

FORSCHUNGSBERICHTE DES LANDES NORDRHEIN-WESTFALEN

Nr. 2496

Herausgegeben im Auftrage des Ministerpräsidenten Heinz Kühn  
vom Minister für Wissenschaft und Forschung Johannes Rau

Prof. Dr. rer. nat. Wilfried Ernst  
Cand. rer. nat. Werner Mathys  
Dr. rer. nat. Peter Janiesch

Institut für Angewandte Botanik  
der Universität Münster

Physiologische Grundlagen  
der Schwermetallresistenz  
-Enzymaktivitäten und organische Säuren-



Westdeutscher Verlag 1975

© 1975 by Westdeutscher Verlag GmbH, Opladen  
Gesamtherstellung: Westdeutscher Verlag

ISBN-13: 978-3-531-02496-7 e-ISBN-13: 978-3-322-88080-2  
DOI: 10.1007/978-3-322-88080-2

## Inhalt

A. Einleitung .....	5
B. Material und Methoden .....	6
I. Material .....	6
II. Methoden .....	6
C. Ergebnisse und Diskussion .....	9
I. Schwermetallresistenzeigenschaften von pflanzlichen Enzymen .....	9
1. In-vitro-Untersuchungen .....	9
2. In-vivo-Untersuchungen .....	12
3. Diskussion .....	13
II. Die Evolution der Schwermetallresistenz in Gramineen nach Schwermetallbelastung .....	14
Resultate und Diskussion .....	14
III. Schwermetallresistenz und Stickstoffgehalt .....	16
Diskussion .....	18
IV. Schwermetallresistenz und organische Säuren .....	19
1. Resultate .....	19
a) Allgemeine Säurespektren der untersuchten Arten .....	19
b) Säuremetabolismus unter Zinkeinfluß .....	21
c) Säuremetabolismus unter Kupfereinfluß .....	22
2. Diskussion .....	24
Danksagung .....	27
Zusammenfassung .....	27
Literaturverzeichnis .....	28
Abbildungen .....	33

## A. Einleitung

Angiospermen und Bryophyten, die in schwermetallreichen Böden und Wässern wachsen, haben eine spezifische physiologische Resistenz nur gegen jene Schwermetalle erworben, die im Substrat des Standortes reichlich vorhanden sind (Ernst 1974). Der Resistenzmechanismus, der zwischen den einzelnen Schwermetallen unterscheiden kann, ist nicht in den Schwermetallaufnahmemechanismen gegeben; denn bezüglich der Ionenaufnahme besteht kein Unterschied zwischen schwermetallresistenten und nicht-resistenten Pflanzen (Ernst 1972, Mathys 1973). Auch die Verteilung der Schwermetalle innerhalb der Pflanzenorgane ist unabhängig von der Höhe der Schwermetallresistenz (Ernst 1969, 1974, Mathys 1973). Deshalb sind die von Turner (1970) diskutierten Unterschiede in der Schwermetallkumulation der Wurzelzellwände ebenso wie in der Kationenumtauschkapazität höchstens Teilaspekte der Schwermetalltoleranz, zumal in den Blättern bei steigenden Schwermetallgehalten die Bedeutung der Zellwand für eine Regulation des Schwermetallhaushaltes gering wird (Ernst 1969, 1975, Mathys 1973). Vor allem wird das Phänomen der spezifischen protoplasmatischen Resistenz schwermetalltoleranter Arten nicht erklärt (Gries 1966, Rüther 1967, Ernst 1972b, 1974). Die Anreicherung von Schwermetallen in den Vakuolen setzt einen Transport dieser Elemente durch das Plasma in einer solchen Art voraus, daß es zu keinen Interaktionen mit schwermetallsensitiven Strukturen kommen kann. Als physiologische Grundlagen der Schwermetallresistenz kommen zwei Möglichkeiten in Betracht:

1. die Evolution schwermetallresistenter Enzyme,
2. die Umsteuerung des Stoffwechsels einiger Metabolite.

Basierend auf den Befunden von Horii et al. (1956) und Murayama (1961), die die Evolution kupferresistenter Enzyme des Tricarbon-säurezyklus bei kupferresistenten Bakterien und Pilzen entdeckten, und unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Ashida & Nakamura (1959), die über eine Umsteuerung des Schwefelmetabolismus von kupfertoleranten Hefen berichteten, ist der Zweck dieser Untersuchungen auf eine weitere Aufklärung des Resistenzmechanismus von höheren Pflanzen gegenüber Schwermetallen gerichtet. Vor allem fordert die zunehmende Verwendung von Enzymen als Indikatoren pflanzlicher Belastung (u.a. Sirkar & Amin 1974, Keller 1974) eine rasche Klärung der Möglichkeit zur Evolution schwermetallresistenter Enzyme, zumal einige Pflanzenarten unter Schwermetallstress rasch resistente Populationen entwickeln können (Bradshaw et al. 1965, Gartside & McNeilly 1974, Kraal & Ernst 1975).

## I. Material

Die folgenden Pflanzen wurden untersucht: Von *Silene cucubalus* Wib. nicht-schwermetallresistente Populationen von einem kalkreichen Boden in Brochterbeck, von silikatreichen Böden des Mt. Aravis bei Chamonix/Frankreich und von St. Leonhard/Italien, zinkresistente Populationen von Blankenrode und vom Silberberg bei Osnabrück, eine kupferresistente Population von Marsberg und eine zink- und kupferresistente Population von Langelsheim; von *Silene nutans* L. eine nicht-schwermetallresistente Population von St. Leonhard und eine kupferresistente Population von Thallitter; von *Thlaspi alpestre* L. eine zinkresistente Form vom Silberberg bei Osnabrück und eine nicht-schwermetallresistente Form von Le Vivier des Rousses aus dem Schweizer Jura; von *Agrostis tenuis* Sibth. eine kupferresistente Population von Marsberg, eine zinkresistente Form von Blankenrode und eine nicht-schwermetallresistente Form von Ede/Niederlande. Die Pflanzen für die Untersuchungen nach der Evolutionsgeschwindigkeit der Schwermetallresistenz sind in der entsprechenden Tabelle mit ihrer Herkunft vermerkt.

## II. Methoden

Kulturmethoden: Nach sechswöchiger Anzucht der Populationen von *Silene cucubalus*, *Silene nutans* und *Agrostis tenuis* resp. nach zehnwöchiger Anzucht der *Thlaspi* - Populationen in einer Sandkultur unter Zusatz einer verdünnten Nährlösung wurden die Pflanzen entweder weiter in demselben Medium (A), in einem calciumreichen Sand (B), in einer Einheitstorferde (C) oder in einer belüfteten Nährlösung (D) weiter aufgezogen. Das Kulturmedium wurde entsprechend der Fragestellung gewählt: Für den in-vitro-Enzymtest wurden aus der Sandkultur A, für die in-vivo-Enzym- und die Stickstoffuntersuchungen Pflanzen aus der Wasserkultur genommen. Für die Untersuchungen der organischen Säuren wurden die Medien B, C und D verwendet. Die Nährlösung hatte folgende Zusammenstellung: je 1000 ml aqua dest. 3 mM  $\text{KNO}_3$ , 1 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 mM Fe-EDTA, 0.1 mM  $\text{NaCl}$ , 0.05 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.02 mM  $\text{MnSO}_4$ , 0.001 mM  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_24$ , 0.0001 mM  $\text{CuSO}_4$ . Veränderungen sind in den entsprechenden Abschnitten vermerkt.

Elektrophorese: Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 300 V und bei 25 mA bis zum Austritt aus dem Spacer, und bei 50 mA bis zum Ende ausgeführt. Das Pflanzenmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in einem Puffer homogenisiert (Pufferzusammensetzung: Tris pH 7.7,  $10^{-3}$  Cystein,  $10^{-3}$  EDTA,  $10^{-3}$  Mercaptoäthanol). Nach 15 minütiger Zentrifugation in einer gekühlten Zentrifuge bei  $20 \times 10^3$  rpm wurde der Überstand mit Aceton gefällt. Die Acetonfällung wurde im Spacergel aufgenommen. Für die Elektrophorese wurde mit einem Spacergel (pH 6.9) und einem 7.5%igen Trenngel (pH 8.3) nach Maurer (1971) gearbeitet.

Die Färbung der Malatdehydrogenase erfolgte nach Brewer (1970) mit einem Medium bestehend aus 0.1 M Tris (pH 7.0), 0.2 M Malat, 0.001 M NAD, 0.163 mM Phenazinmethosulfat, 0.43 mM NBTetrazolium.

Für die Proteinfärbung wurde das Gel 30 min in 12.5%iger TCA fixiert und anschließend in einem Gemisch, das aus 1 Teil 1%iger Coomassie Blue R 250 und 19 Teilen 12.5%iger TCA bestand, 45 min inkubiert (Maurer 1971).

Enzymbestimmungen: Für die in-vitro-Bestimmungen wurden Blätter zehn Wochen alter Pflanzen mit flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem Tris-HCl-Puffer (pH 7.5, 0.025 M) ohne sonstige Zusätze homogenisiert. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 30.000 g wurde der Überstand durch Sephadex G25 filtriert und das Eluat als Enzymquelle benutzt. Für die Messung der Enzymaktivität in vivo wurden Pflanzen aus der Wasserkultur (4 Wochen Kulturdauer) in derselben Weise geerntet, aber in einem Tris-HCl-Puffer unter Zusatz von  $2 \times 10^{-3}$  M Cystein,  $10^{-3}$  M Na-EDTA und 2 g Polyclar AT (Serva Heidelberg) je g Pflanzenmaterial homogenisiert. Dieser Puffer gewährleistete eine volle Aktivität nach der Homogenisation.

Die Malatdehydrogenase (MDH. E.C.1.1.1.37) wurde mit Oxalacetat als Substrat nach Wakuchi et al. (1971), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH. E.C.1.1.1.49) und Isocitratdehydrogenase (ICDH. E.C.1.1.1.41) nach Bergmeyer (1970), aber ohne Mg resp. Mn im Inkubationsmedium und während der in-vitro-Versuche mit einem Tris-HCl-Puffer (pH 7.7, 0.025 mM) bestimmt. Die Aktivität der Nitratreduktase (NR. E.C.1.6.6.2) wurde durch den Umsatz von Nitrat zu Nitrit bestimmt (Austenfeld 1974), aber für das in-vitro-Experiment wurde der Phosphatpuffer durch einen Tris-HCl-Puffer (pH 7.7, 0.025 mM) ersetzt. Alle Schwermetalle wurden im in-vitro-Versuch als Sulfat in das Inkubationsmedium gegeben.

Stickstoff-, Nitrat- und Proteinbestimmungen: Für die Gesamtstickstoffbestimmungen wurden die Pflanzen bei 60°C getrocknet, in einer Culatti-Mühle gemörsert und 40 mg Trockensubstanz ohne Zusatz von CuO im Stickstoff-Schnellbestimmungsautomaten Mikro-Rapid-N nach Merz (1970) mit zugeschaltetem Nachbrenner im O<sub>2</sub>-Strom verbrannt.

Nitratstickstoff wurde nach Balks & Reekers (1954) colorimetrisch bestimmt.

Für die Proteinstickstoff-Bestimmungen wurde ca. 5 g Frischmaterial mit Tris-Puffer (0.05 M, pH 7.7) gemörsert und anschließend bei 20 x 10<sup>3</sup> rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10%iger TCA im Verhältnis 1:1 das lösliche Protein (24 h) gefällt. Der Rückstand der Zentrifugation wurde 24 Stunden mit Wasser extrahiert, anschließend getrocknet und der unlösliche Proteinstickstoff nach dem oben angegebenen Verfahren automatisch bestimmt. Der Rückstand der Fällung wurde mit 5%iger TCA und anschließend mit Aceton gewaschen, getrocknet und ebenfalls direkt im O<sub>2</sub>-Strom verbrannt.

Schwermetallbestimmungen: Die Schwermetalle wurden nach nasser Veraschung des Pflanzenmaterials in HNO<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub> atomabsorptionspektrofotometrisch bestimmt.

Analyse der organischen Säuren: Enzymatische Malatbestimmung: Das Pflanzenmaterial wurde mit kalter HClO<sub>4</sub> (0.4 M) gemörsert,

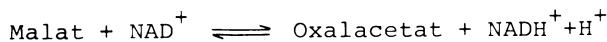
10 min bei  $20 \times 10^3$  rpm zentrifugiert, der Überstand mit  $K_2CO_3$  neutralisiert und die Absorptionszunahme bei der Umsetzung von  $NAD^+$  zu  $NADH_2$  bei 340 nm im Spektralfotometer nach Bergmeyer (1970) gemessen. Die qualitative und quantitative gaschromatografische Bestimmung der wasserlöslichen organischen Säuren erfolgte an den Methyllderivaten der Säuren in einer Glaskolonne, gefüllt mit Diäthylenglycoladipat in einem Hewlett-Packard 57508 mit Flammenionisationsdetektor nach Mensen de Silva (1971).

## C. Ergebnisse und Diskussion

### I. Schwermetallresistenzeigenschaften von pflanzlichen Enzymen

#### 1. In-vitro-Untersuchungen

Malatdehydrogenase: Die Malatdehydrogenase (MDH), welche die Reaktion



katalysiert, spielt im Stoffwechsel der Zellen eine zentrale Rolle. Das Enzym kommt zwar meistens in einer Reihe von Isoenzymen in den Pflanzen vor, die allerdings während des Wachstums und der Entwicklung der Pflanzen kaum eine qualitative Veränderung erfahren (Longo & Scandalios 1969, Rocha & Ting 1970, O'Sullivan & Wedding 1972) und sich deshalb für unsere Fragestellung besonders gut eignen.

Die Resultate der Untersuchung von MDH-Isoenzymen in ungekeimten Samen von verschiedenen Populationen von *Silene cucubalus* sind in Abb. 1 zusammengestellt. Fünf Isoenzyme sind in allen untersuchten Populationen vorhanden. Populationen mit geringer Enzymaktivität (Mt. Aravis) haben eine niedrigere Anzahl von Isoenzymen als Populationen mit hoher Aktivität (Silberberg, Langelsheim), in denen bis zu 8 Isoenzyme gefunden wurden. Diese Abhängigkeit der Muster von der Aktivität stimmt mit Befunden an Baumwollblättern überein (O'Sullivan & Wedding 1972).

Diese Relation von Aktivität und Anzahl von Isoenzymen bleibt auch in den Blättern der Pflanzen erhalten (Abb. 2). Ferner geht aus Abb. 2 hervor, daß bei Pflanzen derselben Art die einzelnen Populationen, die gegenüber Schwermetallen unterschiedlich resistent sind, nach Zufütterung von Schwermetallen Veränderungen im Isoenzymmuster aufweisen. So sind z.B. in der nicht-schwermetallresistenten Population Brochterbeck bei gleicher Aktivität des Isoenzymes G die Isoenzyme C und D im Zymogramm nicht mehr nachzuweisen, während in der zinkresistenten Population Blankenrode unter Zinkeinfluß das Isoenzym C erst eine höhere Aktivität anzeigt. Inwieweit hier eine Inaktivierung resp. Aktivierung durch Zink vorliegt und damit die Befunde mit denjenigen an Bohnen nach *Puccinia*-Infektion vergleichbar sind (Stamples & Stahmann 1963), kann aus diesen Zymogrammen nicht direkt geschlossen werden.

Darum war es notwendig, die Aktivität der MDH in Blattextrakten über den enzymatischen Test zu vergleichen. Um Interaktionen von Schwermetallen mit den Enzymen vor Versuchsansatz auszuschließen, wurden diese in-vitro-Untersuchungen nur an Pflanzen aus schwermetallarmen (d.h. normal mit Schwermetallen versorgten Medien) durchgeführt. Erst im Enzymansatz wurden die Schwermetalle zugesetzt. Die Ergebnisse für die Malatdehydrogenase sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Obgleich die Pflanzen sehr verschiedene Grade von Schwermetallresistenz besitzen, konnten bezüglich der Schwermetallresistenz der MDH weder in Blättern noch in Wurzeln populationsspezifische Schwermetalleigenschaften gefunden werden. Die kupfer- und zinkresistenten Pflanzen besitzen eine Malatdehydrogenase mit derselben Schwermetallempfindlichkeit in vitro wie

die nicht-schwermetallresistente Population Brochterbeck. Verglichen mit der protoplasmatischen Schwermetallresistenz nicht-resistenter Populationen ist die Schwermetallempfindlichkeit der MDH noch so hoch, daß dieses Enzym für die Resistenzgrenze der nicht-schwermetallresistenten Pflanzen nicht der limitierende Faktor sein kann, wohl aber für die Zinkresistenz der Zinkpopulationn.

Tab. 1: Schwermetallkonzentrationen, (mM Me), die die Aktivität der Malatdehydrogenase aus Blättern und Wurzeln von unterschiedlich schwermetallresistenten Populationen von *Silene cucubalus* in vitro um 50 % reduzieren

Population	Resistenz	Blätter		Wurzel	
		Zn (mM)	Cu (mM)	Zn (mM)	Cu (mM)
Brochterbeck	---	1.46	0.38	1.50	0.37
Blankenrode	Zn	1.40	0.38	1.52	0.40
Marsberg	Cu	1.46	0.39	1.48	0.40
Langelsheim	Zn,Cu	1.43	0.38	1.51	0.39

Da die MDH aller Populationen in derselben Weise gegenüber den einzelnen Schwermetallen reagiert hat, ist die spezifische Schwermetallempfindlichkeit gegen eine Reihe weiterer Schwermetalle getestet worden (Abb. 3). MDH ist besonders empfindlich gegen Kadmium und Kupfer, hingegen relativ unempfindlich gegenüber Kobalt und Mangan. Aufgrund der bekannten Aktivierung durch Mangan (Vennesland et al. 1949) ist der Befund für dieses Schwermetall nicht verwunderlich, hingegen ist eine Ko-Aktivierung durch Kobalt bisher unbekannt.

Isocitrat-Dehydrogenase: Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH), als Ausgangssubstrat aktiviertes Enzym, katalysiert im Tricarbonäurezyklus den Schritt zur Oxalbernsteinsäure. Für dieses Schlüsselenzym sind in keiner der schwermetallresistenten Populationen von *Silene cucubalus* Anzeichen einer besonderen Resistenz entdeckt worden (Tab. 2).

Tab. 2: Kupfer- und Zinkkonzentrationen (mM Me), die zu einer Verminderung der Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase um 50 % in den Blättern und Wurzeln unterschiedlich schwermetallresistenter Populationen von *Silene cucubalus* führen.

Population	Resistenz	Blätter		Wurzel	
		Zn (mM)	Cu (mM)	Zn (mM)	Cu (mM)
Brochterbeck	---	0.17	0.42	0.16	0.44
Blankenrode	Zn	0.17	0.40	0.15	0.44
Marsberg	Cu	0.16	0.40	0.15	0.44
Langelsheim	Zn,Cu	0.16	0.42	0.15	0.44

Im Vergleich zur maidtaenyarogenase wirkt das Zink bei diesem Enzym stärker aktivitätsvermindernd als das Kupfer. Während die Empfindlichkeit gegen Kupfer um den Faktor 100 über der protoplasmatischen Kupferresistenz Cu-intoleranter Pflanzen und im Bereich derjenigen des Kupferökotyps liegt, bleibt die Zinkresistenz dieses Enzyms *in vitro* unter der protoplasmatischen Zinkresistenz von Zinkökotypen.

Für die allgemeine Charakterisierung der ICDH gegenüber Schwermetallen (Abb. 4) fällt die relativ hohe Verträglichkeit *in vitro* gegenüber Kobalt und Kadmium auf, die darauf hinweist, daß durch Kadmium bedingte Stoffwechselbeschäden des Tricarbonsäurezyklus erst an späterer Stelle auftreten müssen (Miller et al. 1973). Die maximale Aktivität entfaltete die ICDH bei 40 mM Mangan. Damit bestätigen sich die Befunde anderer Autoren, die es als Mangan stimuliertes Enzym ausgewiesen haben (Kornberg & Pricer 1951). Allerdings sind die bisher verwandten Mangankonzentrationen (1 mM MnCl<sub>2</sub>) bei der Charakterisierung der Enzymaktivität (Bergmeyer 1970, Wakiuchi et al. 1971) absolut unzureichend. Die starke Stimulation durch Zink (Northrop & Cleland 1970) konnte nicht bestätigt werden. Wurde Mangan zusammen mit anderen Schwermetallen getestet, dann wurde allein die absolute Aktivität, nicht aber der relative Aktivitätsverlust beeinflußt.

Insgesamt kann festgestellt werden, daß die von Horii et al. (1956) in kupfertolerantem *Mycobacterium tuberculosis avium* und die von Murayama (1961) in kupfertolerantem *Saccharomyces cerevisiae* entdeckte Evolution kupferresistenter Enzyme des Tricarbonsäurezyklus zumindest in den hier untersuchten Angiospermen nicht stattgefunden hat.

Glucose-6-phosphat-dehydrogenase: Dieses Enzym ist das Eingangsenzym zum Pentosephosphatzzyklus, dem in höheren Pflanzen durch die Bereitstellung von NADPH<sup>+</sup>H<sup>+</sup> große Bedeutung zukommt. Aus diesem Grunde ist die Schwermetallresistenz-eigenschaft dieses Enzyms von besonderem Interesse. Aber ebenso wie bei den Enzymen des Tricarbonsäurezyklus ergibt sich auch hier eine nicht-populationsspezifische Hemmung der Aktivität der G6P-DH durch Schwermetalle (Tab. 3), dafür aber wieder eine ausgeprägte Elementspezifität. So ist die Beeinträchtigung durch Kupfer um das 350-fache größer als durch Zink.

Tab. 3: Kupfer- und Zinkkonzentrationen (mM Me) mit 50%iger Aktivitätsverminderung der Glucose-6-phosphatdehydrogenase aus Blättern und Wurzeln unterschiedlich schwermetallresistenter Populationen von *Silene cucubalus*

Population	Resistenz	Blätter		Wurzeln	
		Zn (mM)	Cu (mM)	Zn (mM)	Cu (mM)
Brochterbeck	---	0.35	0.001	0.35	0.001
Blankenrode	Zn	0.36	0.001	0.37	0.001
Marsberg	Cu	0.35	0.001	0.35	0.001
Langelshiem	Zn,Cu	0.34	0.001	0.34	0.001

Von den anderen Schwermetallen hemmt Kadmium die G6P-DH-Aktivität in stärkerem Maße als Zink und Nickel (Abb. 5), während Kobalt indifferent wirkt. Die schwache Aktivitätserhöhung im Bereich von 1.0 bis 2.0 mM Mangan steht im Einklang mit den Befunden von McNair-Scott & Cohen (1953).

**Nitratreduktase:** Für Pflanzen basischer Böden, wie in Blankenrode, Marsberg und Brochterbeck, liegt der pflanzenverfügbare Stickstoff fast ausschließlich als Nitrat vor, so daß die gesamte Proteinsynthese nur via Nitratreduktase starten kann. Die Nitratreduktase als SH-Enzym erweist sich in den untersuchten Populationen von *Silene cucubalus* als außerordentlich sensitiv gegen Kupfer und Zink. Das Enzym verliert bereits bei 0.006-0.007 mM Zn und 0.0006-0.0007 mM Cu 50 % seiner Aktivität. Auch gegenüber den anderen Schwermetallen ist es sehr empfindlich (Abb. 6), lediglich im Bereich von 0.01 mM Mn kann seine Aktivität über einen kleinen Konzentrationsbereich noch gesteigert werden. Insgesamt gilt aber auch für dieses Enzym, daß eine mit der Schwermetallresistenz-*zeigenschaft* des Plasmas gekoppelte Resistenz des Enzyms selbst nicht vorliegt.

## 2. In-vivo-Untersuchungen

Um die offensichtliche Diskrepanz zwischen dem Fehlen schwermetallresistenter Enzyme in schwermetalltoleranten Pflanzen in vitro und der zum Teil hohen protoplasmatischen in-vivo-Schwermetallresistenz zu klären, soll im folgenden der Möglichkeit nachgegangen werden, inwieweit die Enzyme unterschiedlich schwermetallresistenter Populationen von *Silene cucubalus* in vivo auf einen Schwermetallzusatz reagieren. In durchlüfteten Wasserkulturen mit (0.4 mM Zn/1) und ohne Zinksulfatzzusatz wurden *Silene cucubalus*-Pflanzen der drei Populationen Brochterbeck (nicht-schwermetallresistent), Blankenrode (zinkresistent) und Marsberg (kupferresistent) angezogen und nach vierwöchiger Kulturdauer die folgenden Enzyme auf ihre Aktivität getestet: Malat-, Isocitrat- und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase sowie die Nitratreduktase. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

**Tab. 4:** Die in-vivo-Aktivität ( $\mu\text{M Substrat/h} \times \text{g Frischgewicht}$ ) einiger Enzyme in Blättern von *Silene cucubalus*-Populationen nach vierwöchiger Kulturdauer mit (0.4 mM) und ohne Zink (0.0 mM Zn/1) im Nährmedium

Enzym	Population					
	zinkresistent Blankenrode		kupferresistent Marsberg		nicht-resistant Brochterbeck	
	0.0 mM	0.4 mM	0.0 mM	0.4 mM	0.0 mM	0.4 mM Zn/1
MDH	2890.0	2760.0	2770.0	2830.0	3150.0	2780.0
ICDH	15.7	19.9	18.1	16.9	12.3	10.2
G6P-DH	22.4	12.4	19.3	25.8	10.3	14.2
NR	3.2	5.5	5.2	1.2	6.3	0.9

Mit Ausnahme der Malatdehydrogenase zeigen alle Enzyme eine populationsspezifische Reaktion. Die MDH hat in allen Populationen

eine fast gleichmäßig sehr hohe Aktivität (ca. 3000  $\mu\text{M}$  Oxalacetat/h  $\times$  g Frischgewicht), die durch Zink im Nährmedium lediglich in der nicht-schwermetallresistenten Population eine Beeinträchtigung von ca. 10 % erfährt. Diese Reaktion wurde bereits im Zymogramm (Abb. 2) der MDH erkennbar. Auch im in-vitro-Resistenz-Test weist dieses Enzym die höchste Zinkresistenz auf. Es bleibt auch unter anderen mineralischen Stress-Situationen fast unbeeinflußt (Wakiuchi et al. 1971 für Ammonium-Stress, von Willert 1974 und Greenway & Sims 1974 für NaCl und KCl-Stress in Halophyten).

Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wird in ihrer Aktivität im Zinkökotyp im zinkreichen Medium um 55 % reduziert, während sie in den nicht-zinkresistenten Populationen Marsberg und Brochterbeck stimuliert wird. Damit wird zum ersten Mal in vivo eine unterschiedliche Reaktion von Enzymen in Relation zur Schwermetallresistenz in spezifischer Form deutlich. Die geringste Aktivität der G6P-DH fällt in jeder Population mit dem Optimum der Stoffproduktion zusammen. Deshalb muß der Aktivitätsanstieg in den nicht-zinkresistenten Populationen als Toxizitätssymptom interpretiert werden, wie es bereits bei Ammoniumtoxizität in Gurken bekannt ist (Wakiuchi et al. 1971). Die hohe Aktivität der Zinkökotyp-G6P-DH im zinkarmen Medium dürfte ähnlich wie bei Kalium als Reaktion auf eine Unterversorgung zu deuten sein (Kinzel & Stummerer 1974).

Die beiden anderen untersuchten Enzyme erfahren beim Zinkökotyp im zinkreichen Medium eine Steigerung ihrer Aktivität, bei den nicht-zinkresistenten Ökotypen hingegen eine Reduktion, die mit 7 resp. 17 % für die ICDH geringer ist als die Steigerung um 27 % im Zinkökotyp. Dagegen wird die Nitratreduktase in viel entscheidender Form durch ein zinkreiches Medium beeinflußt. Sie erleidet einen Aktivitätsverlust um 77 % (Marsberg) resp. 86 % (Brochterbeck) in den nicht-zinkresistenten Populationen. Dem steht ein Aktivitätsgewinn um 72 % beim Zinkökotyp gegenüber, der mit dem Optimum der Stoffproduktion zusammenfällt.

Vergleichen wir das Proteinmuster aus Samen unterschiedlich schwermetall-resistenter Populationen (Abb. 7), so wird deutlich, daß die in vivo gefundenen unterschiedlichen Reaktionen nicht auf andere Proteinstrukturen zurückzuführen sind. Das bedeutet, daß die resistenten Populationen keineswegs neue Proteine von bedeutender Quantität synthetisiert haben.

### 3. Diskussion

Auf dem Weg durch das Cytoplasma können die Schwermetalle eine Reihe von Reaktionssorten finden, z.B. Cysteinyl- und Histidyl-Seitenketten von Proteinen, Purinen, Pteridinen oder Porphyrinen. Während Kupfer und Cadmium vornehmlich mit SH-Gruppen reagieren (Miller et al. 1973), hat Zink eine höhere Affinität zu Carboxylgruppen (Vallee & Ulmer 1972). Diese Unterschiede im Reaktionsschema werden auch durch die vorliegenden Versuchsergebnisse bestätigt.

Das wesentliche Ergebnis dieser Versuche ist aber der Befund, daß keine Evolution spezifisch schwermetallresistenter Enzyme in schwermetalltoleranten Populationen von *Silene cucubalus* stattgefunden hat. Bei einem Vergleich mit Pflanzen anderer mineralischer Extremstandorte ergeben sich für die Angiospermen

ähnliche Resultate. So sind die Enzyme von Halophyten gegen NaCl ebenso empfindlich wie diejenigen von Glykophyten (Flowers 1972, Greenway et al. 1972, 1974, Osmond & Greenway 1972, Austenfeld 1974), wenn auch die physiologische Basis für Natriumchlorid- und Schwermetallresistenz völlig verschieden sind (Mathys 1975). So wird z.B. die Nitratreduktase schon durch  $7 \times 10^{-7}$  M Kupfer, hingegen erst durch 0.1 M NaCl in der Aktivität um 50 % vermindert. Pflanzen fluorreicher Böden Afrikas haben ebenfalls keine spezifisch fluorresistenten Enzyme (Eloff & Sydow 1971), für Selenpflanzen stehen solche Untersuchungen noch aus. Offensichtlich ist die Möglichkeit zur Entwicklung mineralresistenter Enzyme auf Bakterien und Hefen (Ashida 1965, Liebl et al. 1969) beschränkt geblieben. Die in den in-vivo-Experimenten erzielten Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Schwermetallresistenz von der Existenz intakter Zellen mit all ihren Kompartimenten abhängig ist.

Unter diesem Aspekt müssen auch die "schwermetallresistenten" ATPasen und sauren Phosphatasen in intakten Wurzeln schwermetallresistenter Populationen von *Agrostis tenuis* (Woolhouse 1969, 1970) gesehen werden. Es handelt sich in diesem Fall um das gleiche Phänomen, in dem intakte Zellen eine Resistenz der Enzyme vortäuschen, wie sie auch bei einigen Halophyten gefunden wurde (von Willert 1974, Greenway & Sims 1974). Vor allem können in der intakten Zelle Phosphate, AMP, ADP, ATP, Sulfhydryle und andere Komplexbildner (Cooper & Hill-Cottingham 1974, Singh & Bragg 1974) die Schwermetalle von der Reaktion mit den schwermetallsensitiven Strukturen der Enzyme abhalten.

Für das Verständnis der Physiologie der Schwermetallpflanzen sind solche Verbindungen von großem Interesse. So läßt sich die Förderung der Nitratreduktase in einer zinkresistenten Population unter dem Einfluß eines zinkreichen Nährmediums als Effekt kompetitiver Inhibitoren deuten. Dabei ist weniger an eine Ionenkonkurrenz für das Molybdän im NADH-NR-Komplex (für Wolfram vgl. Nutton et al. 1974) als vielmehr an einen Überschuß von Komplexoxoren mit hohen Stabilitätskonstanten zu denken, die dann bei geringer Zinkversorgung - nun als Folge des Zinkresistenzmechanismus - zu einer verminderten Aktivität führen. Die Bedeutung solcher Komplexoxoren ist vom Halophyt *Triglochin maritimum* bekannt (Greenway & Sims 1974), wo die MDH nur in Gegenwart hoher Malatkonzentrationen die Aktivität unvermindert beibehalten kann. Im Hinblick auf den Einsatz von Enzymen als Indikatoren mineralischer Stress-Situationen (Cu: Bailey & McHargue 1944; Mn: Sirkar & Amin 1974; F: Keller & Schwager 1971, Keller 1974; Pb: Flückiger 1973) muß aufgrund dieser Befunde zur Vorsicht gemahnt werden, da in allen bisher untersuchten Fällen die Möglichkeit der Evolution resistenter Ökotypen mit anderen enzymatischen Reaktionen nicht beachtet wurde.

## III. Die Evolution der Schwermetallresistenz in Gramineen nach Schwermetallbelastung

### Resultate und Diskussion

Von einigen Pflanzenarten ist bekannt, daß sie die Fähigkeit haben, binnen kurzer Zeiträume gegen bestimmte Schwermetalle resistent zu werden (Bradshaw et al. 1965, Briggs 1972, Wu & Bradshaw 1972, Edroma 1974, Gartside & McNeilly 1974). Innerhalb

Westfalens sind viele Standorte zu finden, in denen der Schwermetallgehalt unter dem Einfluß des Menschen beträchtlich zugenommen hat (vgl. Übersicht bei Ernst et al. 1974). Um die Auswirkungen dieser Schwermetallbelastungen auf die Selektion der Pflanzen beurteilen zu können, wurden mit *Agrostis tenuis* und *Agrostis stolonifera* zwei Arten untersucht, die in dem entsprechenden Gebiet sowohl auf "normalen" als auf "schwermetallbelasteten" Standorten anzutreffen sind. Auf diese Weise konnte die Differenzierung klimatischer Rassen außer Betracht bleiben.

Wie die Ergebnisse in Tab. 4a zeigen, ist für beide Arten unter dem Einfluß hoher Schwermetallkonzentrationen eine Änderung im Genom (vgl. Bröker 1963) durch Erwerb der Schwermetallresistenz eingetreten. Die Population aus der Nähe einer Zinkhütte hat binnen 3 bis 5 Jahren infolge der außerordentlich hohen Belastung (Ernst 1972) bereits eine Resistenz gegen Zink entwickelt. Eine ähnliche rasche Evolution für die Kupferresistenz ist von einer englischen Raffinerie bekannt (Wu & Bradshaw 1972). Unter geringerer Belastung, die bereits für Tiere toxisch sein kann (van Ulsen 1973), ist der Selektionsdruck für die Pflanzen infolge der Pufferleistung des Bodens nicht so stark, wie es u.a. das Beispiel der Hochspannungsleitungen (vgl. auch Kraal & Ernst 1975) oder der an organischem Material reichen Flußufer des Unterlaufes der Lippe (vgl. McNaughton et al. 1974) zeigen.

**Tab. 4a:** Index der Schwermetallresistenz in Populationen von *Agrostis tenuis* und *Agrostis canina* bei unterschiedlicher Schwermetallbelastung des Standortes im Wurzelwachstumstest n. Wilkins (1960). Der Resistenzindex ist der Quotient aus Wurzellängenzuwachs im schwermetallreichen Medium und schwermetallarmen Medium (Basisnährlösung). Höhe der Schwermetallbelastung der Standorte in Ernst et al. (1974). Zinkreich = 0.1 mM/l; kupferreich = 0.01 mM/l. Versuchsdauer: 3 Wochen.

Art und Population	Zinkresistenz- index	Kupferresistenz- index	Ursache der Belastung
<i>Agrostis tenuis</i> Sibth.			
Blankenrode	0.97	0.14	Zinkhalden (12.Jh.)
Langelsheim	0.82	0.52	Bergbau (12.Jh.)
Marsberg	0.23	1.21	Cu-Halden (12.Jh.)
Littfeld	0.77	0.25	Bergbau (18.Jh.)
Lüdinghausen	0.30	0.10	-----
Datteln	1.17	0.14	Zink-Industrie
Sauerland	0.24	0.08	Kupfer-Industrie
Ede	0.26	0.03	Hochspannung-Cu
<i>Agrostis canina</i> L.			
Littfeld	0.81	0.20	Bergbau (12.Jh.)
Witten	0.20	0.09	-----
Dortmund	0.38	0.13	Rieselfelder
Waltrop (Lippe)	0.29	0.10	Rieselfelder
Vlotho (Weser)	0.30	0.12	diverse

Diese Befunde machen deutlich, daß eine Schadbeurteilung durch Schwermetalle an Pflanzen mit Hilfe von Enzymtesten (Flückiger 1973, Keller 1974) nur bei gleichzeitiger Untersuchung der Resistenzenschaften möglich ist.

### III. Schwermetallresistenz und Stickstoffgehalt

Da die Nitratreduktase als Schlüsselenzym des Stickstoffmetabolismus in vivo unter Schwermetallzusatz im Nährmedium eine spezifische Reaktion gemäß der protoplasmatischen Resistenzenschaft der Pflanzen ergeben hat, erscheint uns eine weitere Untersuchung des N-Stoffwechsels naheliegend. Die NR ist ein Enzym, das nicht nur eine hohe Erneuerungsrate besitzt (Zielke & Filner 1971), sondern vor allem durch das Ausgangsprodukt, das Nitrat, induziert und nach der Induktion durch die Nitratkonzentration moduliert werden kann (Beevers et al. 1965, Janiesch 1973, Higgins et al. 1974). Bevor der Einfluß des Zinks auf dieses Enzym weiter getestet werden kann, ist es notwendig, die Modulation durch das Nitrat selbst zu analysieren.

Eine Erhöhung des Nitratangebotes im Nährmedium führt unmittelbar zu einer Steigerung der Enzymaktivität aller Populationen von *Silene cucubalus* (Tab. 5). Die zinkresistente Population von Blankenrode erreicht bei 10 mM Nitrat im Nährmedium ihr Optimum. Der nicht-zinkresistente Ökotyp aus einer schwach nitro- und thermophilen Saumgesellschaft in Brochterbeck erfährt dagegen noch bei 20 mM Nitrat eine Steigerung der Nitratreduktase-Aktivität, deren maximaler Wert (8.4  $\mu\text{M NO}_2/\text{h} \times \text{g Frischgewicht}$ ) doppelt so hoch ist wie derjenige der zinkresistenten Pflanzen. Hierin kann eine gewisse Anpassung an die meist stickstoffärmeren, durch den Bergbau gestörten Schwermetallböden liegen (Ernst 1974). Hinsichtlich der in den Blättern gespeicherten Nitratmengen gibt es weder ernährungs- noch populationsspezifische Unterschiede.

Tab. 5: Einfluß steigender Nitratgaben auf die Nitratreduktase (NR)-Aktivität und den Nitratgehalt (mg  $\text{NO}_3/\text{g Trocken-$ gewicht) in den Blättern einer zinkresistenten (Blankenrode) und einer nicht-schwermetallresistenten (Brochterbeck) Population von *Silene cucubalus* nach vierwöchiger Kulturdauer

NO <sub>3</sub> -Gehalt im Medium (mM/l)	NR-Aktivität ( $\mu\text{M NO}_2/\text{g xh}$ )		NO <sub>3</sub> -Gehalt	
	Blankenrode	Brochterbeck	Blankenrode	Brochterbeck
2	2.24	3.57	12.82	14.74
5	3.02	5.67	14.41	14.92
10	4.16	6.85	13.91	12.86
20	3.92	8.42	12.94	13.75

Bei gleichem Nitratgehalt in den Pflanzen führt die vermehrte Aktivität der Nitratreduktase zu einer höheren Stoffproduktion der nicht-resistenten Populationen (Tab. 6), die darum auf schwermetallarmen Böden durch bessere intraspezifische Konkurrenz die resistenten Ökotypen unterdrücken können.

**Tab. 6:** Einfluß der Nitratmengen im Nährmedium auf die Produktion an Blattmasse (g Frischgewicht/Pflanze) einer Zinkökotype (Blankenrode) und einer nicht-schwermetallresistenten Population (Brochterbeck) von *Silene cucubalus* nach vierwöchiger Kulturdauer

NO <sub>3</sub> -Gehalt im Medium (mM/l)	Produktion an Blattmasse	
	Blankenrode	Brochterbeck
2	2.0	11.7
5	2.9	14.0
10	3.5	16.7
20	3.0	18.9

Für die Untersuchung des Einflusses des Zinks auf die NR-Aktivität in vivo, wurde eine Wasserkultur bei 5 mM Nitrat und gestaffelten Zinkgaben mit einer zinkresistenten (Blankenrode), einer kupferresistenten (Marsberg) und einer nicht-schwermetallresistenten (Brochterbeck) Population von *Silene cucubalus* durchgeführt (Tab. 7). Bereits Konzentrationen von 0.2 mM Zn verursachten eine Verminderung der NR-Aktivität von 62 % resp. 67 % in den nicht-zinkresistenten Pflanzen aus Marsberg und Brochterbeck; selbst 0.1 mM Zn führt in der letztgenannten Population zu einem leichten Aktivitätsrückgang. Hingegen erreicht die NR des Zinkötyps erst bei 0.4 mM Zn seine maximale Aktivität. Erst bei 1.6 mM Zn liegt dieser Wert unter demjenigen der Zinkmangelgruppe.

**Tab. 7:** In-vivo-Aktivität der Nitratreduktase ( $\mu\text{M NO}_2/\text{g} \times \text{h}$ ) in den Blättern von unterschiedlich schwermetallresistenten Populationen von *Silene cucubalus* bei gestaffelten Zinkgaben (als ZnSO<sub>4</sub>) im Nährmedium nach 4 Wochen

Zn-Gehalt im Medium (mM/l)	NR-Aktivität		
	zinkresistent Blankenrode	kupferresistent Marsberg	nicht-resistant Brochterbeck
0.0	3.2 ± 0.2	5.2 ± 0.3	6.3 ± 0.3
0.1	3.4 ± 0.1	5.0 ± 0.3	5.1 ± 0.4
0.2	3.9 ± 0.0	2.0 ± 0.2	2.1 ± 0.5
0.4	5.5 ± 0.3	1.2 ± 0.0	0.9 ± 0.1
0.8	4.5 ± 0.4	-	-
1.6	2.6 ± 0.4	-	-

Diese Beeinträchtigung der NR-Aktivität durch höhere Zinkgaben findet sich in einer vermehrten Nitratspeicherung in den Blättern der nicht-zinkresistenten Populationen zurück. In einem Bereich bis zu 0.3 mM Zn enthalten der Zinkötyp und die nicht-zinkresistenten Pflanzen 14.4 ± 0.4 resp. 14.7 ± 1.9 mg NO<sub>3</sub>/g Trockengewicht (TG). Bei 0.6 mM Zn nimmt der Nitratgehalt infolge vermehrter NR-Aktivität im Zinkötyp auf 12.9 ± 0.1 mg NO<sub>3</sub>/g TG ab, während er in den nicht-zinkresistenten Pflanzen fast auf das Doppelte (26.2 mg NO<sub>3</sub>/g TG) ansteigt.

Die Erhöhung des Nitratgehaltes ist mit einer Verminderung vor allem der unlöslichen Proteinmengen in den nicht-zinkresistenten Populationen gekoppelt (Tab. 8), während im Zinkökotyp auch bei erhöhten Zinkgaben keine nennenswerten Konzentrationsverschiebungen festzustellen sind.

Tab. 8: Einfluß von Zink (0.6 mM Zn/l) auf den Gesamtstickstoff sowie den löslich und unlöslich gebundenen Proteinstickstoff in unterschiedlich schwermetallresistenten Populationen von *Silene cucubalus*. Alle Werte sind in mg N/g Trockengewicht angegeben

Organ	Stickstoff-Fraktion	zinkresistent		kupferresistent		nicht-resistant	
		Blankenrode	Marsberg	Blankenrode	Marsberg	Brochterbeck	0.6 mM Zn
		0.0	0.6	0.0	0.6	0.0	0.6
Blätter	Gesamt-N	53.14	49.72	40.03	45.67	47.58	54.10
	lös. Protein-N	16.00	11.20	12.23	11.84	8.99	11.52
	unlös. Protein-N	21.63	24.27	21.91	17.82	22.45	14.48
Stengel	Gesamt-N	28.74	34.21	35.70	34.89	32.95	28.93
	lös. Protein-N	11.72	7.44	7.00	6.10	6.23	6.60
	unlös. Protein-N	8.72	8.91	6.74	7.79	9.14	8.13
Wurzel	Gesamt-N	31.82	28.14	34.97	26.80	32.91	25.97
	lös. Protein-N	4.64	3.84	4.53	6.81	5.27	3.10
	unlös. Protein-N	18.92	14.71	20.81	18.92	20.37	12.24

## Diskussion

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß die nicht-zinkresistenten Populationen von *Silene cucubalus* Beeinträchtigungen im Stickstoffhaushalt bei höheren Zinkgaben im Nährmedium erfahren, die sich mindernd auf die Stoffproduktion auswirken. Dagegen ist der Zinkökotyp auf zweierlei Weise angepaßt: Die Nitratreduktase erreicht erst bei höheren Zinkkonzentrationen des Substrates ihr Optimum, ohne daß es vorher zu Störungen im Stickstoffmetabolismus infolge von Zinkmangel (Hoagland 1944) kommt. Der Stickstoffhaushalt des Zinkökotyps zeigt keine Reaktion auf die Zinkbelastung im Gegensatz zu Halophyten nach Salzstress (Noel 1968, Langlois 1969, 1971) oder aluminiumresistenten Pflanzen nach Al-Düngung (Klimaševky & Berezovsky 1973).

Für die Charakterisierung der physiologischen Basis der Schwermetallresistenz weisen die Experimente auf die Beteiligung von schwermetallkomplexbildenden Metaboliten hin. Eine Änderung des Schwefelmetabolismus, wie er in einem kupfertoleranten Stamm von *Saccharomyces* durch vermehrte Bildung von Sulphydryl und Fällung des Kupfers als Sulfid gefunden wurde (Ashida & Nakamura 1959, Ashida et al. 1963) konnte auch mit Hilfe elektronenmikroskopischen Techniken in *Silene cucubalus* nicht entdeckt werden. Die Bildung von stabilen Metalloproteinen (vgl. Ballentyne & Stevens 1951, Ballentyne 1953, Bühler & Kägi 1974) wird in der letzten Zeit auch für schwermetallresistente Organismen diskutiert (Reilly 1972 für die Labiate *Baccharis halimifolia*, Uchida et al. 1973 und Tokuyama & Asano 1974 für Bakterien). Doch haben Peterson (1969), Reilly & Reilly (1973) und Ernst (n.p.) solche Komplexe

in zinktoleranten Pflanzen vergeblich gesucht. Auch Gomah & Davies (1974) finden als aktive Liganden des Zinks weder Valin, Alanin, Methionin, Asparagin noch Glutamin. Wenn vor allem aufgrund der unterschiedlichen Stabilitätskonstanten von Zink resp. Kupfer mit Aminosäuren und Peptiden eine Diskriminierung im Protoplasten zwischen Kupfer und Zink möglich sein soll, dann müssen die Populationen unterschiedliche Mengen an Aminosäuren, vor allem Cystein und Cystin produzieren, um sie im Plasma als Komplexoren einsetzen zu können. Solche Unterschiede im Aminosäuremetabolismus kommen zwar unter Wasserstress (Barnett & Naylor 1966, Hubac & Guernier 1972, Singh et al. 1972, Chu et al. 1974) und unter Salzstress (Goas 1965, Stewart & Lee 1974) zustande, doch bleibt die Bedeutung auf die Regelung der Hydratur beschränkt und hat keinen protektiven Effekt auf die Enzyme (Stewart & Lee 1974). Aufgrund der hohen Stabilitätskonstanten von Kupferkomplexen ist die Ableitung einer spezifischen Schwermetallresistenz aber schwierig. Darum müssen noch weitere Bereiche des Stoffwechsels eine entscheidende Veränderung erfahren, wie sie z.B. in der Meeresalge *Dunaliella* realisiert sind (Borowitzka & Brown 1974), wo Glycerol in Gegenwart hoher Salinität die Aktivität der Enzyme aufrechterhält. Auch auf den positiven Einfluß hoher Malatkonzentrationen auf die Aktivität der MDH unter Salzstress (Greenway & Sims 1974) sei hier noch einmal erinnert.

#### IV. Schwermetallresistenz und organische Säuren

Einer der Wege der Bildung schwermetallreicher Verbindungen ist die Metabolisierung der Schwermetalle durch den Einbau in spezifisch mineralreiche Verbindungen, wie sie in Pflanzen fluorreicher oder chromreicher Böden in Form von Fluorazetat resp. Trioxalatchromat (Peters 1954, de Oliveira 1963, Preuss et al. 1970, Lyon et al. 1969a,b) vorkommen. Dabei schaffen im Hinblick auf die schwermetallspezifischen Resistenzeigenschaften die sehr unterschiedlichen Stabilitätskonstanten für diverse Metallo-Organverbindungen (Chem. Soc. 1964) sehr günstige Ausgangsbedingungen.

##### 1. Resultate

###### a) Allgemeine Säurespektren der untersuchten Arten

Die gaschromatografische Analyse organischer Säuren in den Organen unterschiedlich schwermetallresistenter Populationen von *Silene cucubalus*, *Silene nutans*, *Agrostis tenuis* und *Thlaspi alpestre* hat innerhalb der Arten keine qualitativen, wohl aber quantitative Unterschiede ergeben (Abb. 8). Wie nach den Befunden von Nierhaus (1970), Nierhaus & Kinzel (1971) und Lew (1974) zu erwarten, sind die Oxalsäure in *Silene nutans*, die Apfelsäure in *Agrostis tenuis* und beide Säuren in *Silene cucubalus* die dominierenden organischen Säuren.

Da die Oxalsäure in Gegenwart von viel Calcium in das unlösliche Calciumsalz überführt wird, soll zunächst einmal der Säurespiegel von *Silene cucubalus* aus einer calciumarmen Torferdekuultur verglichen werden (Tab. 9). Die kupferresistente Population von Marsberg enthält unter diesen Bedingungen fast dreimal soviel Oxalsäure wie die zinkresistente Population von Blankenrode und viermal soviel wie die nicht-resistente Population von

Brochterbeck. Gleichzeitig ist der Gehalt an Apfelsäure in der zinkresistenten Population auffallend höher als in den nicht-zinkresistenten Pflanzen.

Tab. 9: Gehalt an wasserlöslichen organischen Säuren in Blättern und Wurzeln von drei Populationen von *Silene cucubalus* nach achtwöchiger Kultur in einer calciumarmen Torferde. Alle Werte in  $\mu\text{M/g}$  Frischgewicht

organische Säure	Organ	zinkresistent Blankenrode	kupferresistent Marsberg	nicht-resistant Brochterbeck
Oxalsäure	Blatt	22.24	63.50	14.60
	Wurzel	1.44	2.27	1.07
Apfelsäure	Blatt	11.25	1.94	4.70
	Wurzel	1.06	0.63	0.76
Bernsteinsäure	Blatt	0.22	0.17	0.26
	Wurzel	0.01	0.01	0.01
Malonsäure	Blatt	0.29	1.71	0.63

Bevor der Einfluß der Schwermetalle auf den Metabolismus der organischen Säuren untersucht werden kann, ist noch der für diese meist von kalkreichen Böden stammenden Populationen wichtige Einfluß eines calciumreichen Substrates auf das Säuremuster festzustellen. Denn Kinzel (1963) hat in allen Caryophyllaceen auf Silikatboden freie Oxalsäure gefunden, auf Kalkboden hingegen nur in wenigen Gattungen. Unsere Ergebnisse (Tab. 10) können diese Resultate für alle Populationen von *Silene cucubalus* bestätigen. Insgesamt wird in einem kalkreichen Medium der Gehalt an freier Oxalsäure in den Pflanzen stark reduziert, doch bleibt auch hier noch das populationsspezifische Muster bestehen. Diese substratbedingte Veränderung trifft auch auf die Apfelsäure und Malonsäure, hingegen nicht für die Bernstein- und Fumarsäure zu.

Tab. 10: Gehalt an wasserlöslichen organischen Säuren in den Blättern von fünf Populationen von *Silene cucubalus* mit unterschiedlicher Schwermetallresistenz nach achtwöchiger Kultur in einem calciumreichen Sand. Alle Werte in  $\mu\text{M/g}$  Frischgewicht von Blättern des 5. bis 10. Wirtels.

Organische Säure	zinkresistent Blankenrode	Cu-resistant Marsberg	Zn-Cu-resistant Langelsheim	nicht-resistant Brochter- beck	St. Leon- hard
Oxalsäure	5.56	6.62	14.10	4.69	1.28
Apfelsäure	6.27	3.09	1.10	4.19	1.40
Bernstein- säure	0.19	0.12	0.10	0.25	0.35
Malonsäure	0.28	0.09	0.23	0.23	0.30
Fumarsäure	0.05	0.06	0.01	0.05	0.01

Weiterhin ist zu beachten, daß ähnlich wie bei der Schwermetallaufnahme (Ernst 1974) erhebliche Altersgradienten an organischen Säuren auftreten können (Commanay & Cavalié 1968). Diese altersabhängige Anreicherung resp. Verarmung an organischen Säuren ist in den untersuchten Populationen von *Silene cucubalus* besonders deutlich für das Malat und das Oxalat ausgeprägt (Tab. 11), indem die ältesten Blätter die höchsten Konzentrationen an Oxal- und Apfelsäure sowie auch an Malonsäure aufweisen. Aufgrund des für die diversen Analysen notwendigen Materials sind in allen weiteren Untersuchungen immer das 5. bis 10. voll entfaltete Blattpaar verwandt worden.

Tab. 11: Oxalsäure-, Apfelsäure- und Malonsäuregehalt in unterschiedlich alten Blattpaaren von *Silene cucubalus*, Population Blankenrode, nach vierwöchiger Wasserkultur. Alle Werte in  $\mu\text{M}$  Säure/g Frischgewicht

Blattpaar	Oxalsäure	Apfelsäure	Malonsäure
unentfaltete Blätter	13.65	0.27	0.003
2. und 3. Blattpaar	30.30	2.00	0.010
4. bis 6. Blattpaar	31.40	2.44	0.050
7. bis 10. Blattpaar	55.00	7.08	0.098
11. bis 13. Blattpaar	73.00	9.22	0.105
Sproß-Stiel	3.30	1.82	0.010
Wurzel	1.97	1.48	0.005

### b) Säuremetabolismus unter Zinkeinfluß

Aufgrund der populationsspezifischen Säuremuster muß nun die Frage geklärt werden, ob zwischen der Schwermetallresistenz und dem Säuremuster eine Relation besteht. Der Einfluß des Zinks auf den Malathaushalt von *Silene cucubalus*-Populationen sind in Tab. 12 zusammengestellt. Unter Zinkeinfluß wird der Malatpegel in den Wurzeln aller Populationen nur unwesentlich verändert. In Sproß und in den Blättern sind hingegen populationsspezifische Relationen zu erkennen. Unter Zinkstreuß vermindert sich der Malatgehalt in der nicht-schwermetallresistenten Population um 33.1 bis 50.8 %, in dem Zinkökotyp um 7.9 bis maximal 18.7 %. In der kupferresistenten Population steigt er dagegen um das 1,27- bis 2,44-fache an. Die Konzentration dieser organischen Säure in den Stielen nimmt unter Zinkeinfluß in den Populationen Brochterbeck und Marsberg schwach ab und verdoppelt sich nahezu im Zinkökotyp.

Es bleibt zu klären, inwieweit die hohe und ziemlich konstant bleibende Malatkonzentration ein typisches Symptom für die Zinkresistenz ist. Dazu wurde ein Vergleich mit anderen Pflanzenarten durchgeführt, wobei wiederum die zinkresistenten Populationen von *Agrostis tenuis* (Provenienzen Blankenrode und Datteln) und von *Thlaspi alpestre* (Provenienz Silberberg) deutlich höhere Malatpegel aufwiesen als die nicht-resistenten Pflanzen (Tab. 13).

Tab. 12: Malatgehalt ( $\mu\text{M}/\text{g}$  Frischgewicht) nach enzymatischer Bestimmung in Blättern, Sproß-Stielen und Wurzeln einer zink-, einer kupfer- und einer nicht-schwermetallresistenten Population von *Silene cucubalus* mit (0.4 mM  $\text{ZnSO}_4/1$ ) und ohne Zink (0.0) in der Nährlösung nach vierwöchiger Kulturdauer

Organ	Zink im Medium (mM/1)	zinkresistent Blankenrode	kupferresistent Marsberg	nicht-resistant Brochterbeck
Blatt	0.0	9.78 $\pm$ 0.48	1.60 $\pm$ 0.33	2.18 $\pm$ 0.32
	0.4	8.05 $\pm$ 0.60	2.77 $\pm$ 0.32	1.33 $\pm$ 0.10
Sproß-Stiel	0.0	3.52 $\pm$ 0.21	1.50 $\pm$ 0.19	0.95 $\pm$ 0.13
	0.4	6.84 $\pm$ 0.40	1.27 $\pm$ 0.22	0.86 $\pm$ 0.04
Wurzel	0.0	1.14 $\pm$ 0.21	0.76 $\pm$ 0.03	0.99 $\pm$ 0.14
	0.4	1.21 $\pm$ 0.14	0.90 $\pm$ 0.14	0.82 $\pm$ 0.10

Tab. 13: Gehalt an wasserlöslichen organischen Säuren nach gas-chromatografischer Bestimmung in den Blättern unterschiedlich schwermetallresistenter Populationen von *Agrostis tenuis* und *Thlaspi alpestre*. Alle Werte in  $\mu\text{M}/\text{g}$  Frischgewicht

Art und Population	Oxalat	Malat	Citrat
<i>Agrostis tenuis</i>			
nicht-resistant (Ede/NL)	-	0.89 $\pm$ 0.13	0.30 $\pm$ 0.05
kupfer-resistant (Marsberg)	-	1.07 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.04
zinkresistent (Blankenrode)	-	1.65 $\pm$ 0.11	0.34 $\pm$ 0.01
zinkresistent (Datteln)	-	1.72 $\pm$ 0.15	0.20 $\pm$ 0.01
<i>Thlaspi alpestre</i>			
nicht-resistant (Jura)	0.74 $\pm$ 0.07	1.90 $\pm$ 0.05	2.07 $\pm$ 0.20
zinkresistent (Silberberg)	1.25 $\pm$ 0.09	12.84 $\pm$ 0.14	2.31 $\pm$ 0.17

### c) Säuremetabolismus unter Kupfereinfluß

Wegen der höheren Toxizität des Kupfers wurde der Einfluß dieses Elementes auf den Stoffwechsel der organischen Säuren unter etwas anderen Bedingungen untersucht. Die erste Analyse wurde bereits eine Woche nach Schwermetallzusatz ausgeführt (Tab. 14). Nach Kupferzusatz im Nährmedium (0.1 mM Cu/1) bleibt ebenso wie in der Zinkreihe der Gehalt an Apfelsäure im Zinkökotyp nur gering (-11 %) herabgesetzt, der Oxalsäuregehalt ändert sich in den nicht-resistanten und in zinkresistenten Pflanzen nicht. Anders reagiert der Kupferökotyp Marsberg, indem der Malatgehalt um 56 %, der Oxalsäuregehalt um 33 % und der Citronensäuregehalt um 82 % fällt. Bezuglich des Citronensäuregehaltes reagieren alle Ökotypen mit einer Abnahme.

**Tab. 14:** Gehalt an organischen Säuren in den Blättern einer zink-, einer kupfer- und von zwei nicht-schwermetallresistenten Populationen von *Silene cucubalus* mit Kupfer (0.1 mM/l) und ohne Kupfer (0.0) in der Nährlösung nach einwöchiger Kulturdauer. Untersucht sind nur die ausdifferenzierten Blätter. Alle Werte in  $\mu\text{M/g}$  Frischgewicht des wässrigen Extraktes. Bestimmungsmethode: Gaschromatographie

Organische Säure	Cu-Gehalt im Medium (mM/l)	zinkresistent Blankenrode	Cu-resistent Marsberg	nicht-schwermetallresistent Brochterbeck	St. Leonhard
Oxalsäure	0.0	25.30	40.15	30.87	32.22
	0.1	25.20	26.76	31.14	32.09
Apfelsäure	0.0	1.21	1.46	0.54	0.33
	0.1	1.07	0.64	0.49	0.48
Citronensäure	0.0	0.63	0.77	0.96	0.73
	0.1	0.33	0.14	0.31	0.59

Nach dreiwöchiger Kulturdauer in einer 0.1 mM kupferhaltigen Nährlösung wiesen die nicht-kupferresistenten Pflanzen deutliche Chlorosen auf, wie sie auch von Zink- und Mangantoxität bekannt sind. Im Vergleich zu den Pflanzen nach einwöchigem Kupferstress war der Gehalt an organischen Säuren erheblich verändert (Tab. 15). Die Oxalsäuremenge (wasserlöslich) war in allen Populationen infolge vermehrter Cu-Oxalatbildung stark vermindert. Eine Korrelation mit der Kupferresistenz war nicht mehr festzustellen. Der Gehalt an Apfelsäure hatte sich in der Kontrollreihe in den Populationen Marsberg, Brochterbeck und St. Leonhard auf Werte zwischen 1.36 und 2.28  $\mu\text{M/g}$  Frischgewicht eingestellt. Lediglich im zinkresistenten Ökotyp ist - wie bereits aus den Zinkreihen bekannt - der Malatgehalt um das Vierfache höher als in den anderen Populationen. Unter Kupfereinfluss nahm die Konzentration dieser organischen Säure in den Populationen Blankenrode und Brochterbeck um ca. 44 % gegenüber der Kontrollreihe zu, im alpinen Ökotyp und im Zinkökotyp um 51 % resp. 8 % ab. Für die Citronensäure wurde mit Ausnahme des Zinkökotyps keine Zunahme nach dreiwöchiger Kulturdauer gefunden; unter Kupferstress war ihre Konzentration im Zinkökotyp unverändert, in den anderen Populationen um ca. 15 bis 20 % vermindert. In allen Fällen war im Gegensatz zum Verhalten der zinkresistenten Populationen im zinkreichen Medium unter Kupfereinfluss keine eindeutige Relation zwischen der Kupferresistenz-eigenschaft und Veränderungen im Säurehaushalt festzustellen; das gilt auch für die in der Tab. 15 nicht enthaltenen *cis*-Aconit-,  $\alpha$ -Ketoglutar-, Fumar- und Bernsteinsäure.

Um diese unterschiedliche Reaktion des Säurestoffwechsels auf Zink- und Kupferbelastung noch besser beurteilen zu können, wurden die Untersuchungen auf eine weitere Pflanzenart ausgedehnt, nämlich auf *Silene nutans* mit einer kupferresistenten Population von Thalitter und einer nicht-schwermetallresistenten Population von St. Leonhard. Das Grundmuster der Säuren ist gegenüber *Silene cucubalus* insofern geändert, als die Citronensäure stets in

Tab. 15: Gehalt an organischen Säuren in den Blättern unterschiedlich schwermetallresistenter Populationen von *Silene cucubalus* bei verschiedenem Kupfergehalt der Nährlösung nach dreiwöchiger Kulturdauer. Alle Werte in  $\mu\text{M/g}$  Frischgewicht nach wäßriger Extraktion. Bestimmungsmethode: Gaschromatographie

Organische Säure	Cu-Gehalt im Medium (mM/l)	Zn-resistent Blankenrode	Cu-resistent Marsberg	nicht-schwermetallresistent Brochterbeck	St. Leonhard
Oxalsäure	0.0	5.76	8.32	8.20	7.68
	0.1	5.12	11.52	8.32	8.35
Apfelsäure	0.0	8.37	1.93	1.35	1.95
	0.1	7.68	2.28	1.94	0.96
Citronensäure	0.0	1.92	0.80	0.73	1.04
	0.1	1.93	0.61	0.64	0.83

höheren Mengen vertreten ist und damit Parallelen zu den Befunden von Lew (1974) an *Silene otites* aufweist (Tab. 16). Nach Zusatz von Kupfer (0.1 mM/l) wird der Oxalsäuregehalt im Kupferökotyp wiederum deutlich vermindert (67 % in den Blättern, 53 % in den Wurzeln), während es in der Normalform in den Blättern schwach und in den Wurzeln mit 60 % erheblich ansteigt. Das Verhalten des Kupferökotyps von *Silene nutans* ist damit vergleichbar mit demjenigen von *Silene cucubalus* aus Marsberg, jeweils nach einwöchiger Stresssituation. Unabhängig von der Resistenz-eigenschaft nimmt der Malatgehalt in beiden Populationen unter Kupfereinfluß ab. Die Citratkonzentration bleibt im Kupferökotyp nahezu unverändert, während sie in der nicht-kupferresistenten Population in den Blättern um das 2.7-fache erhöht und in den Wurzeln um das 2.3-fache erniedrigt wird. Aufgrund der unterschiedlichen Anteile beider Organe an der Stoffproduktion ergibt sich eine deutliche Erhöhung im Citronensäuregehalt im nicht-schwermetallresistenten Ökotyp.

Nach dreiwöchiger Kulturdauer waren auch in *Silene otites* die bereits aus der *Silene cucubalus*-Kultur bekannten Veränderungen im Säurepegel vorhanden. Die wasserlösliche Oxalsäure nimmt in Blättern und Wurzeln stark ab (Tab. 16), ohne einen populations-spezifischen Effekt nach Kupferstress feststellen zu können. Die Malatmenge ist in den Blättern des nicht-kupferresistenten Ökotyps um 64 % vermindert, im Kupferökotyp hingegen unverändert, während die Wurzeln beider Populationen unter Kupferdüngung eine Zunahme im Malatgehalt zeigen.

## 2. Diskussion

Die Resultate der gaschromatografischen bzw. enzymatischen Bestimmung einiger organischer Säuren haben neben der bekannten entwicklungsbedingten Zunahme des Malats (Commanay & Cavalié 1968) eine Differenzierung auf Populationsebene erbracht, wie sie in viel geringerem Umfang bisher allein bei Varietäten von *Phaseolus vulgaris* (Caillian-Commanay & Cavalié 1973) beobachtet

**Tab. 16:** Gehalt an wasserlöslichen organischen Säuren in Blättern und Wurzeln einer kupferresistenten (Thalitter) und einer nicht-schwermetallresistenten (St. Leonhard) Population von *Silene nutans* bei unterschiedlichem Kupfergehalt der Nährlösung nach ein- resp. dreiwöchiger Kulturdauer. Alle Werte in  $\mu\text{M/g}$  Frischgewicht. Bestimmungsmethode: Gaschromatographie

Organische Säure	Cu-Gehalt im Medium (mM/l)	Blatt		Wurzel	
		St. Leonhard	Thalitter	St. Leonhard	Thalitter
1 Woche Kulturdauer					
Oxalsäure	0.0	26.80	136.20	3.31	9.80
	0.1	29.35	45.10	5.34	4.60
Apfelsäure	0.0	0.95	0.65	0.38	0.40
	0.1	0.24	0.02	0.20	0.02
Citronensäure	0.0	1.10	2.70	3.50	4.40
	0.1	3.00	3.00	1.50	4.50
3 Wochen Kulturdauer					
Oxalsäure	0.0	10.04	12.80	0.13	0.08
	0.1	10.31	12.87	0.15	0.09
Apfelsäure	0.0	4.80	1.28	1.27	0.48
	0.1	1.62	1.33	2.01	0.63
Citronensäure	0.0	4.01	2.63	0.18	0.83
	0.1	2.27	1.81	0.21	0.19

wurde. Die nicht-resistente Population von St. Leonhard - *Silene cucubalus* und *Silene nutans* - verhält sich nach Kupferzusatz genau wie Kartoffeln nach einer Kupferblattdüngung (Skripchenko & Nikonova 1973), indem sie mit einem Anstieg im Oxal- und Citronensäuregehalt der Blätter reagiert. Die anderen Populationen beider Arten, vor allem die Kupfer- und Zinkökotypen, zeigen nach Kupfer- und Zinkdüngung einen anderen Verlauf der organischen Säuren. Die oft betonte Korrelation zwischen Malatgehalt der Pflanzen und dem Gehalt mehrwertiger Ionen im Milieu (Torii & Laties 1966, Lüttge 1973) ist aus diesen Untersuchungen nicht abzuleiten. Der konstante Gehalt an organischen Säuren in den Wurzeln trotz erhöhter Ionenaufnahme spricht ebenso gegen die von Lüttge (1973) herausgestellte metabolische Kontrolle der Ionenbeziehungen in den Pflanzen wie die von der Ionenaufnahme unabhängige populationsspezifische Veränderung der organischen Säuren in den Blättern und Sprossen.

Um die Bedeutung der organischen Säuren als mögliche Komplexoren für Zink und Kupfer abschätzen zu können, muß zunächst eine Beziehung zum Schwermetallgehalt der Zellen hergestellt werden. Die höchste Translokation von beiden Elementen findet in den Blättern statt, wo ungünstigstenfalls 90 % des Gesamtzink- und Kupfergehaltes im Plasma und in der Vakuole lokalisiert sind. Es bedeutet, daß in *Silene cucubalus* maximal 12.5  $\mu\text{M/g}$

Frischgewicht zu komplexieren sind. Für Kupfer, das mit den untersuchten organischen Säuren stabilere Komplexe bildet als das Zink (Sillen & Martell 1964), wäre diese Komplexierung in allen Populationen möglich. Doch zeigt die hohe Spezifität der Schwermetallresistenz und die großen Unterschiede im protoplasmatischen Resistenztest der untersuchten *Silene cucubalus* und *Silene nutans* Populationen, daß die gefundenen Unterschiede in den organischen Säuren auf andere Weise zu interpretieren sind.

Zunächst ist als sehr auffälliges Merkmal der hohe Malatpegel der zinkresistenten Populationen von *Silene cucubalus*, *Agrostis tenuis* und *Thlaspi alpestre* zu beachten, der sich unter Zinkeinfluß nur unwesentlich ändert, während die anderen nicht-zinkresistenten Populationen eine völlig andere Reaktion zeigen. Der Aufbau dieses höheren Malatpegels ist unter Umständen für die Zinkresistenz das entscheidende Symptom, da diese organische Säure, wie für Salzstreß gezeigt (Greenway & Sims 1974), eine Schutzfunktion ausübt. Der Abbau des Malatpegels in den nicht-resistenten Populationen kann mit einer erhöhten Aktivität der Peroxidases dieser Ökotypen gekoppelt sein, da dieses Phänomen auch von der Mangantoxität nicht-manganresistenter Pflanzen bekannt ist (Sirkar & Amin 1974). Gleichzeitig nimmt unter Zinkstreß in den nicht-zinkresistenten Populationen die Aktivität der ICDH ab, so daß zumindest über den Citronensäurezyklus weniger Malat angeliefert werden kann. Die Aufrechterhaltung des hohen Malatpegels, durch den auch überflutungstolerante Pflanzen gekennzeichnet sind (Crawford 1966, Crawford & Tyler 1969), ist im Gegensatz zur Hypothese von Crawford (1972) nicht an das Fehlen des Malatenzyms gebunden (Davies et al. 1974), das auch in den diversen Populationen von *Silene cucubalus* ausreichend vorhanden ist. Inwieweit hier noch andere Stoffwechselbereiche für den hohen Malatpegel verantwortlich sind, wird noch untersucht, zumal Baumeister (1954) sowie Baumeister & Burghardt (1956) keine Unterschiede in der Atmungsintensität von *Silene cucubalus*-Pflanzen mit verschiedener Schwermetallresistenz gefunden haben. Ferner muß darauf hingewiesen werden, daß solche Resistenzmechanismen sehr artspezifisch sein können. So finden Gomah & Davies (1974) für *Hordeum sativum* Aminosäuren als Zinkliganden, während in *Vaccinium myrtillus* es Catechin resp. Ellagsäure sind. Unter Einfluß eines hohen Wasserstandes akkumuliert *Iris pseudacorus* Shikimisäure, während andere überflutungstolerante Pflanzen unter denselben Bedingungen Apfelsäure anreichern (Tyler & Crawford 1970, Crawford & Tyler 1969).

Im Gegensatz zur Bedeutung des Malats für die zinkresistenten Pflanzen zeigen die bisher untersuchten Kupferökotypen ein völlig anderes Verhalten. In kupferresistenten Pflanzen von *Silene cucubalus* und *Silene nutans* sind nach länger andauerndem Kupferstreß keine mit der Kupferresistenz korrelierbaren Veränderungen im Säurepegel festzustellen. Die anfängliche Veränderung im Oxalsäuregehalt ließe an die Bildung von Cu-Ocalat denken. Doch steht die aufgenommene Cu-Menge in keiner Beziehung zur Verminderung des Oxalsäuregehaltes. Im Gegensatz zur Bildung von Trioxalchromatkomplexen in chromreichen Pflanzen von *Leptospermum scoparium* (Lyon et al. 1969a,b) konnte in den *Silene*-Populationen kein Cu-Oxalat nachgewiesen werden. Doch sind auch noch andere Aspekte des Kohlenstoffmetabolismus möglich. So bilden Gräser, in denen allerdings echt vergleichende Untersuchungen noch fehlen, im Kupferbergaugebiet von Armenien unter Einfluß erhöhter Kupferkonzentrationen des Bodens vermehrt Cellulose (Della-Rossa et al. 1973), mit Mangan behandelter *Rumex tianschanicus* Catechol

und Flavone (Pershukova & Levanidov 1973). Damit sind weitere Ansatzpunkte für die Aufklärung der physiologischen Grundlagen der spezifischen Schwermetallresistenz gelegt, die in der Umsteuerung des C-Metabolismus wohl ihre Ursachen haben.

#### Danksagung

Wir danken Frau T.F. Lugtenborg für die gute technische Assistenz bei der Gaschromatographie und Herrn G.W.H. van den Berg, Biol. Lab., Vrije Universiteit, für die Ausführung der Zeichnungen.

#### Zusammenfassung

Es wird über Untersuchungen zu den physiologischen Grundlagen der Schwermetallresistenz berichtet, und zwar an *Silene cucubalus*, *Silene nutans*, *Agrostis tenuis* und *Thlaspi alpestre*.

Der Resistenzmechanismus basiert nicht auf der Evolution schwermetallresistenter Enzyme (Nitratreduktase, Isocitrat-, Malat- und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase), wie in-vitro-Experimente mit diesen Enzymen an *Silene cucubalus*-Populationen gezeigt haben. Schwermetall- und nicht-schwermetallresistente Populationen dieser Art besitzen dieselbe Sensibilität der Enzyme gegenüber Zink, Kupfer, Kadmium, Kobalt, Nickel und Mangan. Kupfer und Kadmium beeinträchtigen die Enzymaktivität am stärksten; die Nitratreduktase ist das empfindlichste der untersuchten Enzyme.

In-vivo-Untersuchungen hingegen erbrachten in Relation zur Schwermetalleigenschaft der Populationen bemerkenswerte Unterschiede in der Enzymaktivität. Während die Nitratreduktase der nicht-zinkresistenten Populationen durch Zink nahezu inaktiviert und die Isocitratdehydrogenase in der Aktivität erheblich reduziert werden, erreicht die NR der zinkresistenten Population unter Zinkeinfluß die höchste Aktivität. Als Folge der veränderten Aktivität der NR kommt es zu erheblichen Verschiebungen im Nitratgehalt und in den löslichen Proteinen.

Im Hinblick auf die organischen Säuren zeichnen sich zinkresistente Populationen von *Silene cucubalus*, *Agrostis tenuis* und *Thlaspi alpestre* durch hohe Malatgehalte aus, die sich auch unter Zinkstress nur unwesentlich ändern. Kupferresistente Populationen von *Silene cucubalus* und *Silene nutans* unterscheiden sich hingegen nicht in den Säuren des Tricarbonsäurezyklus. Die Bedeutung dieser organischen Säuren für die Schwermetallresistenz wird diskutiert.

Darüber hinaus wird in *Agrostis tenuis* und *Agrostis canina* in Abhängigkeit von der Schwermetallbelastung eine rasche Evolution zinkresistenter Populationen beobachtet, die die Beurteilung von Schwermetallbelastungen mit Hilfe von Enzymtesten erleichtern.

## Literaturverzeichnis

- Ashida, J. (1965), Adaptation of fungi to metal toxicants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 3, 153-174.
- Ashida, J., N. Higashi & T. Kikuchi (1963), An electromicroscopic study on copper precipitation by copper-resistant yeast cells. *Protoplasma* 57, 27-32.
- Ashida, J. & H. Nakamura (1959), Role of sulfur metabolism in copper resistance of yeast. *Plant Cell Physiol. (Tokyo)* 1, 71-79.
- Austenfeld, F.A. (1974), Der Einfluß des NaCl und anderer Alkalosalze auf die Nitratreduktaseaktivität von *Salicornia europaea* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 71, 288-296.
- Balks, R. & I. Reekers (1955), Bestimmung des Nitrat- und Ammoniumstickstoffs im Boden. *Landw. Forschung* 8, 7-13.
- Ballentine, R. (1953), The biosynthesis of stable cobalto-proteins by plants. II. Interaction of iron and cobalt metabolism in *Neurospora crassa*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 42, 415-426.
- Ballentine, R. & D.G. Stevens (1951), The biosynthesis of stable cobalto-proteins by plants. *J. Cell. Comp. Physiol.* 37, 369-388.
- Bailey, L.F. & J.S. McHargue (1944), Effect of boron, copper, manganese and zinc on the enzyme activity of tomato and alfalfa plants. *Plant Physiol.* 13, 105-116.
- Barnett, N.M. & A.W. Naylor (1966), Amino-acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. *Plant Physiol.* 41, 1222-1230.
- Baumeister, W. (1954), Über den Einfluß des Zinks bei *Silene inflata* Sm. I. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 67, 205-213.
- Baumeister, W. & H. Burghardt (1956), Über den Einfluß des Zinks bei *Silene inflata* Sm. II.  $\text{CO}_2$ -Assimilation und Pigmentgehalt. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 69, 161-168.
- Beevers, L., L.E. Schrader, D. Flesher & R.H. Hageman (1965), The role of light and nitrate in the induction of nitrate reductase in radish cotyledons and maize seedlings. *Plant Physiol.* 40, 691-698.
- Bergmeyer, H.U. (1970), Methoden der enzymatischen Analyse. 2. Aufl. Verlag Chemie, Weinheim.
- Borowitzka, L.J. & A.D. Brown (1974), Salt relations of marine and halophilic species of the micellar green algae, *Dunaliella*. Role of glycerol as a compatible solute. *Arch. Mikrobiol.* 96, 37-52.
- Bradshaw, A.D., T.S. McNeilly & R.P.G. Gregory (1965), Industrialization, evolution, and the development of heavy metal tolerance in plants. *Ecology and the Industrial Society*, 5th Brit. Ecol. Soc. Symp., Oxford, 327-343.
- Brewer, G. (1970), An Introduction to Isozyme Techniques. Academic Press, London.
- Briggs, D. (1972), Population differentiation in *Marchantia polymorpha* L. in various lead pollution levels. *Nature (Lond.)* 238, 166-167.
- Bühler, R.H.O. & J.H.R. Kägi (1974), Human hepatic metallothionein. *FEBS Letters* 39, 229-234.
- Caillian-Commanay, L. & G. Cavalié (1973), Les acides organiques non volatils de *Phaseolus vulgaris* L.: différences variétales et modifications dues au parasitisme. *C.R. Acad. Sci. Paris* 277 D, 1989-1992.
- Cooper, D.R. & D.G. Hill-Cottingham (1974), Glutamic dehydrogenase and glutamic-oxaloacetic transaminase in apple tree tissues. *Physiol. Plant.* 31, 193-199.
- Chu, T.M., D. Aspinall & L.G. Paleg (1974), Stress Metabolism. VI. Temperature stress and the accumulation of proline in barley and radish. *Aust. J. Plant Physiol.* 1, 87-97.

- Commanay, L. & G. Cavalié (1968), Les acides organiques non volatils de *Phasellus vulgaris*: évolution de leur teneur dans les divers organes de la plante au cours des premiers stades de développement. C.R. Acad. Sci. Paris 266 D, 109-112.
- Crawford, R.M.M. (1966), The control of anaerobic respiration as a determining factor in the distribution of the genus *Senecio*. J. Ecol. 54, 403-413.
- Crawford, R.M.M. (1972), Some metabolic aspects of Ecology. Trans. Bot. Soc. Edinb. 41, 309-322.
- Crawford, R.M.M. & P.D. Tyler (1969), Organic acid metabolism in relation to flooding tolerance in roots. J. Ecol. 57, 237-246.
- Davies, D.D., K.H. Nascimento & K.D. Patil (1974), The distribution and properties of NADP malic enzyme in flowering plants. Phytochem. 13, 2417-2425.
- Della-Rossa, R.G., V.M. Gulannyan, L.F. Markaryan (1973), Effect of high copper and molybdenum concentrations on the chemical composition of natural feeds. Tr. Stavrop. Skh. Inst. 3 (36), 164-168.
- De Oliveira, M.M. (1963), Chromatographic isolation of monofluoro-acetic acid from *Palicourea marcgravii* Hil. Experientia 19, 586.
- Edroma, E.L. (1974), Copper pollution in Rwenzori National Park, Uganda. J. appl. Ecol. 11, 1043-1056.
- Eloff, J.N. & B. von Sydow (1971), Experiments on the fluoroacetate metabolism of *Dichapetalum cymosum* (Gifblaar). Phytochem. 10, 1409-1415.
- Ernst, W. (1968), Der Einfluß der Phosphatversorgung sowie die Wirkung von ionogenem und chelatisiertem Zink auf die Zink- und Phosphataufnahme einiger Schwermetallpflanzen. Physiol. Plant. 21, 323-333.
- Ernst, W. (1969), Zur Physiologie der Schwermetallpflanzen-Subzelluläre Speicherungsorte des Zinks. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 82, 161-164.
- Ernst, W. (1972a), Schwermetallresistenz und Mineralstoffhaushalt. Forschungsber. Land. Nordrhein-Westfalen 2251, 1-38, Opladen.
- Ernst, W. (1972b), Ecophysiological studies on heavy metal plants in South Central Africa. Kirkia 8, 125-145.
- Ernst, W. (1972c), Zink- und Cadmium-Immissionen auf Böden und Pflanzen in der Umgebung einer Zinkhütte. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 85, 295-300.
- Ernst, W. (1974), Schwermetallvegetation der Erde. Geobotanica Selecta Vol. 5. G. Fischer Verl., Stuttgart.
- Ernst, W. (1975), Mechanismen der Schwermetallresistenz. Verhandl. Ökol. Ges. Erlangen 1974, 187-196.
- Ernst, W., W. Mathys, J. Salaske & P. Janiesch (1974), Aspekte von Schwermetallbelastungen in Westfalen. Abhandl. Landesmuseum Naturkunde Münster Westfalen 36 (2), 1-31.
- Flowers, T.J. (1972), The effect of sodium chloride on enzyme activities from four halophyte species of Chenopodiaceae. Phytochem. 11, 1881-1886.
- Flückiger, W. (1973), Der Einfluß aufgesprühter Bleilösungen auf physiologische Prozesse bei *Ricinus communis*. Diss. Univ. Basel.
- Gartside, D.W. & T. McNeilly (1974), The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants. II. Copper tolerance in normal populations of different plant species. Heredity 32, 335-348.
- Goas, Marie (1965), Contribution à l'étude du métabolisme azoté des halophytes. Acides aminés et amides libres des jeunes plantes de *Suaeda macrocarpa* Moq., récoltées dans leur station naturelle. C.R. Acad. Paris 261, 2724-2726.
- Gomah, A.M. & R.I. Davies (1974), Identification of the active ligands chelating Zn in some plant water extracts. Plant Soil 40, 1-19.
- Greenway, H. & C.B. Osmond (1972), Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. Plant Physiol. 49, 256-259.
- Greenway, A.M. & A.P. Sims (1974), Effects of high concentrations of KCl and NaCl on responses of malate dehydrogenase (decarboxylating) to malate and various inhibitors. Aust. J. Plant Physiol. 1, 15-29.
- Gries, B. (1966), Zellphysiologische Untersuchungen über die Zinkresistenz bei Galmeiformen und Normalformen von *Silene cucubalus* Wib. Flora B 156, 271-290.
- Higgins, T.J.V., P.B. Goodwin & D.J. Carr (1974). The induction of nitrate reductase in mung bean seedlings. Aust. J. Plant Physiol. 1, 1-18.

- Hoagland, D. (1944), Lectures on the inorganic nutrition of plants. Chro-nica Bot. (Waltham, Mass.).
- Horio, T., T. Higashi & K. Okunuki (1955), Copper resistance of *Mycobacterium tuberculosis avium*. II. The influence of copper ion on the precipitation of the parent cells and copper-resistant cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 42, 491-498.
- Hubac, C., D. Guerrier & J. Ferren (1969), Résistance à la sécheresse du *Carex pachystylis* (J. Gay) plante du désert du Negev. *Oscol. Plant* 4, 325-346.
- Janiesch, P. (1973), Beitrag zur Physiologie der Nitrophyten. Nitratspeicherung und Nitratassimilation bei *Anthriscus sylvestris* Hoffm. *Flora* 162, 479-491.
- Keller, Th. (1974), The use of peroxidase activity for monitoring and mapping air pollution areas. *Eur. J. Forest Pathol.* 4, 11-19.
- Keller, Th. & H. Schwager (1971), Der Nachweis unsichtbarer ("physiologischer") Fluor-Immissionsschädigungen an Waldbäumen durch eine einfache kolorimetrische Bestimmung der Peroxidase-Aktivität. *Eur. J. Forest Pathol.* 1, 6-18.
- Kinzel, H. (1963), Zellsaftanalysen zum pflanzlichen Calcium- und Säurestoffwechsel und zum Problem der Kalk- und Silikatpflanzen. *Protoplasma* 57, 522-555.
- Kinzel, H. & H. Stummerer (1974), Enzymaktivitäts-Muster als Indikatoren für den physiologischen Zustand von Pflanzen unter Mineralstoff-Mangel. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 86, 505-512.
- Klimashevskii, E.L. & K.K. Berezovskii (1973), Genotypic specificity of plant tolerance to ion toxicity in root zones. *Pr. Inst. Sadow., Skieriewice, Ser. E* 3, 473-496.
- Kornberg, A. & W.E. Pricer jr. (1951), Di- and triphosphopyridine nucleotide isocitric dehydrogenase in yeast. *J. Biol. Chem.* 189, 123-136.
- Kraal, H. & W. Ernst (1975), Influence of copper high tension lines on plants and soils. *Environm. Pollution* (in press).
- Langlois, J. (1969), Action du rythme d'immersion sur la protéogenèse chez la *Salicornia stricta* Dumort. *C.R. Acad. Sci. Paris* 269 D, 2351-2354.
- Langlois, J. (1971), Influence du rythme d'immersion sur la croissance et le métabolisme protéique de *Salicornia stricta* Dumort. *Oecol. Plant.* 6, 227-245.
- Lew, H. (1974), Vergleichend physiologische Untersuchungen an oxalathaltigen Pflanzen. *Diss. Univ. Wien*, Bd. 109, 125 pp. Wien.
- Liebl, V., J.G. Kaplan & J.D. Kushner (1969), Regulation of a salt dependent enzyme: the aspartate transcarbamylase of an extreme halophile. *Can. J. Biochem.* 47, 1095-1097.
- Longo, G.P. & J.G. Scandalios (1969), Nuclear gene control of mitochondrial malic dehydrogenase in maize. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 62, 104-111.
- Lüttge, U. (1973), *Stofftransport in Pflanzen*. Springer Verl. Berlin, Heidelberg, 280 pp.
- Lyon, G.L., P.J. Peterson & R.R. Brooks (1969), Chromium-51 distribution in tissues and extracts of *Leptospermum scoparium*. *Planta (Berl.)* 88, 282-287.
- Lyon, G.L. (1969b), Chromium transport in the xylem sap of *Leptospermum scoparium* (Manuka). *New Zeal. J. Sci.* 12, 541-545.
- Mathys, W. (1973), Vergleichende Untersuchungen der Zinkaufnahme von resistenten und sensitiven Populationen von *Agrostis tenuis* Sibth. *Flora* 162, 492-499.
- Mathys, W. (1975), Enzymes of heavy-metal-resistant and non-resistant populations of *Silene cucubalus* and their interaction with some heavy metals in vitro and in vivo. *Physiol. Plant.* 33, 161-165.
- Maurer, H.R. (1971), *Disc Eletrophoresis*. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- McNair Scott, D.B. & S.S. Cohen (1953), The oxidative pathway of carbohydrate metabolism in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 55, 23-33.
- Mensen de Silva, R (1971), Analysis of Krebs cycle and related acids in Guinea pig tissues by gas-liquid chromatography. *Anal. Chem.* 43, 1031-1035.

- McNaughton, S.C., T.C. Folsom, T. Lee, F. Park, C. Price, D. Roeder, J. Schmitz & C. Stockwell (1974), Heavy metal tolerance in *Typha latifolia* without the evolution of tolerant races. *Ecology* 55, 1163-1165.
- Merz, W. (1970), Neuer Automat zur Stickstoffanalyse. *G-I-T-Fachzeitschrift für das Laboratorium* 6 (1970) 617-625.
- Miller, R.J., J.E. Bittell & D.E. Koeppe (1973), The effect of cadmium on electron and energy transfer reactions in corn mitochondria. *Physiol. Plant* 28, 166-171.
- Murayama, T. (1961), Studies on the metabolic pattern of yeast with reference to its copper resistance. *Mem. Ehime Univ. II B* 4, 43-66.
- Nierhaus, D.B. (1970), Vergleichende Untersuchungen über die organischen Säuren in Zellsäften von Angiospermen. *Diss. Univ. Wien*.
- Nierhaus, D. & H. Kinzel (1971), Vergleichende Untersuchungen über die organischen Säuren in Blättern höherer Pflanzen. *Z. Pflanzenphysiol.* 64, 107-123.
- Noel, M.C. (1968), Contribution au métabolisme azoté et glucidique chez *Salicornia stricta* Dumort. *Thèse de spécialité Caen*, 143 pp.
- Northrop, D.B. & W.W. Cleland (1970), The kinetics of metal ion activators for TPN-isocitrate dehydrogenase. *Federation Proc.* 29, 408.
- Notton, B.A., L. Graf, E.J. Hewitt & R.C. Povey (1974), The role of molybdenum in the synthesis of nitrate reductase in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) and spinach (*Spinacea oleracea*). *Biochem. Biophys. Acta* E 52, 45-58.
- Osmond, C.B. & H. Greenway (1972), Salt responses of carboxylating enzymes from species differing in salt tolerances. *Plant Physiol. (Lancaster)* 49, 260-263.
- O'Sullivan, S.A. & R.T. Wedding (1972), Malate dehydrogenase isoenzymes from cotton leaves: Molecular weights. *Plant Physiol.* 49, 117-123.
- Pershukova, A.M. & L. Ya. Levanidov (1973), Effects of manganese trace element fertilizers on the composition of polyphenolic compounds of *Rumex tianschanicus*. *Usp. Izuch. Lek. Rast. Sib., Mater. Mezhvuz. Nauk. Konf.* 1973, 93-94.
- Peterson, P.J. (1969), The distribution of zinc-65 in *Agrostis stolonigera* L. and *A. tenuis* Sibth. tissues. *J. exp. Bot.* 20, 863-875.
- Peters, R.A. (1954), Der Chemismus einer altbekannten Vergiftung: Die Synthese zum Gift. *Endeavour* 13, 147-154.
- Preuss, P.W., L. Colavito & L.H. Weinstein (1970), The synthesis of mono-fluoroacetic acid by a tissue culture of *Acacia georginae*. *Experientia* 26, 1059-1060.
- Reilly, C. (1972), Amino acids and amino acid copper complexes in water-soluble extracts of copper-tolerant and non-tolerant *Baccharis homblei*. *Z. Pflanzenphysiol.* 66, 294-296.
- Reilly, A. & C. Reilly (1973), Zinc, lead, and copper tolerance in the grass *Stereochlaena cameronii* (Stapf). *Clayton. New Phytol.* 72, 1041-1046.
- Rocha, V. & J.P. Ting (1970), Tissue distribution of microbody, mitochondrial and soluble malate dehydrogenase isoenzymes. *Plant Physiol.* 46, 754-756.
- Rüther, F. (1967), Vergleichende physiologische Untersuchungen über die Resistenz von Schwermetallpflanzen. *Protoplasma* 64, 400-425.
- Sillen, L.G. & A.E. Martell (1964), Stability constants of metal ion complexes. *Chem. Soc. London* 754 pp.
- Singh, A.P. & P.D. Bragg (1974), Inhibition of energization of *Salmonella typhimurium* membrane by zinc ions. *FEBS Letters* 40, 200-202.
- Singh, T.N., L.G. Paleg & D. Aspinell (1973), Stress metabolism. I. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. *Aust. J. biol. Sci.* 26, 45-56.
- Sirkar, S. & J.V. Amin (1974), The manganese toxicity of cotton. *Plant Physiol.* 54, 539-543.
- Skripchenko, A.F. & N.S. Nikonova (1973), Effect of copper on the content of organic acids in potato plants at excessive soil moisture under the conditions of the Maritime Territory. *Uch. Zap. Dal'nevost. Gos. Univ. (USSR)* 61, 105-111.

- Staples, R.C. & M.A. Stahmann (1963), Malate dehydrogenase in the rusted bean leaf. *Science* 140, 1320-1321.
- Stewart, G.R. & J.A. Lee (1974), The role of prolin accumulation in halophyte *Planta* (Berl.) 120, 279-289.
- Tokuyama, T. & K. Asano (1974), Copper ion resistant bacteria II. Distribution of copper in the cells of *Pseudomonas* species No. 20A. *Nihon Daigaku Nojuigakubu Gakujatsu Kenkyu Hokoku* 31, 203-213.
- Torii, K. & G.G. Laties (1966), Organic acid synthesis in response to excess cation absorption in vacuolate and non-vacuolate sections of corn and barley roots. *Plant Cell Physiol.* 7, 395-403.
- Turner, R.G. (1970), The subcellular distribution of zinc and copper within the roots of metal tolerant clones of *Agrostis tenuis* Sibth. *New Phytol.* 69, 725-731.
- Tyler, P.D. & R.M.M. Crawford (1970), The role of shikimic acid in waterlogged roots and thizomes of *Iris pseudacorus*. *J. exp. Bot.* 21, 677-682.
- Uchida, Y., A. Saito, H. Kaziwara & N. Enomoto (1973), Cadmium-resistant microorganism. I. Isolation of cadmium-resistant bacteria and the uptake of cadmium by the organism. *Saga Daigaku Nogaku Iho* 35, 15-24.
- Ulsen, F.W. van (1972), Schapen, varkens en koper. *Tijdschr. Diergeneesk.* 97 735-738.
- Vallee, B.L. & D.D. Ulmer (1972), Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Ann. Review Biochem.* 41, 91-128.
- Vennesland, B., M.C. Gollub & J.F. Speck (1949), The carboxylases of plants.I. Some properties of exaloacetic carboxylase and its quantitative assay. *J. Biol. Chem.* 178, 301-314.
- Wakiuchi, N., H. Matsumoto & E. Takahashi (1971), Changes of some enzyme properties of cucumber during ammonium toxicity. *Physiol. Plant.* 24, 248-253.
- Willert, D.J. von (1974), Der Einfluß von NaCl auf die Atmung und Aktivität der Malatdehydrogenase bei einigen Halophyten und Glykophyten. *Oecologie* (Berl.) 14, 127-137.
- Woolhouse, H.W. (1970), Environment and enzyme evolution in plants. *Phytochem. Phylogeny, Proc. Phytochem. Soc. Symp.* 1969, 207-231. London, New York.
- Wu, L., & A.D. Bradshaw (1972), Aerial pollution and the rapid evolution of copper tolerance. *Nature* (Lond.) 238, 167-169.
- Zielke, H.R. & P. Filner (1971), Synthesis and turnover of nitrate reductase induced by nitrate in cultured tobacco cells. *J. Biol. Chem.* 246, 1772-1779.

## Abbildungen

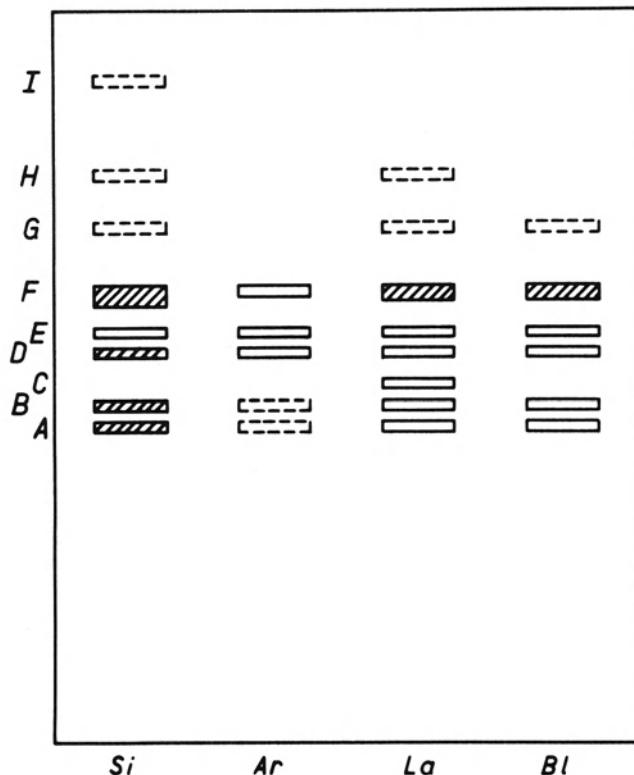


Abb. 1: Isoenzymmuster der Malatdehydrogenase aus ungekeimten Samen von unterschiedlich schwermetallresistenten Populationen von *Silene cucubalus*. Si, Bl = zinkresistente Pflanzen von Blankenrode (Bl) und vom Silberberg (Si). La = kupfer- und zinkresistente Pflanzen von Langelsheim, Ar = nicht-schwermetallresistente Population vom Mt Aravis

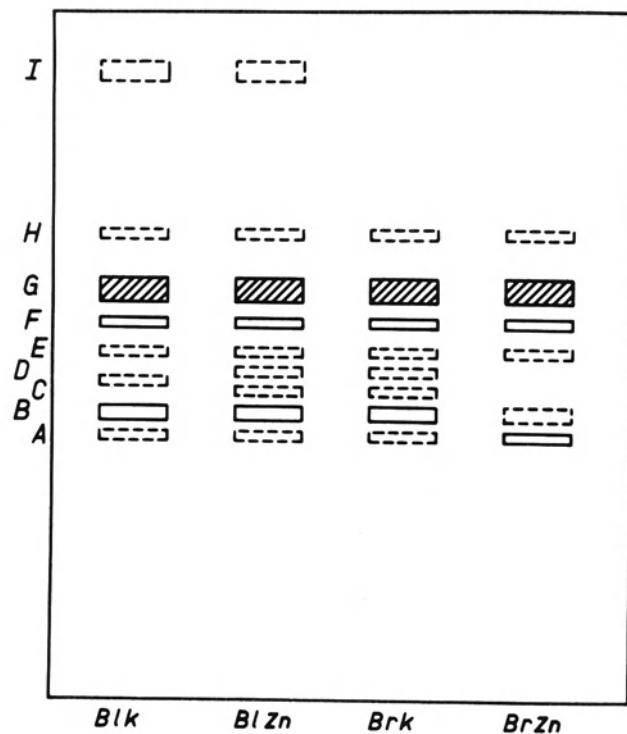


Abb. 2: Isoenzymmuster der Malatdehydrogenase aus gleichalten Blättern zinkresistenter Pflanzen von Blankenrode (Bl) und nicht-schwermetallresistenter Pflanzen von Brochterbeck (Br) aus einer Kultur ohne Zink (K) und mit Zink (Zn)

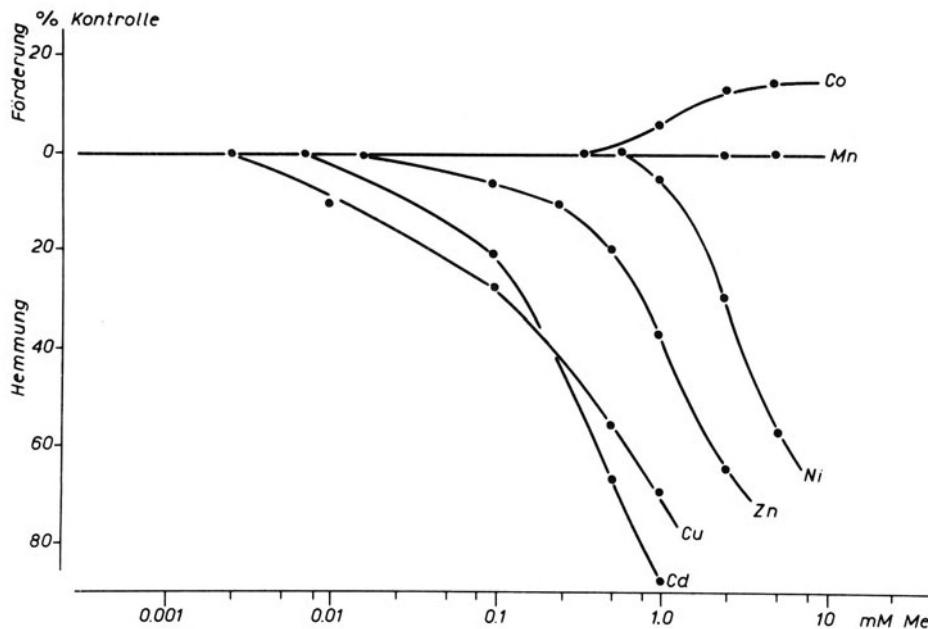


Abb. 3: Der Einfluß verschiedener Schwermetalle, die erst im Inkubationsmedium zugefügt wurden, auf die Aktivität der Malatdehydrogenase aus Blättern einer zinkresistenten Population von *Silene cucubalus*.  $0 = 3050 \mu\text{M}$  Oxalacetat je Stunde und g Frischgewicht

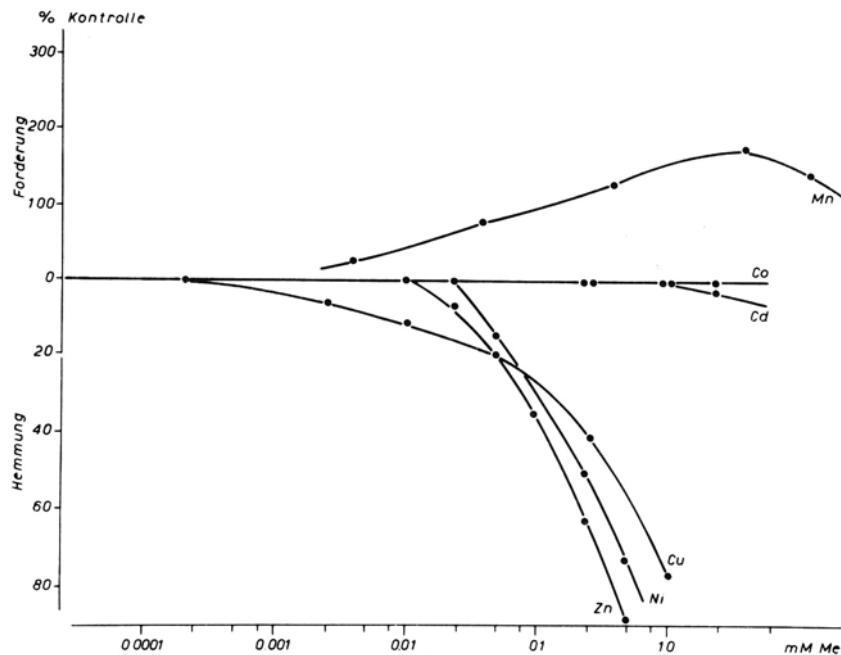


Abb. 4: Der Einfluß verschiedener Schwermetalle im Inkubationsmedium auf die Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase aus Blättern einer zinkresistenten Population von *Silene cucubalus*. Bezugsbasis  $0 = 16.3 \mu\text{M}$  Isocitrat/h x g

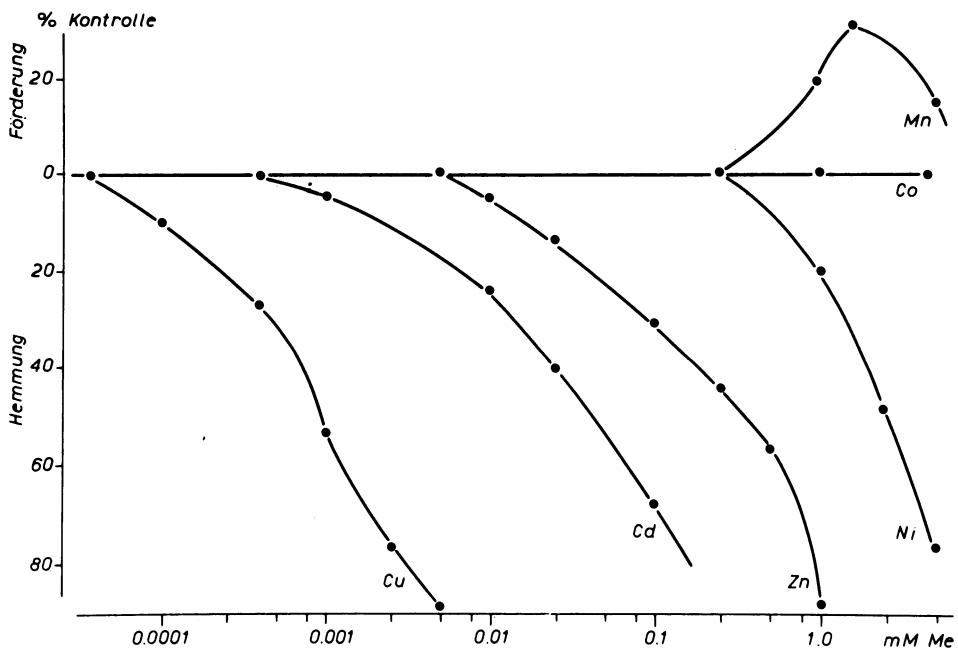


Abb. 5: Der Einfluß verschiedener Schwermetalle im Inkubationsmedium auf die Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus Blättern einer zinkresistenten Population von *Silene cucubalus*. Bezugsbasis 0 = 19.9  $\mu\text{M}$  Glucose-6-Phosphat/h  $\times$  g Frischgewicht

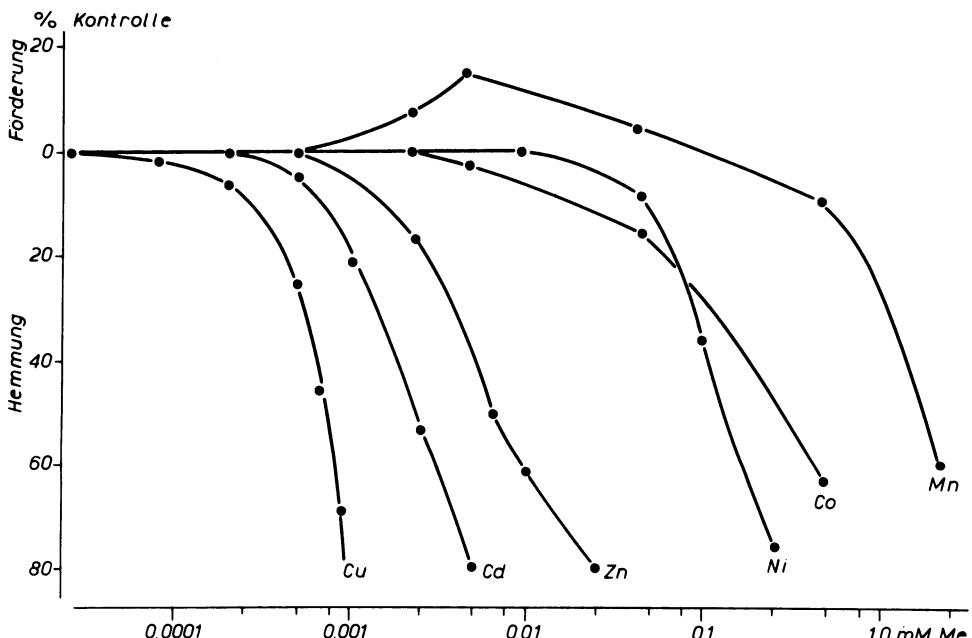


Abb. 6: Der Einfluß verschiedener Schwermetalle im Inkubationsmedium auf die Aktivität der Nitratreduktase aus Blättern einer zinkresistenten Population von *Silene cucubalus*. Bezugsbasis 0 = 2.8  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2$ /g  $\times$  h

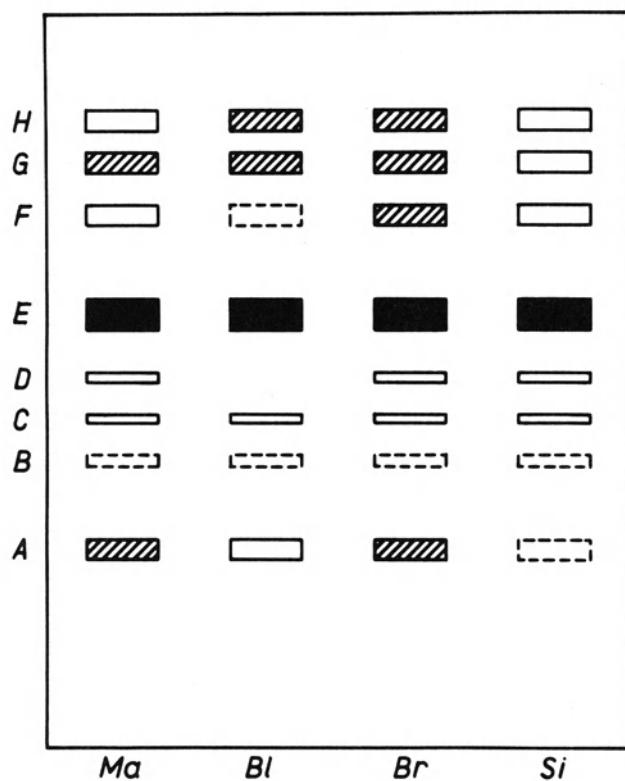


Abb. 7: Zymogramm der Proteine aus ungekeimten Samen von unterschiedlich schwermetallresistenten Populationen von *Silene cucubalus*. Ma = kupferresistente Pflanzen von Marsberg; Bl, Si = zinkresistente Pflanzen von Blankenrode und vom Silberberg bei Osnabrück; Br = nicht-schwermetallresistente Pflanze von Brochterbeck

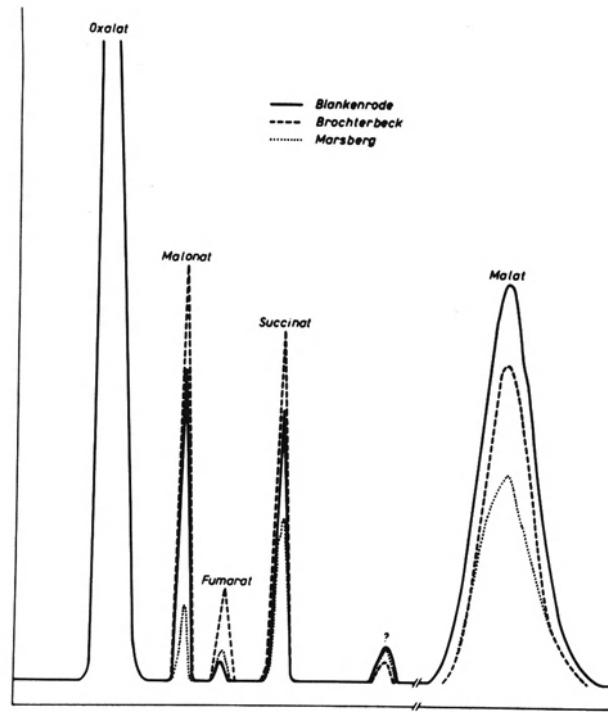


Abb. 8: Gaschromatogramm der wasserlöslichen organischen Säuren in den Blättern von *Silene cucubalus* mit unterschiedlicher Schwermetallresistenz