobiotikum-Molekül seiner Wirkstoff-Form wieder ähnlicher und löst entsprechende Streßreaktionen aus. Diese Reaktionen äußern sich in den Bodenpilzen mit einer Veränderung des GST-Haushaltes. Der Wirkstoff selbst löst in den Pilzen die stärkste Reaktion aus. Die CDNB-GSTs erfahren – besonders in der *Trichoderma* - eine starke Beeinflussung. Alle übrigen GSTs reagieren unauffällig.

Ein derartiger Effekt war zu erwarten. Das CDNB induziert entsprechende Isoformen der GSTs, was dann im Photometer-Test deutlich meßbar ist.

Besonders auffällig ist die Entwicklung der NBOC-GST im Vergleich zur CDNB-GST. Sowohl in den Pilzen als auch in den transformierten Meerrettich-Wurzeln konnte nach GS-X-Zugabe ein starker Anstieg der NBOC-GST gemessen werden, wohingegen die CDNB-GST nur geringe Aktivität zeigte.

Ganz offenbar handelt es sich hierbei um ein Phänomen, das nicht auf eine einzelne Art beschränkt ist, sondern sich über ganz unterschiedliche Organismen (höhere Pflanzen und Pilze) erstreckt. Vermutlich wird hier ein Enzymmuster exprimiert, das sich im Laufe der Evolution nicht stark verändert hat. Molekular-biologische Methoden könnten helfen, diese Hypothese zu testen und zu bestätigen.

Da jedoch die Enzymtests der pilzlichen GSTs im Vergleich zu höheren Pflanzen nur verhältnismäßig geringe Aktivitäten zeigten, liegt die Vermutung nahe, daß Pilze über andere GSTs verfügen als Pflanzen, denn die verwendeten Substrate bilden i. d. R. ein breites Spektrum

pflanzlicher GSTs ab. Bisher ist nur wenig über die natürlichen Substrate von GSTs bekannt, warum Pilze ein deutlich verändertes GST-Muster im Vergleich zu höheren Pflanzen haben, bleibt somit spekulativ. Ein wichtiger Grund scheint zu sein, daß Pilze nicht in dem Maße wie Pflanzen über die Möglichkeit, Giftstoffe in die Zellwand einzubauen, verfügen. Eine effektive Entgiftung über GSTs erscheint sinnvoll. Demzufolge werden möglicherweise andere GSTs induziert.

## 5.2 Wirkungen auf Bakterien

Der Einfluß der Konjugate auf die Bakterien ist ausgeprägter als auf die Pilze. Gegenüber den unbeeinflussten Kontroll-Suspensionen ist das Wachstum durch die Thiol-Konjugate und das CDNB unabhängig von der Konzentration vermindert.

Es fällt auf, daß die Wachstumshemmung unter Konjugat-Einfluß stärker ist als unter CDNB-Einfluß. Dies ist sehr erstaunlich, denn von dem Modell-Xenobiotikum wurde eher erwartet, daß es das bakterielle Wachstum stärker hemmt als die S-haltigen Konjugate. Im Falle von *Burkholderia cepacia* wird das Wachstum sogar gegenüber der Kontrolle gefördert.

Das Wachstum von *Serratia liquefaciens* wird langfristig stimuliert, wenn zu den Bakterien eine hochkonzentrierte Thiol-Lösung gegeben wird. Auch eine geringe Menge des Modell-Xenobiotikums CDNB zeigt gute Wirkung. Besonders bei Anwesenheit eines Amids (Glucuronamid oder L-Alaninamid) oder einer Carboxylsäure ( $\alpha$ -Keto-Valerian-Säure) zeigt *Serratia liquefaciens* gutes Wachstum. Gibt man Sebacinsäure zu, ist ein Wachstum unter Konjugat-Einfluß gesichert.

Eine Wachstumsförderung von *Burkholderia cepacia* ist möglich nach Zugabe von CDNB und einem Thiol in Anwesenheit von  $\beta$ -Methyl-D-Glucosid.

Eine über alle Substrate verteilte Förderung erzielt man nach Zugabe einer geringen Menge DCNB.

Auch *Burkholderia sacchari* wird durch die Thiole gefördert, vor allem in Kombination mit L-Glutaminsäure. Die Modell-Xenobiotika allein hemmen das Wachstum. Eine Mischung aus

CDNB und GSH hat dagegen eine noch bessere Wirkung als das Thiol allein. Dann sollte  $\alpha$ -Cyclodextrin, Gentiobiose oder Uridin zugegeben werden.

Das Wachstum von *Serratia liquefaciens* kann unterdrückt werden mit DCNB. Keinen Einfluß zeigt dagegen das GS-DNB.

Eine geringe Menge dieser Substanz hemmt dagegen das Wachstum von *Burkholderia cepacia*.

*Burkholderia sacchari* wird am effektivsten mit DCNB unterdrückt. Auch CDNB kann das Wachstum eindämmen. GS-DNB ist dagegen ohne Wirkung.

Die Beobachtung, daß Bodenbakterien unter Xenobiotika-Einfluß besser wachsen, machten auch schon Omar & Abdel-Sater (2000). Auch sie stellten fest, daß eine geringe Xenobiotika-Menge eine Wachstumsförderung bewirken kann. Wird dagegen mehr PSM zugegeben, ist das bakterielle Wachstum gehemmt (Omar & Abdel-Sater 2000).

Zablutowicz 1995 konnte zeigen, daß dieser Metabolismus mit GST-Aktivitäten verbunden ist. Weiterführende Versuche mit GSH-Konjugaten und dessen Abbauprodukten  $\gamma$ GC-X und Cys-X ergaben, daß eine *Serratia*-Art und *Pseudomonas cepacia* (heute *Burkholderia cepacia*) in der Lage sind, diese Substanzen abzubauen.

Es fehlen in der Literatur jedoch Angaben, ob ein Thiol (z. B. GHS,  $\gamma$ GC oder Cys) einen Effekt auf die Bakterien hat.

Pan et al. (1999) berichten, daß *Serratia liquefaciens* und Kinetin das pflanzliche Wachstum fördern. Welche Rolle das Kinetin dabei für das Bakterium spielt, bleibt jedoch unklar. Diese Gruppe konnte auch feststellen, daß das stofflich ähnliche Genistein diese Effekte nicht erzeugt (Pan et al. 2002).

Die positiven Wirkungen von Bodenbakterien auf das pflanzliche Wachstum sind seit langem bekannt und wurden von vielen Stellen berichtet. *Serratia* fördert das pflanzliche Wachstum vor allem dann, wenn die Temperatur etwa 25°C beträgt (Zhang et al. 1997). Doch auch bei geringen Temperaturen konnte ein positiver Effekt gemessen werden.

*Burkholderia cepacia* hat durch die Ausscheidung verschiedener Stoffe fungizide Wirkung (Ravenskov et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, daß dieses Bakterium Pilze aus der Gattung *Fusarium* zurückdrängen kann bzw. Pflanzen bei *Burkholderia cepacia*-Besiedlung einem Angriff dieser Pilze besser standhalten können (Peix et al. 2001).

Parales et al. (2000) konnten zeigen, daß *Burkholderia cepacia* besondere Affinität zu Toluol zeigt. Das Bakterium schwimmt zu dieser Substanz und leitet so dessen Abbau ein.

Die vorteilhafte Wirkung von *Burkholderia cepacia* auf das pflanzliche Wachstum ist auch von Chiarini et al. (1998) bestätigt worden.

Die Wirkungen von *Burkholderia sacchari* sind bislang nicht erforscht, da es sich bei diesem Bakterium um eine sehr neue Art handelt, die 2001 von Brämer et al. erstmalig beschrieben wurde.

Die Ergebnisse und Aussagen, die man aufgrund des BIOLOG-Versuches treffen kann, sind stark abhängig vom Meßzeitpunkt. Mißt man die Platten 3 Std. nach der Inkubation, so ergibt sich ein völlig anderes Bild gegenüber der 24stündigen Inkubation.

Vom Hersteller wird zwar empfohlen, einmalig nach 3stündiger Inkubation zu messen. Langfristige Folgen und Auswirkungen auf die betreffende Bakterien-Population treten jedoch erst nach längerer Inkubation hervor.

Die unterschiedlichen Auswerte-Verfahren des BIOLOG-Versuches zeigen sehr unterschiedliche Ergebnisse. Zeigen sich in der klassischen Auswertung nach Garland & Mills (1991) keine signifikanten Abweichungen zwischen den einzelnen Behandlungen, sind die Unterschiede durch die modifizierte Auswertung deutlicher hervorgehoben. Das liegt hauptsächlich daran, daß bei der klassischen Auswertung die BIOLOG®-Platten mit ihren 95 C-Quellen als Gesamtheit betrachtet werden, wohingegen bei der eigenen Auswertung diese 95 unterschiedlichen Substrate getrennt voneinander behandelt werden. Außerdem stehen die Behandlungen bei der Auswertung nach Garland & Mills (1991) lediglich in statistischen Bezug zur Kontrolle. Bei der eigenen Auswertung werden Behandlung und Kontrolle unmittelbar miteinander in Beziehung gesetzt.

Welche Methode für die Auswertung die bessere ist, scheint wenig deutlich zu sein. Die Hauptkomponentenanalyse ist ein rein statistisches Verfahren, daß sich für die Interpretation der BIOLOG®-Platten durchgesetzt hat. Für einen Überblick über die Gesamtheit der Reaktion auf die Substrate unter Einfluß eines einzigen Faktors (z. B. Zugabe einer Substanz) ist es sehr aussagekräftig.

Will man aber gleichzeitig die Unterschiede zwischen den einzelnen C-Quellen herausfinden, ist es zu ungenau. Hier bietet sich eine Auswertung nach der o. g., selbstentwickelten Metho-

de an. Mit der modifizierten Auswertung kann der Focus auf einzelne, ausgewählte C-Quellen gerichtet werden. So kann ermittelt werden, ob Effekte, die durch die Zugabe verschiedener Substanzen hervorgerufen werden, von einzelnen C-Quellen ausgeglichen oder sogar noch verstärkt werden können.

In der Literatur finden sich sehr viele Hinweise zu verschiedenen Möglichkeiten der Auswertung.

Busse et al. (2001) berichten, daß eine Bakterien-Lösung, extrahiert aus einem Herbizid-behandelten Boden, in die Platten gegeben wurde und die Entwicklung über 10 Tage verfolgt wurde. Die Auswertung erfolgte nach Integralbildung der Wachstumskurve und der Methode von Garland & Mills (1991). Ein vergleichbarer Versuch mit vergleichbarer Auswertung wurde auch von Engelen et al. (1998) durchgeführt.

Diese Herangehensweise erwies sich für die vorliegenden Versuche als ungeeignet, da oft schon nach 24 Std. alle wells kräftig verfärbt und Unterschiede nicht mehr meßbar waren.

Eine sehr ausführliche Auswertung wird von Guckert et al. (1996) vorgeschlagen. Hier steht vor allem der Verlauf der zeitlichen Entwicklung im Mittelpunkt. Doch auch bei dieser Methode werden Unterschiede zwischen den einzelnen Substraten nicht in Betracht gezogen.

Weitere Vorschläge für eine Auswertung der BIOLOG®-Platten finden sich bei Glimm et al. 1997, Hackett et al. 1997, Harch et al. 1997, Hitzl et al. 1997, Howard 1999 und 1997. Im vorliegenden Fall bietet sich die eigene Auswertung an.

Durch die Behandlung der Kulturpflanzen mit Herbiziden in der landwirtschaftlichen Produktion entstehen die GSH-Konjugate und ihre Metaboliten als Entgiftungsprodukte, die dann an den Boden abgegeben werden. Dort werden die Bodenbakterien im Wachstum gehemmt oder gefördert. Die Effekte sind abhängig von Bakterium, Konjugat und dessen Konzentration.

Die Förderung kann nicht nur den „positiven“ Bakterien widerfahren, es können auch Pathogene begünstigt werden. Um nur durch die notwendige Maßnahme der Herbizid-Ausbringung mit ihrer anschließenden Abgabe von Metaboliten an den Boden keine Schädigung durch massenhafte Vermehrung pathogener Bakterien zu erzeugen, ist es von Vorteil zu wissen, mittels welcher Substanzen dies unterbunden werden kann. Der inverse Fall gilt für Bakterien, die das Wachstum von Pflanzen positiv beeinflussen, sog. PGPR.

Mit diesen detaillierten BIOLOG-Ergebnissen ist es möglich, eine Kombination aus Xenobiotika-Metaboliten und C-Quelle zu finden, die es ermöglicht, pathogene Bakterien gezielt zu

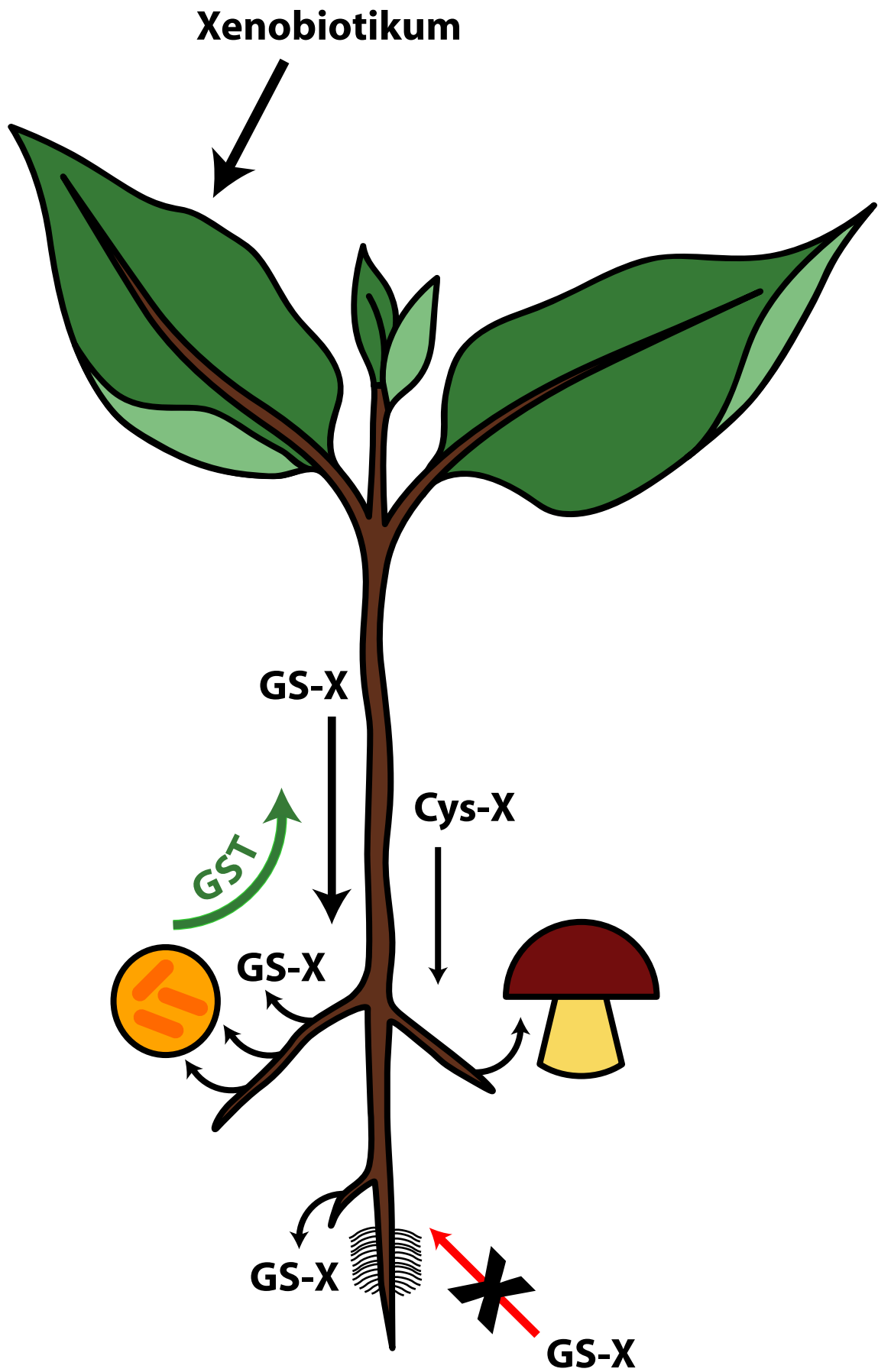


hemmen und PGPR zu fördern. Daraus ergibt sich eine Behandlung, die für die Kulturpflanzen sehr vorteilhaft ist.

Für eine gezielte Bekämpfung pathogener Bodenbakterien mit gleichzeitiger Förderung der PGPR sind weitere Versuche mit entsprechenden Bakterien notwendig. Es müßten pathogene Bakterien unter gleichen Bedingungen in die BIOLOG® Micro Plates gefüllt werden und anschließend die Substrate ausgewählt werden, die das Wachstum hemmen. Die Substrate, bei denen die PGPR gefördert und gleichzeitig die Pathogene gehemmt werden, sind geeignet, eine gesunde Rhizoflora zu schaffen, bei der gesundes Pflanzenwachstum gewährleistet ist.

Somit ergibt sich aus der vorliegenden Arbeit ein recht komplexes Bild des Verhaltens entgifteter Fremdstoff-Metaboliten durch die Pflanze und die Rhizosphäre. Diese Metaboliten besitzen, wie mehrfach gezeigt worden ist, hinreichend Signalcharakter für die Pflanze selbst, aber auch für andere Organismen, die die Rhizosphäre besiedeln. Durch die Exudation dieser Signalmoleküle in die Wurzelzone verändern Mykorrhizapilze ihren Stoffwechsel und Bakterien ihr Wachstum. Gerade letzteres Phänomen kann zu bisher nicht vorhersehbaren Veränderungen in der Rhizosphäre führen.

Entscheidend ist es nun, Erkenntnisse darüber zu erlangen, wie die pflanzliche Gesundheit beeinflußt wird. Dabei sollte durchaus in Betracht gezogen werden, daß die Metaboliten von Agrochemikalien, die wir derzeit anwenden, um unsere Nutzpflanzen zu schützen, in der Rhizosphäre Effekte hervorrufen können, die uns zumindest unterwartet erscheinen.



## 6 Zusammenfassung

Die durch Pflanzenschutz-Maßnahmen bei der landwirtschaftlichen Produktion ausgebrachten Herbizide werden im pflanzlichen Organismus zum großen Teil über GSTs entgiftet. Seit geraumer Zeit befaßt man sich nun nicht mehr ausschließlich mit den in der unbelebten Natur verbleibenden Rückständen, es sind auch mögliche Wirkungen der innerhalb der Pflanzen entstehenden Metaboliten von Interesse.

Die Synthese der Metaboliten für die Versuche war erstaunlich problematisch. Viele Protokolle aus der Literatur mußten modifiziert oder sogar gänzlich verworfen werden.

Das GSH-Konjugat wird am sichersten in einem physiologischen Puffer (Tris/HCl oder KPP) mit pH 7,5 oder 7,8 und anschließender Aufreinigung mit SPE-Säulen hergestellt.

Für die Konjugation von  $\gamma$ GC und CDNB wird hingegen  $H_2O$  oder Borat-Puffer (pH 8,2) empfohlen.

Keine endgültige Klarheit konnte für die Synthese des Cys-Konjugates geschaffen werden. Das Cys-Molekül hat neben der Thiolgruppe auch noch eine reaktive Aminogruppe, und so entsteht neben dem gewünschten S-Cys-Konjugat auch noch das N-Cys-Konjugat. Dieses ist physiologisch jedoch nicht von Belang, da es als endständiger Metabolit nicht weiter verstoffwechselt wird. Weiterhin konnten diverse, unerwünschte Aromaten im Synthese-Ansatz gefunden werden.

Untersuchungen mit den *in vitro* synthetisierten Metaboliten GS-X und Cys-X an Wurzeln von Gersten-Keimlingen haben gezeigt, daß diese beiden Konjugate von der Pflanze wieder an den Boden abgegeben werden können. Das GSH-Konjugat wird deutlich besser transportiert als das Cys-X, was offenbar darauf zurückzuführen ist, daß das pflanzliche Gewebe auf den Transport von GSH spezialisiert ist. Weiterhin werden die Konjugate besser ans umgebende Medium abgegeben, wenn die Wurzel vollständig ist, also die Spitze nicht abgeschnitten wurde.

Darüber hinaus zeigte sich, daß der GS-X-Transport durch die Wurzel mit KCl-Lösung gehemmt werden kann. Da KCl die Plasmodesmata im Gewebe schließt, kann wohl tatsächlich von einem symplastischen Transport des Konjugates und nicht von Diffusion ausgegangen werden.

Wesentlicher weiterer Befund der vorliegenden Arbeit war, daß die Konjugate nicht wieder von der Wurzel aufgenommen und Richtung Sproß transportiert werden können. Der unidi-

reaktionale Transport belegt, daß die behandelten Pflanzen eine Fähigkeit zur echten Ausscheidung von xenobiotischen Metaboliten besitzen und nutzen.

Eine Versuchsreihe mit transformierten Meerrettich-Wurzeln hat ergeben, daß GSH-Konjugate und ihre Abbauprodukte  $\gamma$ GC-X und Cys-X die GST-Aktivitäten induzieren. Die Induktion ist stärker, wenn die Wurzeln mit dem Bodenbakterium *Serratia liquefaciens* besiedelt sind, wobei ein Großteil der Induktion allein auf die Besiedlung selbst zurückzuführen ist. Wurzeln, die mit Mikroorganismen besiedelt sind, weisen also einen höheren Schutz gegen Streß durch erhöhte GST-Aktivitäten auf.

Wie sich herausstellte, ist die Induktion um so größer, je weiter das Konjugat metabolisiert ist. Das GSH-Konjugat bewirkt eine erheblich geringere Aktivitätssteigerung als sein Metabolit, Cys-X.

Ein ähnlicher Effekt wurde auch in Tomaten-Blättern gemessen, die 24 Std. in Konjugat-Lösung inkubiert wurden. Blätter, die in der GS-X-Lösung standen, hatten höhere GST-Aktivitäten als die Blätter in der Cys-X-Lösung. Die höchsten Aktivitäten konnten jedoch in den Blättern gemessen werden, die der CDNB-Lösung ausgesetzt waren.

In der Versuchsreihe wurden unterschiedliche Konzentrationen getestet, es zeigte sich jedoch kein Trend. D. h., die höher konzentrierten Lösungen induzieren nicht automatisch die höchsten Enzym-Aktivitäten. Teilweise wurden die Aktivitäten auch unterdrückt.

Die GST-Aktivitäten werden auch von Mykorrhizapilzen beeinflusst. Die Beeinflussung ist allerdings stark abhängig von der Pflanzenart und dem mykorrhizierenden Pilz. *Acaulospora longula* induziert die GSTs in dikotylen Pflanzen, unterdrückt sie jedoch in monokotylen Arten.

Umgekehrt ist es mit *Glomus*. Pilze dieser Gattung steigern die GST-Aktivitäten in Dikotylen, wohingegen in Monokotylen die Enzym-Aktivitäten gehemmt werden.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß die GST-Aktivität durch die Mykorrhizapilze vollständig unterdrückt wird. So war in mykorrhizierten Blauschwengel-Wurzeln gegenüber der Kontrolle kaum mehr GST-Aktivität meßbar.

Die Pilze ihrerseits reagieren auch mit Veränderungen der GST-Aktivitäten auf die GSH-Konjugate. Es zeigte sich, daß – ebenso wie in den Pflanzen – die Aktivitäten mit dem Metabolisierungsgrad der Konjugate steigen.

Konjugate beeinflussen auch die Bodenbakterien *Serratia liquefaciens*, *Burkholderia cepacia* und *B. sacchari* in hohem Maße. Im BIOLOG®-Versuch, einem Substrat-Nutzungstest, konnte das Wachstum der Bakterien in Kombination mit einer C-Quelle z. T. extrem verändert werden.

Das Wachstum des PGPRs *Serratia liquefaciens* kann langfristig mit einer Thiol-Lösung (GSH,  $\gamma$ GC oder Cys) stimuliert werden. Unter Konjugat-Einfluß wächst das Bakterium besonders gut, wenn Sebacinsäure zugegen ist.

*Burkholderia cepacia* kann mit einem Thiol oder auch CDNB als Modell-Xenobiotikum gefördert werden. Dann sollte allerdings  $\beta$ -Methyl-Glucosid zugegeben werden.

Mit einer Mischung aus GSH und CDNB kann das Wachstum von *Burkholderia sacchari* stark gefördert werden.

Alle 3 Bakterien werden von dem Modell-Xenobiotikum DCNB unterdrückt.

Mit dieser Versuchsreihe soll gezeigt werden, daß durch Behandlung der Pflanzen mit Xenobiotika und anschließender Abgabe der Metabolite an die Rhizosphäre Bakterien gezielt gefördert oder auch gehemmt werden können. Je nach Kombination mit einer C-Quelle kann das Wachstum „positiver“ Bakterien (z. B. PGPRs) gefördert werden, während das Wachstum pathogener Bakterien gezielt unterdrückt werden kann.

Werden Kulturpflanzen mit einer entsprechenden Mischung aus Xenobiotikum und C-Quelle behandelt, wird die Rhizosphären-Flora gezielt beeinflußt, so daß ein gesundes Pflanzenwachstum ohne weitere Zugabe von umweltbelastenden Fremdstoffen gewährleistet ist.

## 7 Literaturverzeichnis

Ajaúro A S F, Monteiro R T R, Abarkeli R B (2003) Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chem* 52 799-804.

Anderson M P, Gronwald J W (1989) Enhanced Glutathione-S-transferase activity in atrazine resistant velvetleaf. *Plant Physiol* 89 687-692

Bakke J E, Larsen G L, Davison K L (1994) Effect of AT-125 on the metabolism of propachlor and the glutathione conjugates of propachlor and bromobenzene in rat. *Xenobiotica* 24 (9) 909-919

Bethlenfalvai G J, Mihara K L, Schreiner R P, McDaniel H (1996a) Mycorrhizae biocides and biocontrol 1 Herbicide-mycorrhiza interactions in soybean and cocklebur treated with bentazon. *Appl Soil Ecol* 3 (3) 197-204

Bethlenfalvai G J, Schreiner R P, Mihara K L, McDaniel H (1996b) Mycorrhizae biocides and biocontrol 2 Mycorrhizal fungi enhance weed control and crop growth in a soybean-cocklebur association treated with the herbicide bentazon. *Appl Soil Ecol* 3 (3) 205-214

Bieber C (2000) Metabolismus von Benzo(a)pyren durch den Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* im Hinblick auf biotechnologische Anwendungen. Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität München

Blake-Kalff M M A, Randall R A, Colemann J O D (1997) Compartmentation of detoxified xenobiotics in plant cells. In: Kluwer Academic Publishers

Boehringer GmbH Mannheim (1973) Die Theorie des enzymatischen Tests. Biochemica Mannheim

Bourbouloux A, Shahi P, Chakladar A, Delrot S, Bachhawat A K (2000) Hgt1p a high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275 (18) 13259-13265

Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 248-254

Brämer C O, Vandamme P, Silva L F da, Gomez J G C, Steinbüchl A (2001) *Burkholderia sacchari* sp nov a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *Int J of Systematic and Evolutionary Microbiol* 51 1709-1713

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2004) Rechtliche Regelungen der Europäischen Union zu Pflanzenschutzmitteln und deren Wirkstoffen.

Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (2003) Statistisches Jahrbuch Landwirtschaft

Busse M D, Ratcliff A W, Shestak C J, Powers R F (2001) Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biol Biochem* 33 (12-13) 1777-1789

- Chiarini L, Bevivino A, Tabacchioni S, Dalmastrì C (1998) Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescence* and *Enterobacter* sp on *Sorghum bicolor*: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. *Soil Biol Biochem* 30 (1) 81-87
- Coleman J O D, Blake-Kalff M M A, Davies T G E (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science* 2 (4) 144-151
- Coleman J O D, Frova C, Schröder P, Tissut M (2001) Exploiting plant metabolism for the phytoremediation of persistent herbicides. *ESPR - Environ Sci & Pollut Res* 9 (1) 18-28
- Coupland D (1991) The role of compartmentation of herbicides and their metabolites in resistance mechanisms. Butterworth/ Heinemann Ltd Oxford
- Cummings B (2004) <http://www..mun.ca/biology/rlee/b3402/images/36-06-RootLateralTransport.gif>. Pearson Education Inc. publishing as Benjamin Cummings
- Dean J V, Devarenne T P, Lee Ik-Soo, Orlofsky L E (1995) Properties of a maize glutathione S-transferase that conjugates coumaric acid and other phenylpropanoids. *Plant Physiol* 108 985-994
- Declerck S, Strullu D G, Plenchette C (1998) Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia* 90 (4) 579-585
- Dekant W (2003) Biosynthesis of toxic glutathione conjugates from halogenated alkenes. *Toxicology Letters* 144 (1) 49-54
- Dempsey DA, Klessig DF (1995) Signals in plant disease resistance. *Bull Inst Pasteur* 167-186
- DeRidder B P, Dixon D P, Beussman D J, Edwards R, Goldsbrough P B (2002) Induction of glutathione S-transferases in *Arabidopsis* by herbicide safeners. *Plant Physiol* 130 1497-1505
- Diekmann F, Nepovim A, Schröder P (2004) Influence of *Serratia liquefaciens* and a xenobiotic glutathione conjugate on the detoxification enzymes in a hairy root culture of horse radish (*Armoracia rusticana*). *J Appl Bot* 78 64-67
- Domsch, K H (1992) Pestizide im Boden. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge
- Droog F N J, Hooykaas P J J, Libbenga K R, van der Zaal EJ (1993) Proteins encoded by an auxin-regulated gene family of tobacco share limited but significant homology with glutathione S-transferase as one member indeed shows in vitro GST activity. *Plant Mol Biol* 21 965-972
- Edwards R, Cole D (1996) Glutathione Transferase in wheat (*Triticum*) species with activity towards Fenoxaprop-ethyl and other herbicides. *Pestic Biochem Physiol* 54 96-104

Edwards R, Dixon D P, Walpot V (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci* 5 (5) 193-198

Elbing K, Brent R (2002) *Growth in Liquid Media*. John Wiley & Sons Inc

Engelen B, Meinken K von, Wintzingerode F, Heuer H, Malkomes H P, Backhaus H (1998) Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Appl Environ Microbiol* 64 (8): 2814-2821

Flocco C G, Giulietti M (2003) Effect of chitosan on peroxidase activity and isoenzyme profile in hairy root cultures of *Azadirachta indica*. *Appl Biochem Biotechnol* 110 (3) 175-183

Flores H E, Vivanco J M, Loyola-Vargas V M (1999) "Radicle" biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends in plant science* 4 220-226

Gadkar V, David-Schwartz R, Kunik T, Kapulnik Y (2001) Arbuscular mycorrhizal fungal colonization factors involved in host recognition. *Plant Physiol* 127 1493-1499

Gadkar V, David-Schwartz R, Nagahashi G, Douds D D Jr, Wininger S, Kapulnik Y (2003) Root exudate of pmi tomato mutant M161 reduces AM fungal proliferation in vitro. *FEMS Microbiol Lett* 223 (2) 193-198

Gaillard C, Dufaud A, Tommasini R, Kreuz K, Amrhein N, Martinoia E (1994) A herbicide antidote (safener) induces the activity of both the herbicide detoxifying enzyme and of a vacuolar transporter for the detoxified herbicide. *FEBS Lett* 352 (2) 219-221

Garcia-Garrido J M, Ocampo J A (2002) Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J Exp Bot* 53 (373) 1377-1386

Garland J L, Mills A L (1991) Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl Environ Microbiol* 57 (8) 2351-2359

Garreton V, Carpinelli J, Jordana X, Holuigue L (2002) The as-1 promoter element is an oxidative stress-responsive element and salicylic acid activates it via oxidative species. *Plant Physiol* 130 1516-26

Gerthsen, Kneser, Vogel (Hrsg.) (1982) *Physik*. 14., neubearbeitete und erweiterte Auflage. Springer Verlag Heidelberg, Nex York

Glimm E, Heuer H, Engelen B, Smalla K, Backhaus H (1997) Statistical comparisons of community catabolic profiles. *J Microbiol Meth* 30 71-80

Guckert J B, Carr G J, Johnson T D, Hamm B G, Davidson D H, Kumagai Y (1996) Community analysis by BIOLOG: curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats. *J Microbiol Meth* 27 183-197



- Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B (1974) Glutathione S-transferase. J Biol Chem Vol 249 No 22 7130-7139
- Hackett C A, Griffiths B S (1997) Statistical analysis of the time-course of Biolog substrate utilization. J Microbiol Meth 30 63-69
- Hancock J T, Desikan R, Clarke A, Hurst R D, Neill S J (2002) Cell signaling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. Plant Physiol Biochem 40 (6-8) 611-617
- Hancock J T, Desikan R, Neill S J (2001) Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. Biochem Soc Trans 29 (Pt 2) 345-350
- Harch B D, Correll R L, Meech W, Kirkby C A, Pankhurst C E (1997) Using the Gini coefficient with BIOLOG substrate utilisation data to provide an alternative quantitative measure for comparing bacterial soil communities. J Microbiol Meth 30 91-101
- Hayes J, Pulford D (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 30 445-600
- Heldt H W (2003) Pflanzenbiochemie. Spektrum Verlag Heidelberg
- Herschbach C (1992) Untersuchungen zur Bedeutung von Glutathion (GSH) für die 'interorgan' Regulation der Sulfatversorgung an Tabakpflanzen (*Nicotina tabacum* L va 'Samsun'). Dissertation TUM München. Schriftenreihe Fraunhofer-Institut für Atmosphärische Umweltforschung Garmisch-Partenkirchen
- Herschbach C, van Der Zalm E, Schneider A, Jouanin L, De Kok L J, Rennenberg H (2000) Regulation of sulfur nutrition in wild-type and transgenic poplar over-expressing gamma-glutamylcysteine synthetase in the cytosol as affected by atmospheric H<sub>2</sub>S. Plant Physiol 124 461-473
- Hildebrandt U, Kaldorf M, H Bothe (1999) The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Physiol 154 709-717
- Hitzl W, Henrich M, Kessel M, Insam H (1997) Application of multivariate analysis of variance and related techniques in soil studies with substrate utilization tests. J Microbiol Meth 30 81-89
- Hock B (1995) Herbizide. Thieme Verlag Stuttgart New York
- Hock B, Elstner E F (1984) Schadwirkungen auf Pflanzen. BI Wissenschaftsverlag Mannheim Wien Zürich
- Hörtensteiner S, Vogt E, Hagenbuch B, Meier P J, Amrhein N, Martinoia E (1993) Direct energization of bile acid transport into plant vacuoles. J Biol Chem 268 (25) 18446-18449
- Howard P J A (1997) Analysis of data from Biolog plates: comments on the method of Garland and Mills. Soil Biol Biochem 29 (11/12) 1755-1757

- Howard P J A (1999) Analysis of inter-sample distances from BIOLOG plate data in euclidean and simplex spaces. *Soil Biol Biochem* 31 1323-1330
- Ikeda K, Toyota K, Kimura M (1997) Effects of soil compaction on the microbial populations of melon and maize rhizosphere. *Plant and Soil* 189 91-96
- Irzyk G P, Fuerst E P (1993) Purification and characterization of a glutathione S-transferase from Benoxacor-treated maize (*Zea mays*). *Plant Physiol* 102 803-810
- Ishikawa T (1987) Glutathione S-transferases and carcinogenesis. Taylor & Francis 51-53
- Jacob F, Jäger E J, Ohmann E (1994) Botanik. Gustav Fischer Verlag Jena
- Jaenicke L (1984) Einführung in die Praxis des Biochemikers. Universität Köln
- Jamai A, Tommasini R, Martinoia E, Delrot S (1996) Characterization of glutathione uptake in broad bean leaf protoplasts. *Plant Physiol* 111 (4) 1145-1152
- Klein M, Mamnun Y M, Eggmann T, Schuller C, Wolfger H, Martinoia E, Kuchler K (2002) The ATP-binding cassette (ABC) transporter Bpt1p mediates vacuolar sequestration of glutathione conjugates in yeast. *FEBS Lett* 520 (1-3) 63-7
- Klein M, Martinoia E, Weissenböck G (1998) Directly energized uptake of beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) in plant vacuoles is strongly stimulated by glutathione conjugates. *J Biol Chem* 273 (1) 262-70
- Kuhn R, Hofstetter-Kuhn S (1993) Capillary electrophoresis: Principles and Practice. Springer Heidelberg New York
- Kuzniak E, Sklodowska M (2004) The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves. *J exp Bot* 55 (397): 605-612.
- Lamoureux G L, Rusness D G (1980) *In Vitro* metabolism of Pentachloronitrobenzene to Pentachloromethylthiobenzene by onion: Characterization of glutathione S-transferase cysteine C-S lyase and S-adenosylmethionine methyl transferase activities. *Pestic Biochem Physiol* 14 50-61
- Lamoureux G L, Rusness D G (1986) Tridiphane (2-(3,5-dichlorophenyl)-2-(2,2,2-Trichloroethyl)oxirane) an atrazine synergist: enzymatic conversion to a potent glutathione S-transferase inhibitor. *Pestic Biochem and Physiol* 26 323-342
- Lamoureux G L, Rusness D G (1989) Propachlor metabolism in soybean plants excised soybean tissues and soil. *Pestic Biochem and Physiol* 34 187-204
- Lamoureux G L, Rusness D G (1993) Glutathione in the metabolism and detoxification of xenobiotics in plants. SB Academic Publishing by The Hague NL/ edited by L J De Kok 221-237

- Lamoureux, G L, Rusness D G, Schroeder P, Rennenberg, H (1990) Diphenylether herbicide metabolism in spruce cell suspension culture: Identification of two novel metabolites. Pestic. Biochem. Physiol.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell 583-593
- Li Z-S, Alfenito M, Rea P A, Walbot V, Dixon R A (1997) Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. Phytochem 45 (4) 689-693
- Libbert E (1993) Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. Gustav Fischer Verlag Jena
- Lorenz R L (1992) Grundbegriffe der Biometrie. Gustav Fischer Verlag Jena
- Marino W (2000) Bedeutung der Pflanze für die Bodenmikroflora - Untersuchungen an zwei tropischen Nutzpflanzen Zentralamazoniens. Dissertation Universität Hamburg
- Marrs K A, Alfenito M R, Lloyd A M, Walbot V (1995) A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. Nature 375 397-400
- Marrs, K A, Walbot, V (1997) Expression and RNA splicing of the maize glutathione S-transferase Bronze2 gene is regulated by Cadmium and other stresses. Plant Physiol 113 93-102
- Martinoia E, Grill E, Tommasini R, Kreuz K, Amrhein N (1993) ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump in the vacuolar membrane of plants. Nature 364 247-249
- Mauch F, Dudler R, (1993) Differential induction of distinct glutathione S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. Plant Physiol 102 1193-1201
- Messner B, Schröder P (1999) Burst amplifying system in cell suspension cultures of spruce (*Picea abies* L Karst ): modulation of elicitor-induced release of hydrogen peroxide (oxidative burst) by ionophores and salicylic acid. J Appl Bot - Angewandte Botanik 73 6-10
- Michels J, Gottschalk G (1994) Inhibition of the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* by hydroxylamino-dinitrotoluene an early intermediate in the degradation of 2 4 6-trinitrotoluene. Appl Environ Microbiol 60 (1) 187-94
- Mittova V, Theodoulou F L, Kiddle G, Gomez L, Volokita M, Tal M, Foyer C H, Guy M (2003) Coordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione-metabolizing enzymes is correlated with salt tolerance in tomato. FEBS Lett 554 (3) 417-421
- Morel J B, Dangl J L (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. Cell Death Differ 4 (8) 671-683
- Müller F (1986) Phytopharmakologie. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart
- Nardi S, Concheri G, Pizzeghello D, Sturaro A, Rella R, Parvoli G (2000) Soil organic matter mobilization by root exudates. Chemosphere 5 653-658

- Neumann G, Römheld V (1999) Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* 211 121-130
- Nienhaus F (1969) *Phytopathologisches Praktikum* Paul Parey Hamburg Berlin
- Normander B, Prosser J I (2000) Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. *Appl Environ Microbiol* 66 (10) 4372-4377
- O'Connell K M, Breaux E J, Fraley R T (1988) Different rates of metabolism of two chloroacetamide herbicides in pioneer 3320 corn. *Plant Physiol* 86 359-363
- Omar S A, Abdel-Sater M A (2001) Microbial populations and enzyme activities in soil treated with pesticides. *Water Air Soil Pollut* 127 (1-4) 49-63
- Pan B, Bai Y M, Leibovitch S, Smith D L (1999) Plant-growth-promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. *European Journal of Agronomy* 11 (3-4) 179-186
- Pan B, Vessey J K, Smith D L (2002) Response of field-grown soybean to co-inoculation with the plant growth promoting rhizobacteria *Serratia proteamaculans* or *Serratia liquefaciens* and *Bradyrhizobium japonicum* pre-incubated with Genistein. *European Journal of Agronomy* 17 (2) 143-153
- Parales R E, Ditty J L, Harwood C S (2000) Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene toluene and trichloroethylene. *Appl Environ Microbiol* 66 (9) 4098-104
- Peix A, Mateos P F, Rodriguez-Barrueco C, Martinez-Molina E, Velazquez E (2001) Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. *Soil Biol Biochem* 33 (14) 1927-1935
- Pitman M G (1971) Uptake and transport of ions in barley seedlings I Estimation of chloride fluxes in cells of excised roots. *Austral J of Biol Sci* 24 407-421
- Ploemen J H T M (1994) Inhibition of GSTs - Studies with quinones and ethacrynic acid. Dissertation Universität Utrecht
- Ravnskov S (2002) Phosphorus uptake of an arbuscular mycorrhizal fungus is not effected by the biocontrol bacterium *Burkholderia cepacia*. *Soil Biol Biochem* 34 1875-81
- Riechers D, Fuerst P, Miller K (1996) Initial metabolism of dimethenamid in safened and un-safened wheat shoots. *J Agric Food Chem* 1996 44 1558-1564
- Rusness D G, Huwe J K, Lamoureux G L (1998) Quinclorac ester toxicity and metabolism in leafy spurge (*Euphorbia esula*) soil systems: Effects of foliar vs soil applications'. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 61 (2): 115-133.

Ryals J, Lawton K A, Delaney T P, Friedrich L, Kessmann H, Neuenschwander U, Uknes S, Vernooij B, Weymann K (1995) Signal transduction in systemic acquired resistance. PNAS 92 4202-4205

Salihu S, Hatzios K K, Derr J F (1998) Comparative uptake translocation and metabolism of root-applied isoxaben in ajuga (*Ajuga reptans*) and two ornamental *Euonymus* species. Pesticide Biochemistry and Physiology 60 (2) 119-131

Salzer P, Corbière H, Boller Th (1999) Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. Planta 208 319-325

Sandermann H (1994) Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. Pharmacokinetics 4 225-241

Sandermann H (1997) The role of glucosyl and malonyl conjugation in herbicide selectivity. Kluwer Academic Publishers

Sandermann H. (2004) Bound and unextractable pesticidal plant residues: chemical characterization and consumer exposure. Pest Manag Sci 60 613-623

Sandermann H, Scheel D, v d Trenck K T (1983) Metabolism of environmental chemicals by plants-copolymerization into lignin. Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium 37 407-420

Sasabe M, Takeuchi K, Kamoun S, Ichinose Y, Govers F, Toyoda K, Shiraishi T, Yamada T (2000) Independent pathways leading to apoptotic cell death oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. Eur J Biochem 267 (16): 5005-13

Scheer C E (2003) Transport Kompartimentierung und Abbau von glutathionhaltigen Fremdstoffmetaboliten in Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation TU München Weihenstephan

Scheunert I, Schroeder P (1998) Formation, characterization and release of non-extractable residues of <sup>14</sup>C-labeled organic xenobiotics in soils. ESPR - Environ Sci & Pollut Rs 5 (4) 238-244

Schmidt B, Ebing W, Schuphan I (1988) Einsatz eines Pflanzenkultur-Tests zur Ermittlung der Metabolisierbarkeit von Pflanzenschutzmitteln. Gesunde Pflanzen 40 (6) 245-249

Schneider A (1992) Untersuchungen zum Glutathion-Transport und -Stoffwechsel in Suspensionskulturen von *Nicotina tabacum* L. va 'Samsun'. Dissertation TU München Schriftenreihe Fraunhofer-Institut für Atmosphärische Umweltforschung Garmisch-Partenkirchen

Schneider M, Quistad G B, Casida J E (1999) Glutathione activation of chloropicrin in the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 439 (2) 233-238

Scholz S (2000) Fremdstoffmetabolismus. Insitut für Zoologie Dresden

- Schopfer P, Brennicke A (1999) Pflanzenphysiologie. Springer Verlag Heidelberg New York
- Schröder P (1986) Thermoosmotischer Sauerstofftransport in *Nuphar nutea* L und *Alnus glutinosa* Gaertn und seine Bedeutung für ein Leben in anaerober Umgebung. Dissertation Universität Köln
- Schröder P (2001) The role of glutathione and glutathione s-transferases in plant reaction and adaptation to xenobiotics. Kluwer Academic Publishers Netherlands
- Schröder P, Berkau C, Nathaus F J, Weiß A, Wolf A (1993) Untersuchungen zur Aufnahme anthropogen emittierter Chlorkohlenwasserstoffe und deren Entgiftung durch Fichten vom Schwerpunktstandort Kalkalpen. Fraunhofer-Institut für Atmosphärische Umweltforschung Garmisch-Partenkirchen
- Schröder P, Lamoureux G L, Rusness D G, Rennenberg H (1990) Glutathione S-transferase activity in spruce needles. Pestic Biochem Physiol 37 221-218
- Schröder P, Pflugmacher S, Götzberger C (1994) On the presence and the isoenzyme pattern of glutathione S-transferase in leaves of aspen (*Populus tremula* L ) and beech (*Fagus sylvatica* L ) - results of a pilot study. Plant Physiol 13 205-211
- Schröder P, Stampfl A (1999) Visualization of glutathione conjugates and inducibility of glutathione s-transferase in onion (*Allium cepa* L ) epidermal tissue. Z Naturforschung 54c 1033-41
- Schröder P, Wolf A E (1996) Characterization of glutathione S-transferases in needles of Norway Spruce trees from a forest decline stand. Tree Physiology 16 503-508
- Sheng J, Citovsky V (1996) Agrobacterium-plant cell DNA transport: have virulence proteins will travel. Plant Cell 8 (10) 1699-710
- Shima J, Takase S, Takahashi Y, Iwai Y, Fujimoto H, Yamazaki M, Ochi K (1997) Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture. Appl Environ Microbiol 63 (10) 3825-30
- Shimabukuro R H (1976) Glutathione conjugation of herbicides in plants and animals and its role in herbicidal selectivity. The Asian-Pacific Weed Science Society 183-186
- Siau J F (1984) Transport processes in wood. Springer Berlin, New York.
- Skipsey M, Andrews C J, Townson J K, Jepson I, Edwards R (1997) Substrate and thiol specificity of a stress-inducible glutathione transferase from soybean. FEBS Lett 409 (3) 370-4
- Smith S, E:Read D J (1997) Mycorrhizal symbiosis. Academic Press London, San Diego
- Strullu D G, Romand C (1986) Méthode d'obtention d'endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. C R Acad Sc Paris t 303 Série III 6 245-250

- Stýblo M, Thomas D J (1995) In vitro inhibition of glutathione reductase by arsenotriglutathione. *Biochem Pharma* 49 (7) 971-977
- Taiz L, Zeiger E (2000) *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin
- Tamasloukht M, Sejalon-Delmas N, Kluever A, Jauneau A, Roux C, Becard G, Franken P (2003) Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiol* 131 1468-78
- Tenhaken R, Levine A, Brisson L F, Dixon R A, Lamb C (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (10) 4158-63
- Theodoulou F L, Clark I M, He X L, Pallett K E, Cole D J, Hallahan D L (2003) Co-induction of glutathione-S-transferases and multidrug resistance associated protein by xenobiotics in wheat. *Pest Manag Sci* 59 (2) 202-14
- van Bel, A J (2003) The phloem: a miracle of ingenuity. *Plant Cell Env* 26 125-149
- van Bladeren P J (2000) Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chemico-Biological Interactions* 129 (1-2) 61-76
- Varma A, Hock B (Hrsg.) (1999) *Mycorrhiza – Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Springer Heidelberg
- Vazquez M M, Cesar S, Azcon R, Barea J M (2000) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Appl Soil Ecol* 15 261-272
- Vierheilig H, Alt-Hug M, Engel-Streitwolf R, Mäder P, Wiemken A (1998) Studies on the attractational effect of root exudates on hyphal growth of an arbuscular mycorrhizal fungus in a soil compartment-membrane system. *Plant and Soil* 203 137-144
- Walker T S, Bais H P, Grotewold E, Vivanco J M (2003) Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol* 132 44-51
- Wheeler G L, Quinn K A, Perrone G, Dawes I W, Grant C M (2002) Glutathione regulates the expression of gamma-glutamylcysteine synthetase via the Met4 transcription factor. *Mol Microbiol* 46 (2): 545-56.
- Wojtaszek P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* 322 (3) 681-92
- Wolf A (1996) *Untersuchungen zur Bildung zum Transport und zum Metabolismus von Glutathion S-Konjugaten in *Hordeum vulgare* L.* Universität Regensburg
- Wolf A, Dietz K-J, Schröder P (1996) Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS Letters* 384 31-34

Zablotowicz R M, Hoagland R E, Locke M A, Hickey W J (1995) Glutathione-S-Transferase Activity and Metabolism of Glutathione Conjugates by Rhizosphere Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1054-1060

Zenk H M (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* 179 21 - 30

Zhang F, Dashti N, Hynes R K, Smith D L (1997) Plant growth-promoting rhizobacteria and soybean *Glycine max* (L) Merr growth and physiology at suboptimal root zone temperatures. *Annals of Botany* 79 (3) 243-249

Zhang M-Y, Bourbonloux A, Cagnac O, Srikanth C V, Rentsch D, Bachhawat A K, Delrot S (2004) A novel family of transporters mediating the transport of glutathione derivatives in plants. *Plant Phys* 134 482-491



## V Anhang

### 1 Absatz von PSM in Deutschland

PSM-Wirkstoffmengen, die im Geltungsbereich des Pflanzenschutzgesetzes abgegeben wurden (in t)

Wirkstoffbereich	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
Herbizide <sup>1)</sup>	16 970	18 999	15 707	12 696	14 834	16 065	16 541	16 485	17 269	15 825	16 610	14 942	14 328
Fungizide	10 984	9 760	9 368	7 660	7 698	9 652	10 404	9 397	10 530	9 702	9 642	8 246	10 129
Insektizide <sup>2)</sup>	1 525	3 901	4 094	4 327	4 006	4 925	3 797	4 696	6 276	6 125	6 111	6 518	5 889
Wachstumsregler <sup>3)</sup>	1 916	2 411	2 931	2 293	1 672	2 435	2 642	3 040	3 741	2 764	2 132	2 943	3 147
Sonstige	1 751	1 873	1 470	1 954	1 559	1 454	1 701	1 029	1 068	987	1 100	1 014	1 185
Gesamt	33 146	36 944	33 570	28 930	29 769	34 531	35 085	34 648	38 884	35 403	35 595	33 663	34 678

<sup>1)</sup> einschließlich Safener

<sup>2)</sup> einschließlich Akarizide und Synergisten

<sup>3)</sup> einschließlich Keimhemmungsmitteln

Quelle: Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft: statistisches Jahrbuch Landwirtschaft 2003

## 2 Korrelation der verschiedenen Umsatzraten in Pilzen

**Tab. 10: Korrelationen zwischen den unterschiedlichen Substraten in *Chaetomium (globosum)* nach Inkubation mit GS-X, Cys-X bzw. CDNB.**

Chaetomium (globosum)		$f(x)=m+ax+bx^2$		$f(x)=mx+b$	
		schwarz	weiß	schwarz	weiß
GS-X	CDNB : NBC	<b>0,945</b>	<b>0,995</b>	<b>0,945</b>	<b>0,921</b>
	CDNB : NBOC	0,631	<b>0,915</b>	0,250	0,353
	NBOC : NBC	0,561	<b>0,995</b>	0,258	0,600
	CDNB : F	0,688	0,148	0,276	0,065
	CDNB : GR	0,786	0,540	0,065	0,104
Cys-X	CDNB : NBC	0,730	0,203	0,457	0,138
	CDNB : NBOC	<b>0,947</b>	0,306	<b>0,983</b>	0,298
	NBOC : NBC	0,730	0,773	0,318	0,743
	CDNB : F	0,309	0,323	0,035	0,256
	CDNB : GR	0,267	0,470	0,004	0,300
CDNB	CDNB : NBC	0,391	0,984	0,049	0,648
	CDNB : NBOC	0,269	0,375	0,079	0,031
	NBOC : NBC	<b>0,949</b>	0,559	<b>0,895</b>	0,227
	CDNB : F	<b>0,935</b>	<b>0,898</b>	0,492	0,797
	CDNB : GR	0,365	0,307	0,042	0,231

**Tab. 11: Korrelationen zwischen den unterschiedlichen Substraten in *Trichoderma* spp. nach Inkubation mit GS-X, Cys-X bzw. CDNB.**

Trichoderma spp.		$f(x)=m+ax+bx^2$		$f(x)=mx+b$	
		schwarz	weiß	schwarz	weiß
GS-X	CDNB : NBC	0,126	0,367	0,030	0,358
	CDNB : NBOC	0,612	0,761	0,371	0,564
	NBOC : NBC	<b>0,977</b>	0,825	0,723	0,760
Cys-X	CDNB : NBC	0,349	<b>0,919</b>	0,014	0,874
	CDNB : NBOC	0,408	0,596	0,288	0,572
	NBOC : NBC	0,696	0,488	0,589	0,595
CDNB	CDNB : NBC	<b>0,998</b>	0,837	0,247	0,278
	CDNB : NBOC	0,571	<b>0,984</b>	0,272	<b>0,941</b>
	NBOC : NBC	0,583	0,500	<b>0,990</b>	0,823

### 3 Wachstumsfördernde Substrate des BIOLOG®-Versuchs

#### Parent Mix

Bakterium	GS-X c1 13	c2 13	124	YGC-X c1 13	c2 13	124	Cys-X c1 13	c2 13	124	GS-DNB c1 13	c2 13	124	124
<i>Serratia liquefaciens</i>	2,3-Butanediol Sebacic Acid	Sebacic Acid Lactulose	2,3-Butanediol Sebacic Acid	2,3-Butanediol Sebacic Acid	Lactulose Sebacic Acid	Lactulose Sebacic Acid	Lactulose	Lactulose Sebacic Acid	Lactulose Sebacic Acid				
<i>Burkholderia cepacia</i>	Lactulose Itaconic Acid Glucose-1-Phosphate	Phenylethylamine D-Mannitol D-Cellobiose D-Melibiose D-Cellobiose a-Cyclodextrin Itaconic Acid	Phenylethylamine D-Mannitol D-Cellobiose D-Melibiose D-Cellobiose a-Cyclodextrin Itaconic Acid	Thymidine Phenylethylamine Glucose-1-Phosphate	Thymidine Phenylethylamine Glucose-1-Phosphate	Thymidine Phenylethylamine Glucose-1-Phosphate	Thymidine	Thymidine Lactulose Glucose-1-Phosphate Thymidine Thymidine	Thymidine Lactulose Glucose-1-Phosphate Thymidine Thymidine	Water D-Melibiose p-Hydroxyphenylacetic Acid L-Ornithine	Water D-Mannose D-Melibiose p-Hydroxyphenylacetic Acid Malonic Acid L-Ornithine Phenylethylamine		
<i>Burkholderia saccharii</i>	L-Alaninamide D-Cellobiose N-Acetyl-D-galactosamine	Water a-Cyclodextrin Gentibiose Uridine	Water a-Cyclodextrin Gentibiose Uridine	L-Alaninamide Dextrin a-Methyl-D-Cyclodextrin N-Acetyl-D-glucosamin D-Cellobiose	Water 2-Aminoethanol a-Cyclodextrin Gentibiose D,L-Carnitine a-Hydroxybutyric Acid	Water 2-Aminoethanol a-Cyclodextrin Gentibiose D,L-Carnitine a-Hydroxybutyric Acid	Bromo Succinic Acid Uridine Thymidine L-Phenylalanine L-Alanine L-Pyroglytamic Acid	Succinamic Acid Water L-Alaninamide a-Keto Valeric Acid 2-Aminoethanol L-Methyl-D-Glucoside	Succinamic Acid Water L-Alaninamide a-Keto Valeric Acid 2-Aminoethanol L-Methyl-D-Glucoside	D-Glucuronic Acid Tween 40 Tween 80 L-Rhamnose D-Mannitol			

Thiole

Bakterium	GSH	YGC	Oys
<i>Serratia liquefaciens</i>	c1	c1	c1
	t3	t3	t3
	c2	c2	c2
	t24	t24	t24
<i>Burkholderia cepacia</i>	c1	c1	c1
	t3	t3	t3
	c2	c2	c2
	t24	t24	t24
<i>Burkholderia sacchari</i>	c1	c1	c1
	t3	t3	t3
	c2	c2	c2
	t24	t24	t24

D-Galacturonic Acid	a-Keto Glutaric Acid	a-Keto Glutaric Acid	a-Keto Glutaric Acid
L-Alanin-amide	L-Alanin-amide	L-Alanin-amide	L-Alanin-amide
a-Keto Valeric Acid	a-Keto Valeric Acid	a-Keto Valeric Acid	a-Keto Valeric Acid
D-Galacturonic Acid	D-Galacturonic Acid	D-Galacturonic Acid	D-Galacturonic Acid
L-Phenylalanine	a-Hydroxy Butyric Acid	a-Hydroxy Butyric Acid	Urocanic Acid
	Urocanic Acid	Urocanic Acid	Urocanic Acid
Dextrin	Glucose-1-Phosphate	Glucose-1-Phosphate	Water
L-Arabinose	Glycyl-L-Aspartic Acid	Glycyl-L-Aspartic Acid	Malonic Acid
a-Hydroxy Butyric Acid	Glycyl-L-Glutamic Acid	Glycyl-L-Glutamic Acid	L-Pyroglutamic Acid
Glucose-1-Phosphate	a-Cyclodextrin	a-Cyclodextrin	D-Melibiose
	B-Methyl-D-Glucoside	B-Methyl-D-Glucoside	Lactulose
	L-Fruuctose	B-Methyl-D-Glucoside	Glycyl-L-Aspartic Acid
D-Melibiose	L-Glutamic Acid	Thymidine	Malonic Acid
Malonic Acid	Phenyl-ethylamine	Malonic Acid	Malonic Acid
	Thymidine	L-Glutamic Acid	a-Hydroxy Butyric Acid
		Water	Phenylalanine
			Thymidine

Modell-Xenobiotika

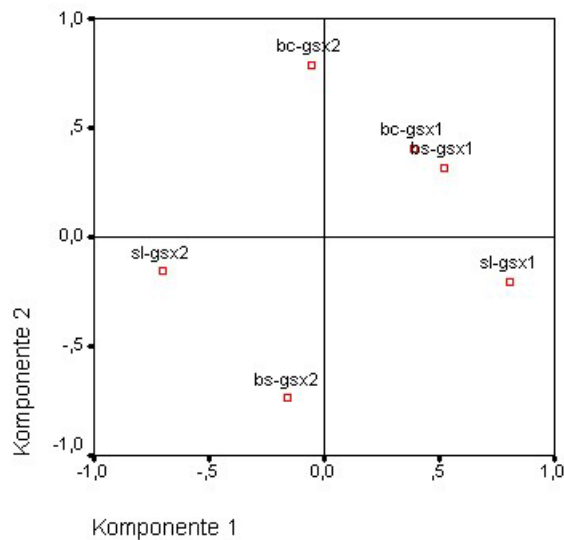
Bakterium	CDNB	CDNB	DCNB	DCNB
	c1	c2	c1	c2
	t3	t3	t3	t3
	t24	t24	t24	t24
<i>Serratia liquefaciens</i>	D-Galacturonic Acid	D-Galacturonic Acid	D-Mannitol	D-Fructose
	a-Keto Valeric Acid	a-Keto Valeric Acid	D-Galactose	Gentiobiose
	Glucuronamide	a-Keto Glutaric Acid	L-Alanine	L-Glutamic Acid
	L-Alanine-amide	Urocanic Acid	D-Glucuronic Acid	L-Theorine
	Water	$\gamma$ -Hydroxy Butyric Acid	a-D-Lactose	a-D-Glucose
<i>Burkholderia cepacia</i>	Sucrose	Water	a-D-Lactose	a-D-Lactose
	L-Phenylalanine	$\beta$ -Methyl-D-Glucoside	Acetic acid	a-D-Lactose
	Glycyl-L-Aspartic Acid	Glycyl-L-Aspartic Acid	D, L-Lactic Acid	Acetic acid
	Water	Water		Glycerol
<i>Burkholderia sacchari</i>	L-Glutamic Acid	L-Glutamic Acid	D-Mannose	D-Glucuronic Acid
	i-Erythritol	Water	D-Mannitol	
		i-Erythritol	Gentiobiose	
		D-Galacturonic acid Lactone	Putrescine	
		i-Erythritol		

#### 4 Hauptkomponenten-Analyse des BIOLOG-Versuches

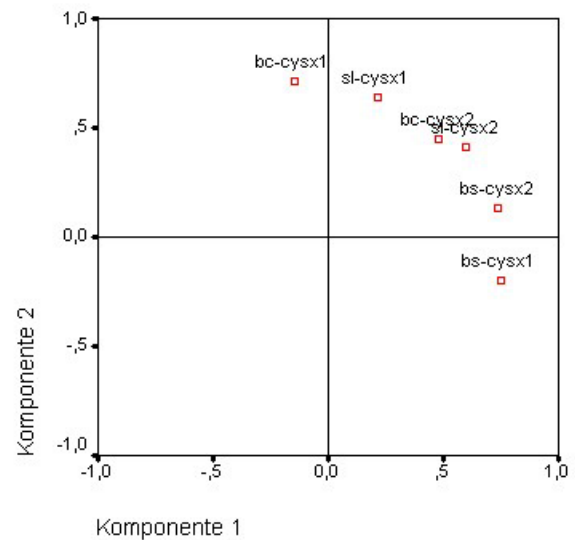
In den folgenden Abbildungen bedeuten Sl = *Serratia liquefaciens*, Bc = *Burkholderia cepacia* und Bs = *B. sacchari*.

##### 4.1 Parent Mix

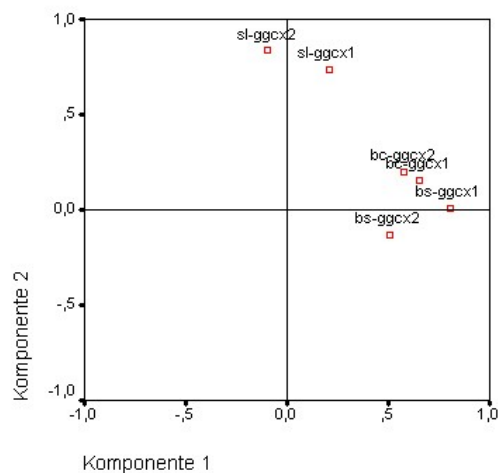
###### GS-X



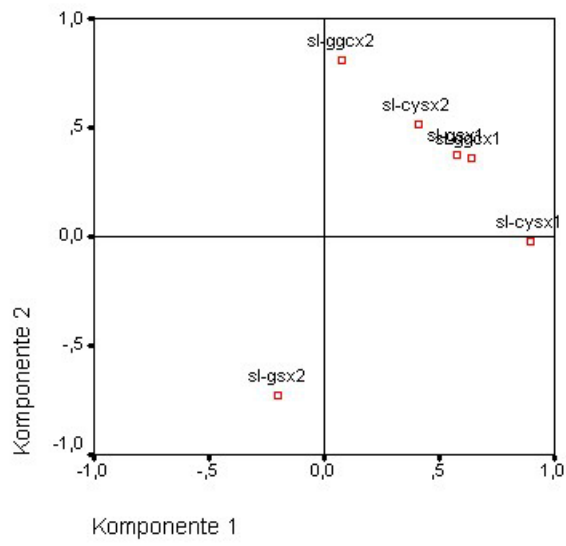
###### Cys-X



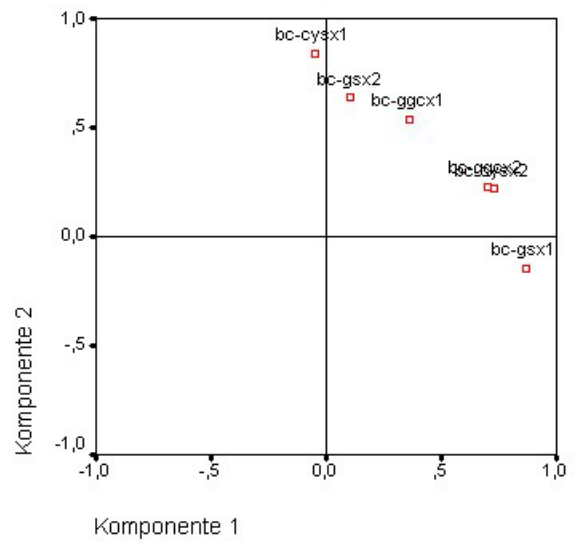
###### $\gamma$ GC-X



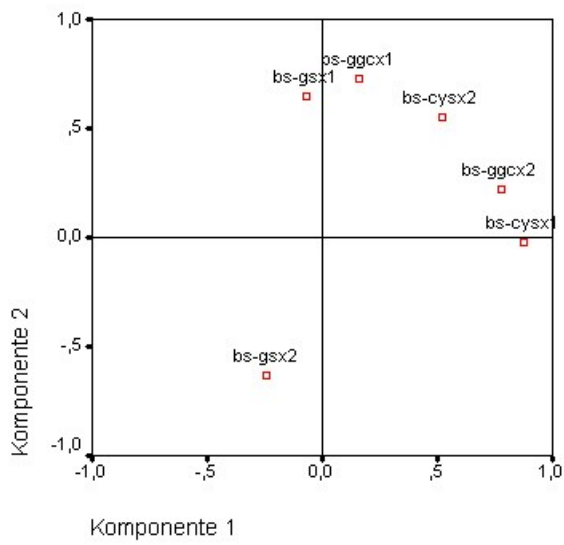
*Serratia liquefaciens*



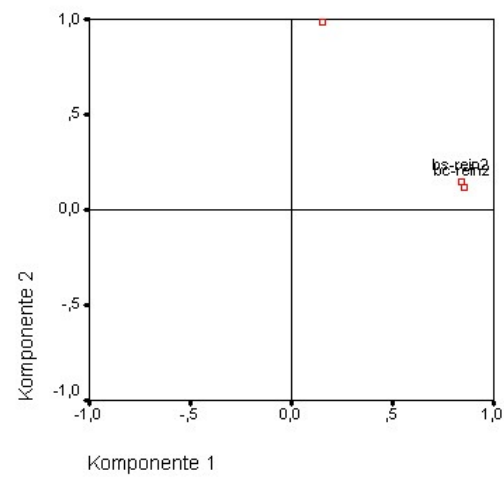
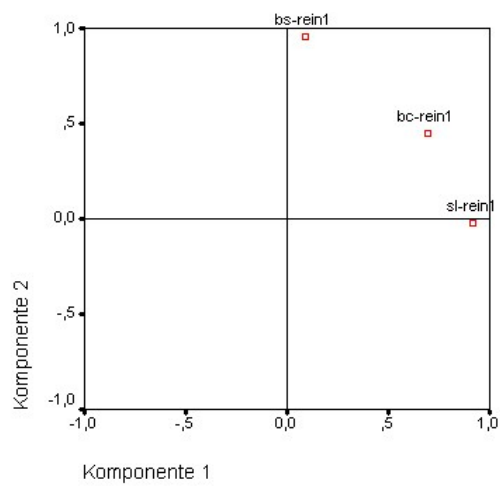
*Burkholderia cepacia*



*Burkholderia sacchari*



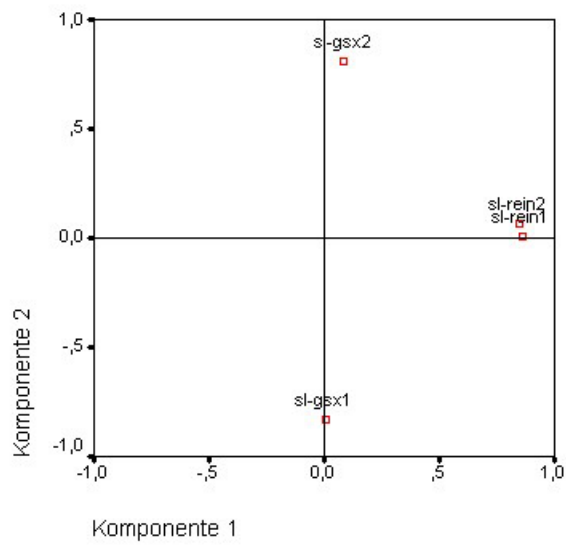
## 4.2 GS-DNB



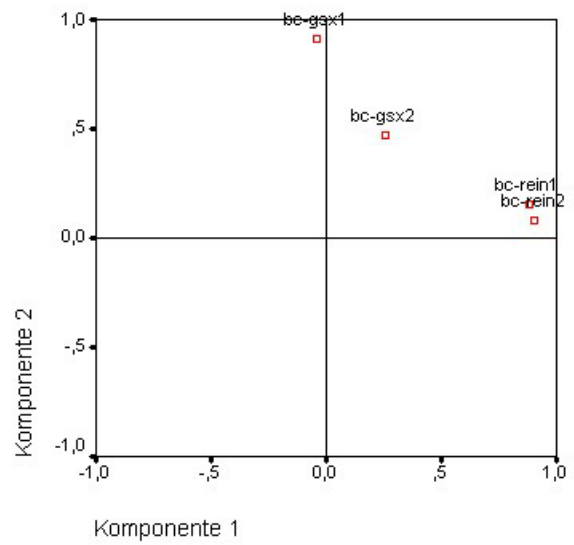


### 4.3 Vergleich zwischen GS-X „Parent Mix“ und GS-DNB

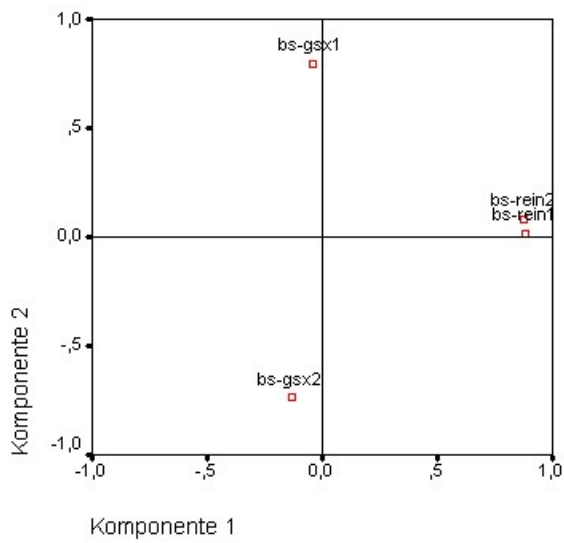
#### *Serratia liquefaciens*



#### *Burkholderia cepacia*

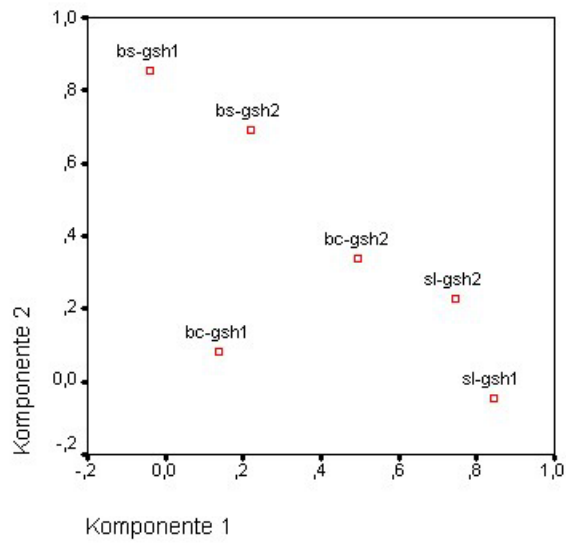


#### *Burkholderia sacchari*

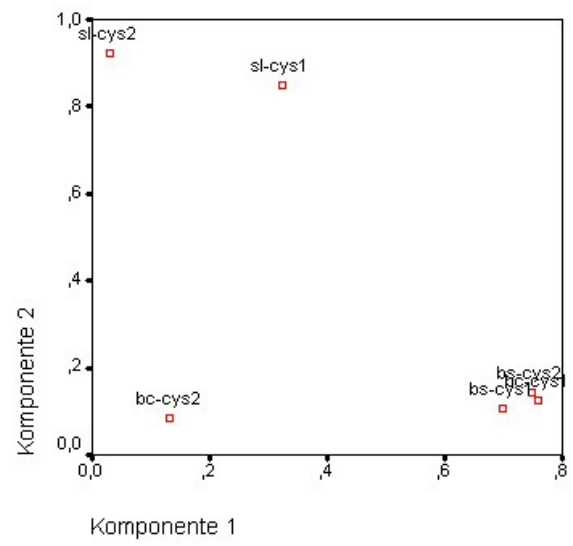


## 4.4 Thiole

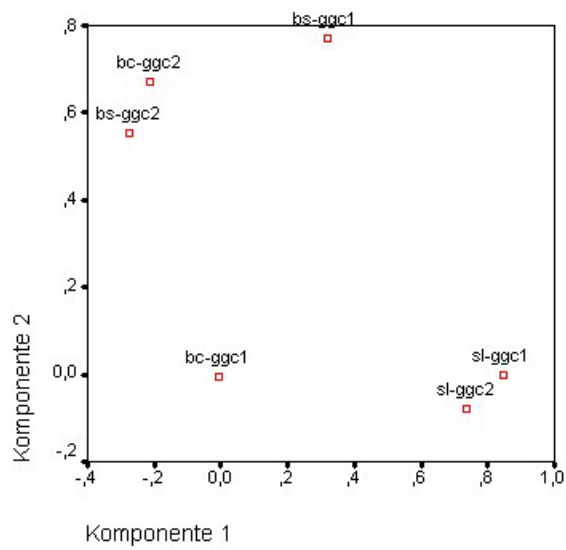
### GSH



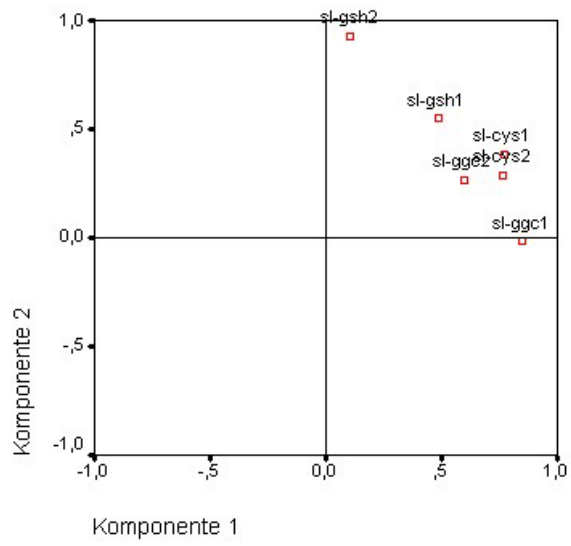
### Cys



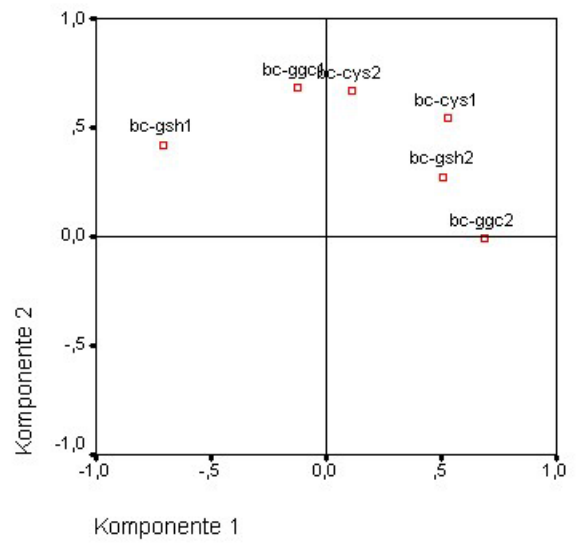
### $\gamma$ GC



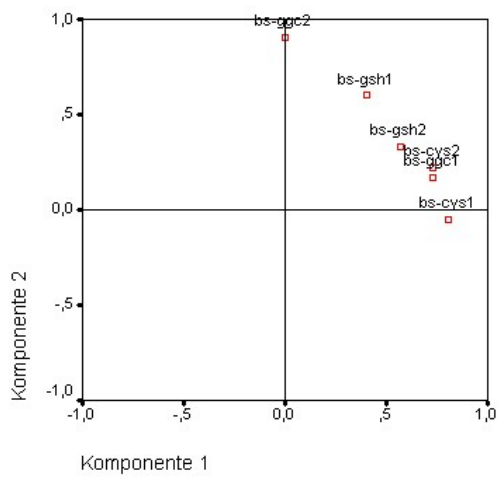
*Serratia liquefaciens*



*Burkholderia cepacia*

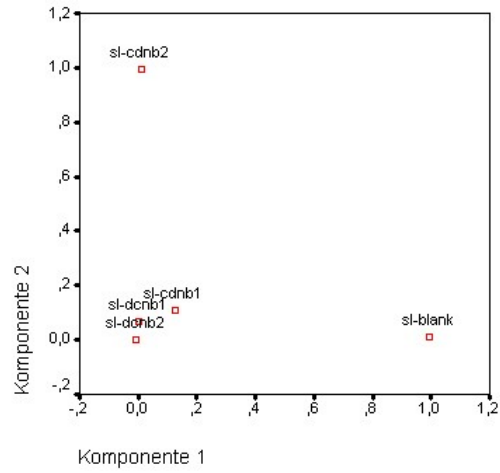
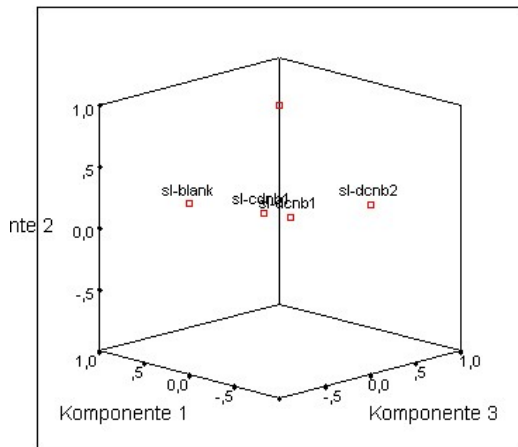


*Burkholderia sacchari*

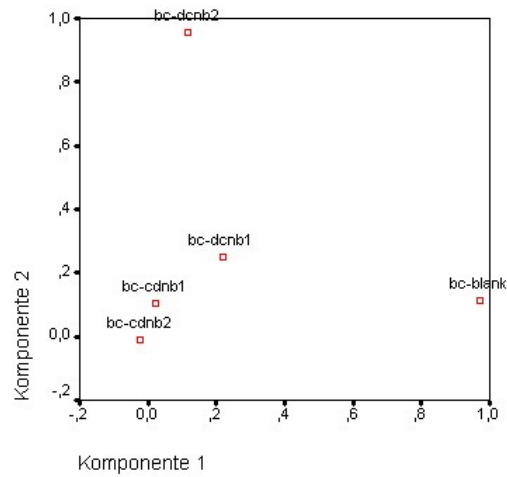
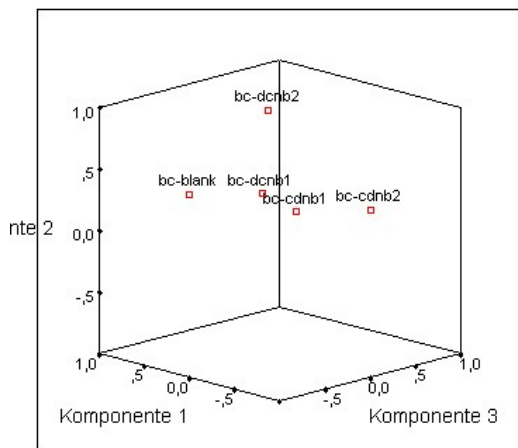


### 4.5 Modell-Xenobiotika

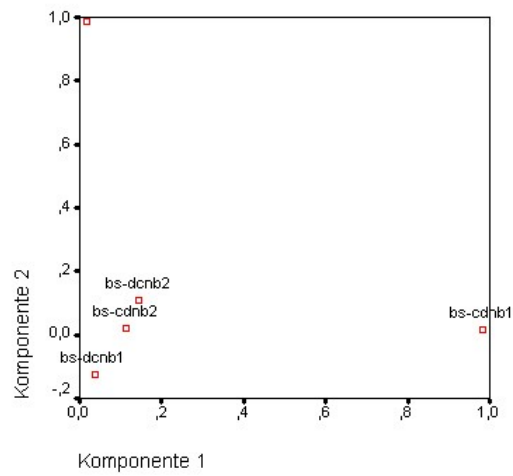
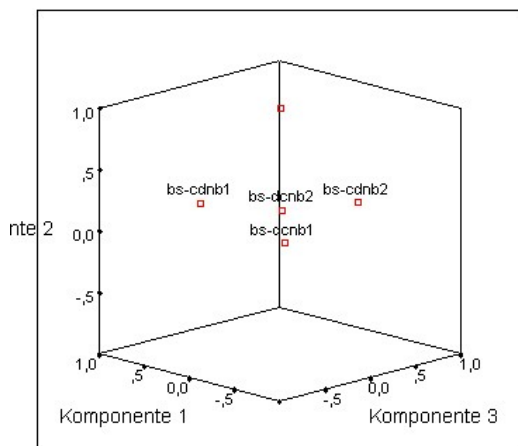
#### *Serratia liquefaciens*



#### *Burkholderia cepacia*



#### *Burkholderia sacchari*





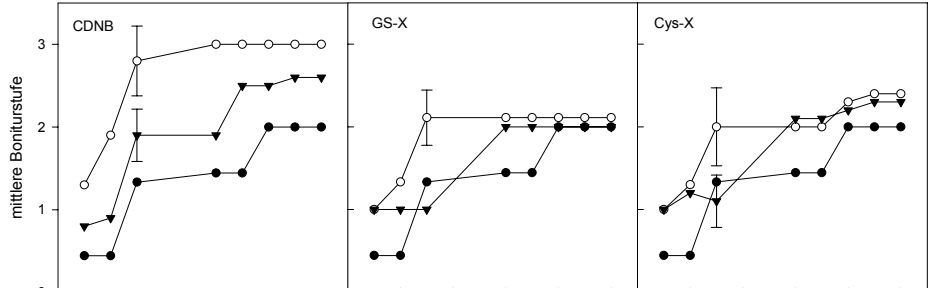
## Chlorose

Stecklinge	Tag							
	1	2	3	6	7	8	9	10
Kontrolle	0,11	0,11	0,22	1,33	1,44	1,56	1,67	1,78
	0,33	0,33	0,44	0,50	0,53	0,53	0,50	0,44
CDNB 1	0,60	1,00	2,00	2,00	2,10	2,90	2,90	3,00
	0,52	0,00	0,00	0,00	0,32	0,32	0,32	0,00
CDNB 2	0,00	1,20	1,30	1,70	1,80	2,00	2,00	2,00
	0,00	0,63	0,48	0,48	0,42	0,00	0,00	0,00
GS-X 1	0,00	1,11	1,11	1,11	1,11	1,89	2,11	2,11
	0,00	0,33	0,33	0,33	0,33	0,60	0,33	0,33
GS-X 2	0,00	1,00	1,00	1,10	1,10	1,30	1,80	1,90
	0,00	0,00	0,00	0,32	0,32	0,48	0,42	0,32
Cys-X 1	0,10	1,10	1,10	1,10	1,70	2,10	2,20	2,20
	0,32	0,32	0,32	0,32	0,48	0,32	0,42	0,42
Cys-X 2	0,00	1,10	1,10	1,20	1,20	2,00	2,00	2,00
	0,00	0,32	0,32	0,42	0,42	0,00	0,00	0,00
Pflanzen	1	2	3	6	7	8	9	10
Kontrolle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,44	0,11	0,33
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,52	0,32	0,52
CDNB 1	0,00	0,20	0,80	1,80	1,80	2,00	1,80	2,20
	0,00	0,42	0,63	0,42	0,42	0,00	0,42	0,63
CDNB 2	0,00	0,20	0,90	1,20	0,90	0,90	0,90	1,40
	0,00	0,42	0,32	0,63	0,57	0,57	0,57	0,52
GS-X 1	0,00	0,20	0,60	1,40	1,40	1,40	1,60	1,60
	0,00	0,42	0,52	0,70	0,52	0,52	0,52	0,52
GS-X 2	0,00	0,20	0,60	1,00	1,50	1,40	1,40	1,70
	0,00	0,42	0,52	0,00	0,53	0,52	0,52	0,48
Cys-X 1	0,00	0,10	0,50	1,60	1,70	2,00	2,00	2,00
	0,00	0,32	0,53	0,52	0,48	0,00	0,00	0,00
Cys-X 2	0,00	0,10	0,40	0,90	1,00	1,00	1,00	1,40
	0,00	0,32	0,52	0,32	0,00	0,00	0,00	0,52

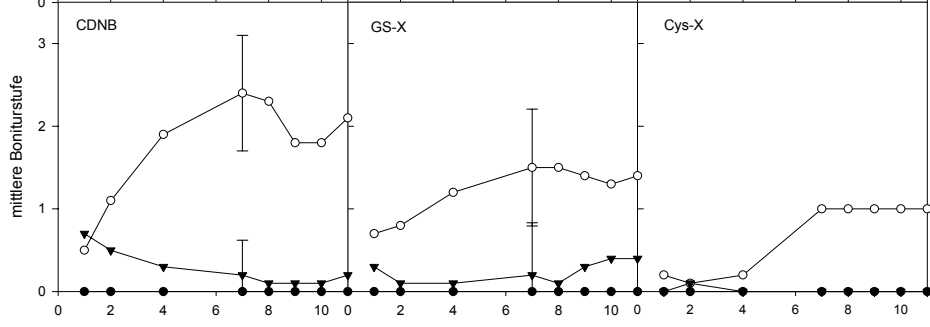
## Nekrose

Stecklinge	Tag							
	1	2	3	6	7	8	9	10
Kontrolle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	0,78	1,56	1,78
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,44	0,44	0,53	0,44
CDNB 1	0,00	0,00	0,00	0,40	1,00	2,80	2,80	3,00
	0,00	0,00	0,00	0,52	0,00	0,63	0,63	0,00
CDNB 2	0,00	0,00	0,00	0,30	0,80	0,80	1,30	1,70
	0,00	0,00	0,00	0,48	0,42	0,42	0,67	0,48
GS-X 1	0,00	0,00	0,00	1,44	1,67	2,11	2,11	2,11
	0,00	0,00	0,00	0,53	0,50	0,33	0,33	0,33
GS-X 2	0,00	0,00	0,00	1,10	1,10	1,30	1,80	1,90
	0,00	0,00	0,00	0,32	0,32	0,48	0,42	0,32
Cys-X 1	0,00	0,00	0,10	0,60	0,90	1,50	2,00	2,20
	0,00	0,00	0,32	0,52	0,32	0,71	0,67	0,42
Cys-X 2	0,00	0,00	0,00	0,30	0,90	1,30	1,60	1,70
	0,00	0,00	0,00	0,48	0,32	0,48	0,52	0,48
Pflanzen	1	2	3	6	7	8	9	10
Kontrolle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CDNB 1	0,00	0,10	1,00	1,70	1,90	1,90	2,10	2,20
	0,00	0,32	0,47	0,48	0,32	0,57	0,32	0,42
CDNB 2	0,00	0,00	0,00	0,10	0,20	0,40	0,30	0,40
	0,00	0,00	0,00	0,32	0,42	0,52	0,48	0,52
GS-X 1	0,11	0,44	1,67	1,89	2,00	2,22	2,56	2,67
	0,33	0,73	0,50	0,33	0,50	0,44	0,53	0,50
GS-X 2	0,00	0,00	0,00	0,10	0,10	0,40	0,50	0,60
	0,00	0,00	0,00	0,32	0,32	0,52	0,53	0,70
Cys-X 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,60	0,60	1,40
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,32	0,52	0,52	0,52
Cys-X 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,10	0,10	0,20
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,32	0,32	0,32	0,42

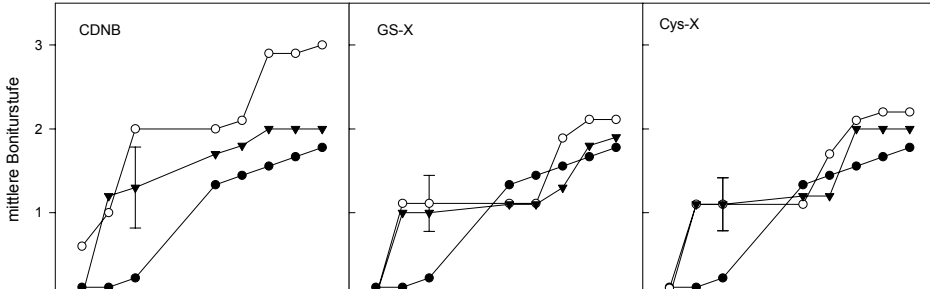
**Abb. 58**  
Welke  
Stecklinge



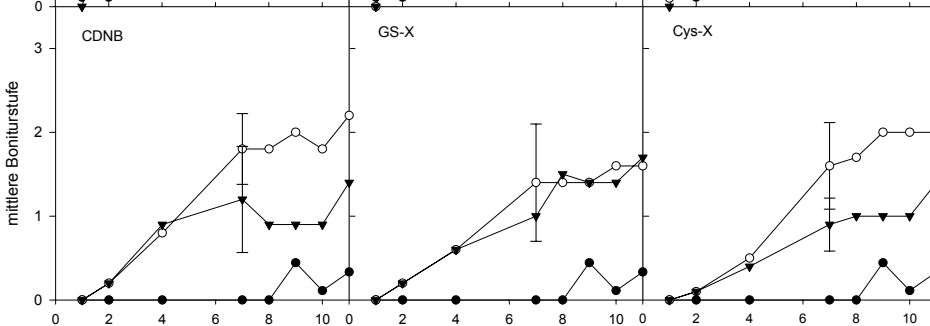
Pflanzen



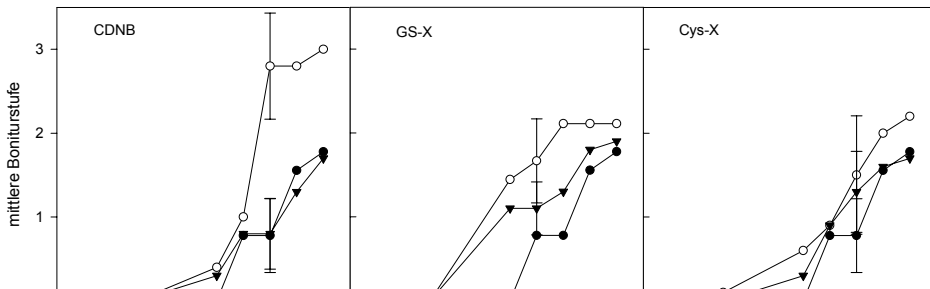
Chlorose  
Stecklinge



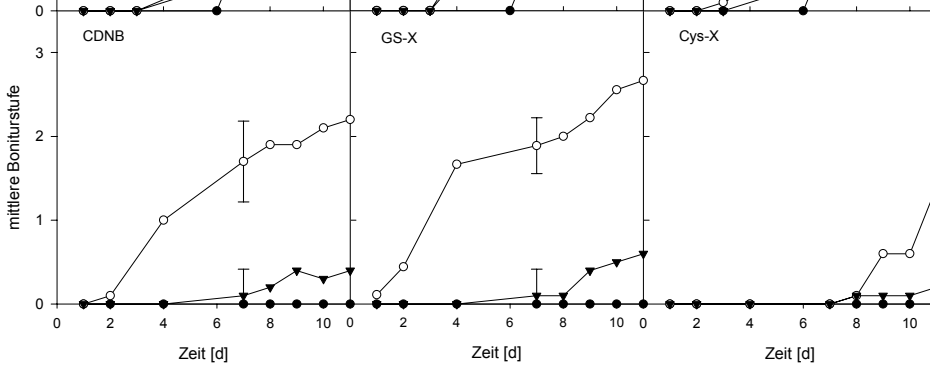
Pflanzen



Nekrose  
Stecklinge



Pflanzen







## Danksagung

Mein Dank geht an die folgenden Personen:

Apl. Prof Dr. P. Schröder für gute Ideen und stete Motivation

Prof. Dr. B. Hock für Betreuung der Arbeit

Prof. Dr. E. F. Elstner i. R. für den Vorsitz

Prof. Dr. A. Hartmann für die Bakterien-Kulturen

Dr. A. Hagn für die Pilze

Dr. A. Nepovim (Universität Prag) für die transformierten Meerrettich-Kulturen

Dr. M. Matucha (Universität Prag) für den Aufenthalt in seinem Labor

Dr. U. Hildebrandt (Universität Köln) für Trost und Beistand

Stefan „Peisili“ Peis

Andreas Nuber – oder einfach nur der Nuber

Andrea Ziegltrum

Ulrike Ikas

Hortenzia „Horti“ Jakobi

Michaela Saur

Beate Huber

Ursula Olazabal (¡Olé!)

Hägar, den Schrecklichen

Christian E. Scheer

Ebenezer „Ebenzeder“ Belford

Silvia Andres

Heiko Maier

AG Bahnweg (BIOP)

AG Schmitt-Kopplin (IÖC)

... und alle anderen!

**Lebenslauf**

Name	Frauke Diekmann	
Geburtstag/ -ort	05.11.1974 in Herford	
Schulausbildung	09/81 – 08/85	Grundschule Lippinghausen
	09/85 – 05/94	Königin-Mathilde-Gymnasium Herford
Studium	10/94 – 09/98	Studium Forstwissenschaften TU Dresden
	10/98 – 08/99	Diplomarbeit: Untersuchungen zu Unverträglichkeitserscheinungen an gepfropften Douglasien
Aufbaustudium	10/99 – 07/01	Phytomedizin Georg-August-Universität Göttingen Magisterarbeit: Mykologische Untersuchungen zu gärtnerischen Kultursubstraten auf Holzfaserbasis – unter besonderer Berücksichtigung der Gattung <i>Burgoa</i> (Basidiomycetes)
Promotion	08/01 – 12/04	Thema der Arbeit: Translokation von Fremdstoffmetaboliten und ihr Einfluß auf die Rhizosphäre
Praktika	10/94 – 01/95	Praktikum im Forstamt Minden
	08/97 – 09/97	Praktikum im Naturpark Bayerischer Wald
	08/98 – 09/98	Praktikum in der Sächsischen Landesanstalt für Forsten in Graupa
	09/99	Arbeiten in der Sächsischen Landesanstalt
	04/00 – 07/01	Volontariat in der BBA, Institut für Pflanzenschutz im Forst, Braunschweig
Auslandsaufenthalt	04/03	Forschungsaufenthalt an der Academy of Sciences of the Czech Republic in Prag, Department of Plant Tissue Cultures und Institute of Experimental Botany, Isotope Laboratory