



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Das Moos *Physcomitrella patens* unter UV-Stress“

Verfasserin

Ruplitsch Barbara

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt.  
Studienblatt:

A 444

Studienrichtung lt.  
Studienblatt:

Diplomstudium Ökologie

Betreuerin / Betreuer:

Prof. Dr. Irene K. Lichtscheidl



## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei den besten Eltern der Welt bedanken: ohne eure Unterstützung, Geduld und Hilfe in jeder Lage wäre all das nicht möglich gewesen! Danke!

Prof. Dr. Irene K. Lichtscheidl danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas und ihrer unerschütterlichen Geduld, auch wenn sie immer wieder das Gleiche zum Lesen bekam.

Für die Unterstützung bei allen Versuchen und für die Beantwortung all meiner Fragen geht ein großes Dankeschön an Mag. Dr. Ingeborg Lang.

Weiters danke ich Ass.-Prof. Dr. Franz Hadacek für seine Hilfe mit der HPLC, und Dr. Robert Kartusch dafür, mir seine UV-Apparatur überlassen zu haben.

Für die finanzielle Unterstützung der Diplomarbeit und des Kongresses in Wageningen danke ich dem „Verein zur Förderung der Pflanzenwissenschaften“.

Für die moralische Unterstützung und Hilfe möchte ich all den netten Kollegen der Abteilung danken, vor allem Stefan W., ohne den ich die ersten Wochen schon nicht überstanden hätte, und Stefan S., ohne den es nie HPLC-Ergebnisse gegeben hätte.

All meinen lieben Freunden- Lea, Fan, Luiza, um nur einige zu nennen- die mich in all den Krisen immer an das Ziel erinnert und mich durch schöne Abende von meinem Elend abgelenkt haben, widme ich an dieser Stelle ein großes DANKESCHÖN!!

Lieber Flo: danke für ALLES, du bist der Beste- und danke dass du all meine diplomarbeiterischen Launen aushalten konntest!! Das wird der beste Urlaub überhaupt!



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Strahlung.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.1 Sonnenstrahlung .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.2 UV-Strahlung.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.3 Ozon/Ozonloch .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 Licht und Leben.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3 Schäden durch UV-Strahlung.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.1 Reparaturprozesse .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Stressbedingte Anpassungen.....</b>	<b>21</b>
<b>1.5 Moose und UV-Strahlung.....</b>	<b>23</b>
<b>1.6 Auswirkungen auf das Ökosystem .....</b>	<b>24</b>
<b>1.7 Ziel dieser Diplomarbeit.....</b>	<b>26</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Versuchspflanze.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1.1 <i>P. patens</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1.2 Kultivierung.....</b>	<b>28</b>
<b>2.1.3 UV- Bestrahlung von <i>P. patens</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Mikroskopie .....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.1 UV- Mikroskopie.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.2 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>34</b>
<b>2.3 Färbungen.....</b>	<b>34</b>
<b>2.3.1 DAPI-Färbung.....</b>	<b>34</b>
<b>2.3.2 Färbung mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT).....</b>	<b>36</b>
<b>2.3.3 Aktinfärbung mit Alexa-Phalloidin .....</b>	<b>38</b>
<b>2.4 Latrunculin-B .....</b>	<b>39</b>
<b>2.5 High Pressure Liquide Chromotography (HPLC) .....</b>	<b>40</b>
<b>2.5.1 Moosproben Vorbereitung .....</b>	<b>41</b>
<b>2.5.2 Säulenvorbereitung .....</b>	<b>41</b>

2.5.3 Ethanolphase .....	42
2.6 Bildbearbeitung .....	43
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
3.1 UV- Bestrahlung von <i>P. patens</i> .....	44
3.1.1 Versuche .....	44
3.1.1.1 Vorversuche .....	44
3.1.1.2 Versuch I.....	47
3.1.1.3 Versuch II.....	51
3.2 Zellenvermessungen.....	52
3.3 Färbungen.....	54
3.3.1 DAPI-Färbung.....	54
3.3.2 NBT-Färbung.....	56
3.3.2.1 <i>P. patens</i> .....	56
3.4 UV-Mikroskopie .....	57
3.4.1 Behandlung mit dem Toxin Latrunculin-B.....	62
3.4.2 Alexa-Phalloidin Färbung.....	63
3.5 High Pressure Liquide Chromotography (HPLC) .....	65
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>67</b>
4.1 UV-Bestrahlung von <i>P. patens</i> .....	68
4.1.1 Wachstumsversuche.....	68
4.2 Morphologie der Zellen .....	71
4.3 Physiologische Reaktionen auf UV- Stress .....	74
4.4 Das Cytoplasma und seine Organellen .....	76
4.5 HPLC .....	78
<b>5 Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>	<b>81</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>83</b>

## Abkürzungsverzeichnis

CaCl <sub>2</sub>	.....Calciumchlorid
CHS	.....Chalcone Synthase
CLSM	.....Confocal Laser Scanning Microscope
CPD	.....Cyclobutan Pyrimidin Dimers
DAPI	.....4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DMSO	.....Dimethyl Sulfoxide
EGTA	.....Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ER	.....Endoplasmatisches Reticulum
HPLC	.....High Pressure Liquide Chromotography
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	.....Kaliumdihydrogenphosphat
IR	.....Infrarot Strahlung
MgSO <sub>4</sub>	.....Magnesiumsulfat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	.....Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	.....Dinatriumhydrogenphosphat
NBT	.....Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	.....Ammoniumnitrat
NP-40	.....Tergitol NP-40, ein Nonylphenolethoxylat
O <sub>3</sub>	.....Ozon
PAL	.....Phenylalanin Ammonium Lyase
PAR	.....Photosynthetic Active Radiation
PBS	.....Phosphate Buffered Saline
PIPES	.....Piperazine-N,N'-bis(2-Ethanesulfonic Acid
ROS	.....Reactive Oxygen Species
UV	.....Ultraviolette Strahlung



## Zusammenfassung

Das Moos *Physcomitrella patens* ist ein Modellorganismus der Pflanzenwissenschaften, 2008 wurde das gesamte Genom sequenziert. Die Forschung auf den Gebieten des Salz-, Kälte-, Trocken- und Schwermetallstress sowie zellbiologische Versuche hinken aber bis heute den genetischen Erkenntnissen hinterher. Diese Diplomarbeit soll daher die Auswirkungen von UV-Strahlung auf die Cytomorphologie dieses Mooses aufzeigen.

Die Moospflänzchen wurden als Sterilkulturen auf Agarplatten gezogen und wuchsen für vier Wochen unter konstanten Licht- und Temperaturverhältnissen (14 h Tag, 10 h Nacht; 25°C). Zusätzlich wurden sie mit UV-B (290-315 nm, Lichtintensität:  $48 \mu\text{Ms}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) bestrahlt, um den Effekt eines Ozonlochs zu simulieren. Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen wurden untersucht. Dafür wurde ein spezielles UV-Mikroskop verwendet, sowie weitere lichtmikroskopische Analysetechniken.

Nach vierwöchiger Bestrahlung konnte man einen deutlichen morphologischen Effekt erkennen, die älteren und jüngere Pflänzchen verhalten sich im Wachstum unterschiedlich. Bei den älteren Pflanzen kommt es zu erhöhter Produktion von Biomasse und Protonema. Im Gegensatz dazu werden die jüngeren Pflanzen im Wachstum gehemmt und die bestrahlten Proben bilden kaum Biomasse und Protonema.

Außerdem wurden die Proben mittels HPLC auf Anreicherung möglicher zusätzlichen sekundären Inhaltsstoffe getestet.

Trotz der besseren Auflösung des speziellen UV-Mikroskops waren Unterschiede der bestrahlten Pflanzen im Vergleich mit der unbestrahlten Kontrolle kaum zu erkennen. Ergebnisse durch weitere zellbiologische Versuche deuten allerdings auf einen Einfluss der UV-Strahlung auf Chloroplasten, endoplasmatisches Retikulum und auf Aktinmikrofilamente hin.



## **Abstract**

As a model organism in plant science, the moss *Physcomitrella patens* is an important species to investigate different types of stress and their influence on cellular processes and molecular pathways. In the last years most studies focused on genetic experiments and less attention was paid on environmental stress factors like temperature, drought and heavy metal stress, especially also in regard of cellbiological experiments. This diploma thesis shows the effects of supplemental UV-radiation on this moss.

*P. patens* gametophytes were cultivated on sterile petri dishes under constant light and temperature conditions (290-315 nm, 14 h light / 10 h dark cycles; 25°C). The plantlets were exposed to supplemental artificial UV-radiation (light intensity: 48  $\mu\text{Ms}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) for four weeks to evaluate the physiological responses of potential ozone depletion. Differences between radiated and control plants were investigated. A special UV-microscope and other lightmicroscopy methods were used. Changes on the morphological and the cellular level were documented with a specific UV microscope and other light microscopic methods.

After four weeks of UV-B treatment, morphological effects were detected. Differences in growth could be observed in older and younger samples. The older plants produced more biomass and protonemata. In contrast, the exposure of juvenile stages of *P. patens* to supplemental UV-B resulted in a different reaction: we observed growth inhibition and nearly no protonemata were produced.

HPLC experiments were performed to investigate the potential increase of secondary metabolites, for example benzoic acid.

In spite of the better resolution of the UV-microscope the interpretation of the investigated cells was difficult, only minimal differences could be detected between the control and the UV-radiated cells. Further experiments of this thesis however indicate some effects of radiation on the chloroplasts, the endoplasmatic reticulum and the actinmicrofilaments.



# 1 Einleitung

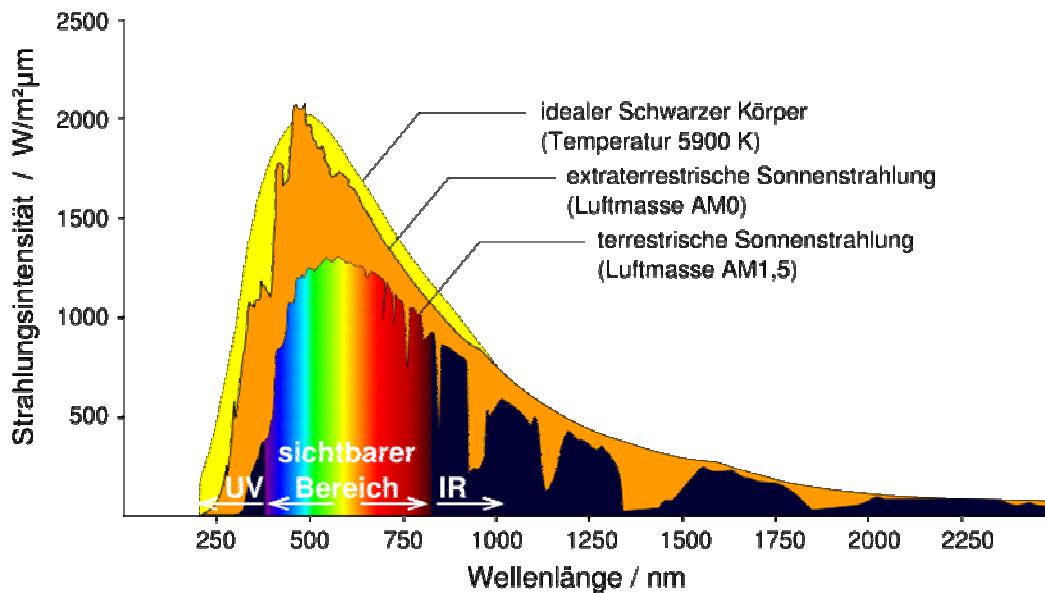
## 1.1 Strahlung

### 1.1.1 Sonnenstrahlung

Als Sonnenstrahlung bezeichnet man jene Strahlung, die von der Sonne ausgesendet wird. Sie ist ein essentieller Bestandteil des Lebens; die Sonnenenergie, auch Solarenergie genannt, ist die von der Sonne durch Kernfusion erzeugte Energie, die in Teilen als elektromagnetische Strahlung die Erde erreicht. Viele Prozesse auf der Erde, wie zum Beispiel das Klima und das Leben selbst, sind von der Strahlungsenergie der Sonne abhängig.

Die elektromagnetische Strahlung der Sonne weist eine Doppelnatur auf, das bedeutet, sie kann als Welle aber auch als Teilchenstrom, der aus Quanten besteht, definiert werden (Sitte 2002).

Die Gesamtheit der Sonnenstrahlung, die die Erdoberfläche tatsächlich erreicht, nennt man Globalstrahlung. Diese deckt ein Spektrum von 290 bis 2300 nm ab, reicht also vom ultravioletten (UV) bis zum infraroten (IR) Bereich. Ein großer Teil der Strahlung besteht aus der mit menschlichem Auge sichtbaren Strahlung, die weitgehend der photosynthetisch aktiven Strahlung (PAR) im Wellenbereich von 400 bis 700 nm entspricht. Darunter liegt das Spektrum der UV-Strahlung; man unterscheidet zwischen UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) und UV-C (100-280 nm). Über 780 nm liegt die Infrarotstrahlung (IR). Die langwelligen Infrarotstrahlen, die über 2300 nm liegen, werden durch Kohlendioxid, Wasser und Wasserdampf absorbiert, die Wellenlängen, die unter 290 nm liegen, werden zur Gänze durch den Sauerstoff und das Ozon der Stratosphäre absorbiert (Sitte *et al.* 2002; Tevini & Häder 1985).

Abb.1.: Spektrum der Sonne<sup>1</sup>

Der Großteil des gesamten Energiebeitrags zum Erdklima stammt von der Sonne. Von der ursprünglichen Sonnenenergie geht einiges durch Absorption der Atmosphäre oder durch Streuung und Reflektion an den Wolken verloren (Tevini & Häder 1985). Außerdem spielt auch die Sonnenhöhe bei der Intensität der einfallenden Strahlung auf der Erdoberfläche eine wichtige Rolle: erstens, weil mit abnehmender Sonnenhöhe die Länge des Weges der Strahlung durch die Atmosphäre zunimmt; dadurch ist die Absorptions- und Streuungsrate erhöht. Zweitens wird mit flacherer Sonne die Strahlung auf eine relativ größere Fläche projiziert und damit die Strahlungsflussdichte reduziert (Köpke *et al.* 2004).

An einem schönen, wolkenlosen Tag mit einer Sonnenhöhe von 90° erreichen 23% der UV-B Strahlung, 72% der UV-A Strahlung und 91% der sichtbaren Strahlung die Erde (Tevini & Häder 1985).

<sup>1</sup>[http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Sonne\\_Strahlungsintensitaet.svg&filetimestamp=20100509202305](http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Sonne_Strahlungsintensitaet.svg&filetimestamp=20100509202305)

### 1.1.2 UV-Strahlung

1801 entdeckte der deutsche Physiker Johann Wilhelm Ritter an der Universität von Jena die Ultraviolette Strahlung (UV). Er fand heraus, dass unsichtbare Strahlen effektiver Silberchloridpapier schwärzen können als sichtbares Licht. Zunächst nannte er diese Art von Strahlung „deoxidierende Strahlung“, wegen ihrer chemischen Wirkung, aber auch, um sie von Infrarotstrahlung zu unterscheiden. Bis ins 19. Jahrhundert war sie dann als chemische Strahlung bekannt, heutzutage wird nur noch der Name „ultraviolette Strahlung“ benutzt (Hockberger 2002).

1865 stellte James Clerk Maxwell die Theorie auf, dass Licht und Klang Teil des gleichen Spektrums sind, ein Energiespektrum mit ähnlichen Eigenschaften wie von Wellen. Er nannte sie „elektromagnetische Wellen“, weil er glaubte, dass sie durch eine Interaktion zwischen dem elektrischen und magnetischen Feld erzeugt werden. 1882 wurde Maxwell's Theorie von dem deutschen Physiker Heinrich Rudolf Hertz bestätigt (nach Hockberger 2002).

Ultraviolette Strahlen gehören also zum Spektrum der elektromagnetischen Strahlung, und wie jede elektromagnetische Strahlung können sie als Welle oder als Teilchen beschrieben werden (Schulze & Kiefer 1977). Durch die hohe Energie der einzelnen Photonen, die umgekehrt proportional zur Wellenlänge der Strahlung ansteigt, kann es zu biologischen und photochemischen Auswirkungen kommen (Köpke *et al.* 2004).

Das UV-Spektrum liegt zwischen 100 nm und 400 nm Wellenlänge. Die kürzeste UV-Strahlung, so genannte UV-C Strahlung (100-280 nm), wird komplett von der in ca. 22 bis 25 km Höhe gelegenen Ozonschicht ( $O_3$ ) der Atmosphäre absorbiert (Sitte *et al.* 2002). UV-B Strahlung (280-315 nm) wird noch teilweise, aber nicht mehr ganz von der Ozonschicht abgefangen, und UV-A (315-400 nm) trifft beinahe ungehindert auf der Erdoberfläche auf (Madronich 1995).

### 1.1.3 Ozon/Ozonloch

Das Wort Ozon stammt von dem griechischen Wort "οζεῖν" und bedeutet „riechen“. Das Ozonmolekül besteht aus drei Sauerstoffatomen und ist gewinkelt gebaut. Es ist ein instabiles blaues Gas mit stechendem Geruch (Keppler & Ding 1997).

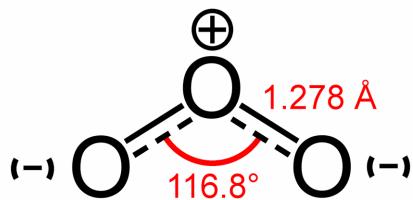


Abb.2.: chemische Struktur von Ozon ( $O_3$ ) <sup>2</sup>

Ozon zerfällt unter Freisetzung von Energie leicht zu  $O_2$  (molekularer Sauerstoff) und O (atomarem Sauerstoff). Atomarer Sauerstoff ist noch reaktiver als molekularer Sauerstoff und wirkt dadurch als starkes Oxidationsmittel (Keppler & Ding 1997).

Die Ozonschicht ist wichtig, da sie die gesamte UV-C Strahlung und teilweise auch die UV-B Strahlung absorbiert. Allerdings wird die in der Stratosphäre liegende Ozonschicht immer mehr zerstört, man spricht von einem Ozonloch.

Für den Abbau der Ozonschicht sind vor allem 3 Gruppen von Gasen verantwortlich: die **Fluorchlorkohlenwasserstoffe** (kurz: FCKW), die **Chlorkohlenwasserstoffe** und diverse **Stickoxide**, die hauptsächlich bei Verbrennungsprozessen entstehen und mittlerweile das größte Problem darstellen (Keppler & Ding 1997; Larcher 1994; Ravishankara *et al.* 2009; Sitte *et al.* 2002). Das größte damit einhergehende Problem ist, dass vermehrt gefährliche UV-B Strahlen die Erdoberfläche erreichen (Madronich *et al.* 1998); sie können irreversible Schäden (siehe Kapitel 2.3) an Biomolekülen hervorrufen (Britt 1996).

---

<sup>2</sup> <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a6/Ozone-1%2C3-dipole.png>

Die chemischen Prozesse, die zum Abbau der Ozonschicht führen, sind im Allgemeinen sehr komplex. Vereinfacht läuft folgende Reaktion ab:

Nach Freisetzung steigen die Gase (FCKWs, Chlorkohlenwasserstoffe, Stickoxide) langsam in die Atmosphäre. Auf Grund ihrer chemischen Zusammensetzung gelangen sie unbeschadet in die Stratosphäre. Erst wenn sie in der Ozonschicht angekommen sind, werden sie durch die kurzwellige UV-Strahlung zersetzt. Es kommt zu einer photochemischen Reaktion, die Gase zerfallen und es werden Halogenradikale gebildet, mit dem Ozon reagieren und somit zum Abbau der Ozonschicht führen (Rowland, 1990; Solomon 1999).

## 1.2 Licht und Leben

Eine Grundvoraussetzung für das Pflanzenwachstum ist die Photosynthese. Hierbei wird die Lichtenergie der Sonne genutzt, um aus  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  organische Substanzen aufzubauen.

In Grünalgen und höheren Pflanzen findet die Photosynthese in den Chloroplasten statt. Mithilfe von lichtabsorbierenden Farbstoffen kann die Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt werden. Diese Pigmentsysteme können Strahlung verschiedener Wellenlängen absorbieren und photochemisch nutzen.

Chlorophyll a und b zum Beispiel absorbieren Wellenlängen von 400 bis 480 nm (blaues Licht) und von 550 bis 700 nm (gelbes/ rotes Licht). Purpurbakterien können mithilfe von Bakteriochlorophyll a auch unterhalb von 400 nm (UV-Bereich) und zwischen 700 und 850 nm (Dunkelrot-/ IR- Bereich) Licht absorbieren.

Innerhalb des Bereichs des grünen Lichts (zwischen 480 und 550 nm) besteht die so genannte „Grünlücke“: hier ist die Lichtabsorption des Chlorophyll a sehr gering. Deshalb erscheinen dem menschlichen Auge chlorophyllhaltige Pflanzeneile grün.

Allerdings können die akzessorischen Photosynthesepigmente Chlorophyll b und Carotinoide diese „Grünlücke“ teilweise schließen. Carotinoide absorbieren zwischen 460 und 500 nm, im Blau- bis Blaugrün Bereich (Sitte, 2002).

### 1.3 Schäden durch UV-Strahlung

UV-Strahlung ruft verschiedene direkte (photochemische Reaktionen mit organischer Materie) und indirekte Effekte (sekundäre Effekte) bei Pflanzen hervor und hat dadurch massive Auswirkungen auf das gesamte Ökosystem. In einem Review von Ann E. Stapleton (1992) wurden verschiedene Studien zitiert, die unterschiedliche Auswirkungen von UV-Strahlung auf Pflanzen dokumentiert haben, wie zum Beispiel ein Rückgang an Biomasse, Verringerung an keimfähigen Pollen, epidermale Verformungen, veränderte Zusammensetzungen der Kutikulawachsschichten oder Anstieg in der Produktion von Flavonoiden.

All diese Veränderungen kann man auf verschiedene durch UV-B verursachte Schäden zurückführen: Nukleinsäuren können kurze Wellenlängen absorbieren, dadurch kann es zu Veränderungen in der DNA kommen, wie zur vollständigen oder teilweisen Denaturierung des Doppelstranges (Kiefer & Wienhard 1977) die zu bleibenden Schäden sowie zum Tod führen können (Tevini & Häder 1985). Die Schädigung der DNA gehört zu den gefährlichsten Schädigungen durch UV-Strahlung; ein einziges Photon reicht aus, um einen negativen, oder sogar letalen Effekt zu erzielen. Die Absorption von UV-B führt zur Bildung von Cyclobutan Pyrimidin Dimeren (CPDs) und deren (4-6) Photoprodukten (Britt 1996; Caldwell *et al.* 1998). Diese verhindern die Transkription und Replikation des Genoms (Britt 1996). Aber viele Organismen besitzen Enzyme, die diese Schäden mit Hilfe von Licht (Caldwell *et al.* 1998), oder manchmal auch ohne Licht (Britt 1996), wieder reparieren können.

Durch die Bestrahlung mit UV kann es auch in Proteinen zu verschiedenen Veränderungen kommen. Dazu zählen die Änderung der Primärstruktur

(Aminosäuresequenz), Molekülbrüche, Änderung der Sekundärstruktur, Änderung der Tertiärstruktur und Molekülvernetzungen, oder die Inaktivierung ganzer Proteine und Enzyme (Kiefer & Wienhard 1977).

Vier wichtige Aminosäuren absorbieren UV-Strahlung bei Wellenlängen größer als 200 nm. Das sind Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, sowie Cystein. Die Absorption ist am Höchsten zwischen 220 und 240 nm, eine schwächere Absorptionsbande liegt bei 280 bis 300 nm. Cystein zum Beispiel absorbiert UV-Licht in einem Bereich von 240 bis 290 nm (Kiefer & Wienhard 1977).

Auch die Photosynthese kann beeinträchtigt werden (Hollósy 2002; Jansen *et al.* 1998). Hierbei kommt es zu direkten Effekten, wie zum Beispiel der Beeinträchtigung von Photosystem II und auch- im geringeren Ausmaß- von Photosystem I, einer verminderten Aktivität von Rubisco, weniger Kohlendioxidfixierung und Sauerstoffbildung, sowie zu einer Reduktion von Trockengewicht, Stärke- und Chlorophyllbildung. Außerdem gibt es auch indirekte Effekte, die die Photosynthese beeinflussen, zum Beispiel kann UV-B dazu führen, dass die Stomata geschlossen werden, was weiters zu einem verminderten Gasaustausch führt. Durch Veränderungen der Blattanatomie kann es zu einer Änderung der Lichtumsetzung innerhalb des Blattes kommen. (Hollósy 2002).

Neben den Effekten auf Transpiration und Photosynthese werden Veränderungen in Wachstum, in Zellmembranen, in der Funktion von Hormonen (Stapleton 1992), in der Entwicklung und in der Morphologie beschrieben (Hollósy 2002; Teramura & Sullivan 1994). Es kann auch zur Bildung von so genannten *reactive oxygen species* (ROS) kommen (Caldwell *et al.* 1998), die als wichtige Signalmoleküle agieren, in hohen Dosen allerdings toxisch wirken. Hauptsächlich werden ROS durch UV-A gebildet, aber es wurde auch nachgewiesen, dass UV-B eine erhöhte ROS Produktion begünstigen kann (Boelen *et al.* 2006). Freie Radikale und ROS entstehen durch photochemische Reaktionen und können Schäden an der DNA hervorrufen.

In einem Review von Boelen *et al.* (2006) wird beschrieben, dass UV-Strahlung Einfluss auf wichtige Prozesse innerhalb der Zelle hat, wie zum Beispiel auf Nährstoffaufnahme, DNA Transkription und Replikation, oder auch auf die Photosynthese, was weiters die Wachstums- und Reproduktionsrate beeinflussen kann.

### 1.3.1 Reparaturprozesse

Bei einer Schädigung der DNA ist es für die Pflanzen wichtig, den Schaden so schnell wie möglich zu reparieren. Dafür gibt es 3 Möglichkeiten: die Photoreaktivierung, die Exzisionsreparatur und die Postreplikationsreparatur.

Bei der **Photoreaktivierung** bindet und spaltet das lichtabhängige Enzym Photolyase die durch UV-Licht gebildeten, schädlichen CPDs, und stellt so die DNA wieder her. Für die Spaltung wird Licht mit einer Wellenlänge zwischen 370 und 450 nm benötigt (Hollósy 2002; Kiefer & Wienhard 1977; Stapleton 1992). In meinen Experimenten wurden daher nicht nur UV-B Lampen, sondern auch PAR-Lampen verwendet, damit diese Reparaturmöglichkeit gegeben ist.

Die **Exzisionsreparatur** ist ein einfaches, schnelles und lichtunabhängiges Verfahren: der Schaden im Doppelstrang der DNA wird erkannt, in der Nähe des Schadens abgeknickt, das defekte Stück herausgeschnitten und neu synthetisiert, und wieder in den Strang eingebaut (Hollósy 2002; Kiefer & Wienhard 1977; Stapleton 1992).

Die dritte Variante der DNA Reparatur ist die **Postreplikationsreparatur**. Auch dies ist ein Verfahren, das UV-induzierte Schäden ohne Lichtwirkung beheben kann. Allerdings wird hier der Schaden erst nach der Replikation repariert. Nach der Replikation entstehen gegenüber der Schadstellen Lücken, die durch Stücke parentaler DNA gefüllt werden (Hollósy 2002; Kiefer & Wienhard 1977). Bei der nächsten Replikation werden dann wieder intakte Stränge gebildet.

Diese Art der Reparatur wurde bis jetzt allerdings nur bei Bakterien beobachtet, nicht aber bei Pflanzen (Stapleton 1992; Kiefer 1977). Auch die durch erhöhte

UV-Strahlung gestörte Aktivität der Proteine D1 und D2 im Photosystem II kann teilweise durch Enzyme wiederhergestellt werden (Hollósy 2002).

## 1.4 Stressbedingte Anpassungen

Da UV-Strahlung seit jeher ein natürlicher Teil der Sonnenstrahlung und somit auch ein Teil fast jedes Ökosystems ist, haben Pflanzen verschiedene Strategien entwickelt, um mit dieser Strahlung umzugehen.

Reflexion, Absorption und/oder Transmission des schädlichen Lichtes können Teil einer stressbedingten Anpassung an UV-Strahlung sein:

Die **Reflexion** von UV-Strahlung beträgt in Pflanzenblättern nicht mehr als 3%.

Die **Absorption** von ultravioletter Strahlung erfolgt größtenteils durch cuticuläre und verkorkte Außenschichten der Epidermis, sowie durch im Zellsaft enthaltene phenolische Verbindungen. Die Absorption ist so effizient, dass nur 2-5%, meist aber weniger als 1% der UV-Strahlung die tieferen Blattschichten erreichen.

Die Durchlässigkeit, also **Transmission**, hängt hauptsächlich vom Bau und der Dicke des Blattes ab und ist aufgrund der starken epidermalen Absorption im UV-Bereich stark minimiert (Larcher 1994).

Entsprechend spielen morphologische Veränderungen der Blätter eine große Rolle bei der Anpassung an UV-Stress (Rozema *et al.* 1997). Es kommt zu Umbildungen, wie zum Beispiel in Form von eingerollten Blättern, die Blattfläche ist reduziert, weniger Stomata und kleinere Internodien werden ausgebildet. Oder die Epidermis, beziehungsweise das ganze Blatt, können dicker werden (Jansen *et al.* 1998; Rozema *et al.* 1997).

Auch Haare können als wirksame UV-Filter für das Assimilationsparenchym fungieren; zum Beispiel absorbieren Schildhaare auf Blättern von *Olea europaea* (der Ölbaum) 40% des UV-B (Larcher 1994).

Zum Schutz gegen UV-Strahlung haben Pflanzen auch chemische Anpassungen entwickelt. Ein Beispiel dafür ist die Veränderung von epidermalen Wachsen unter UV-Stress verändern (Jansen *et al.* 1998; Rozema *et al.* 1997).

Eine wichtige Rolle in der Evolution der Landpflanzen spielte auch die Produktion von phenolischen Verbindungen (Stafford 1991). Diese UV-absorbierenden Pigmente sind zum Beispiel **Flavonoide**, **Tannine** und **Lignine**. Oft liegen diese Phenole in der Epidermis, dadurch kommt es zu einer Filterung der UV-Strahlung (Day *et al.* 1992); UV-Strahlung kann nicht zu weiter innen liegenden Gewebeschichten von Blättern und Stämmen durchdringen. Außerdem können sie als Radikalfänger fungieren (Rozema *et al.* 1997). Höhere Pflanzen können als zusätzlichen Schutz vermehrt UV-absorbierende Komponenten (meistens phenolische Verbindungen) bilden, sobald sie unter UV-Stress stehen (Caldwell *et al.* 1998).

**Flavonoide** gehören zu den sekundären Inhaltsstoffen bei Pflanzen. Die Struktur aller Flavonoide basiert auf dem C<sub>15</sub>-Körper des Flavanons. Flavonoide werden über den Phenylpropan- (Phenylalanin-Ammonium-Lyase, PAL; Zimtsäure 4-Hydroxylase, C<sub>4</sub>H; 4-Coumarate:CoA-Ligase, 4CL) und den Flavonoid- (Chalcone Synthase, CHS; Chalcone-Flavanone Isomerase, CFI) Reaktionsweg enzymatisch synthetisiert (Hollósy 2002).

Eine Studie von Li *et al.* (1993) zeigte, dass *Arabidopsis thaliana* zumindest zwei UV-absorbierende Pigmente produziert, die es vor UV-Strahlung schützen: Flavonoide und Sinapinsäure-Ester (beides Derivate der Phenylalaninsynthese). Mutanten, die diese Stoffe nur in geringer Konzentration bilden konnten, reagierten viel sensibler auf UV-B Strahlung als der Wildtyp.

Auch Tannine und Lignine sind sekundäre Inhaltsstoffe bei Pflanzen. Sie haben unterschiedliche Aufgaben:

**Tannine** haben Auswirkungen auf den Geschmack und die Verdaubarkeit von Pflanzen, und somit in weiterer Folge auch auf die Herbivorie und andere Pflanzen-Tier Beziehungen (Hatcher & Paul 1994; Rozema *et al.* 1997).

**Lignine** werden in erster Linie in sekundären Zellwänden gefunden in Verbindung mit Hemicellulase. Sie verleihen der Pflanze strukturellen Halt und reduzieren den Wasserfluss aus dem Xylem. Außerdem schützt Lignin die Pflanzen vor mikrobiellem Befall (Rozema *et al.* 1997).

Lignine beeinflussen die Zersetzung von Pflanzen: je mehr Lignin, desto schwieriger wird es für Mikroorganismen, das Pflanzenmaterial zu zersetzen. UV-B Strahlung beeinflusst die Ligninproduktion bei Pflanzen entweder direkt (wie zum Beispiel durch Photodegradierung) oder indirekt (indem mehr Lignine produziert werden und auch mehr Tannine in den Pflanzengeweben vorkommen) (Rozema *et al.* 1997; Zepp *et al.* 1998).

**Benzoesäure** ist eine aromatische Carbonsäure. Sie gilt als Stressmetabolit und Vorstufe der Salicylsäure (Senaratna *et al.* 2003). In verschiedenen Studien wurde beschrieben, dass Salicylsäure, und somit auch Benzoesäure 2-Hydroxylase, die die Salicylsäure-Biosynthese katalysiert, in Zusammenhang mit unterschiedlichen Stressfaktoren, wie zum Beispiel UV-Strahlung oder Ozon (Sharma *et al.* 1996; Yalpani *et al.* 1994), vermehrt gebildet wird.

## 1.5 Moose und UV-Strahlung

Lange Zeit ging man davon aus, dass Bryophyten schlecht mit UV-Stress umgehen können und empfindlicher auf UV-B reagieren als höhere Pflanzen (Gehrke 1999). Die Morphologie der Moose ließ einen solchen Schluss zu: ihre undifferenzierten, einschichtigen Blätter, die auch keine schützende Kutikula oder verdickte Epidermis ausbilden, scheinen keinen geeigneten Schutz gegen die aggressive Strahlung zu haben. Darüber hinaus besitzen Moose keine echten Wurzeln. Das heißt, sie können oberirdischen Stress nicht durch

unterirdisch gespeicherte Assimilate ausgleichen (Boelen *et al.* 2006; Gehrke 1999).

Aber viele Moosarten wachsen auf unbeschatteten, sonnenexponierten Standorten und sind dadurch ganz dem UV-Licht ausgesetzt. Bryophyten nehmen eine wichtige Rolle innerhalb der terrestrischen Pflanzen ein, vor allem in den polaren und subpolaren Regionen; dort sind heute auch das Ozonloch am größten und die UV-B Strahlung am stärksten (Boelen *et al.* 2006). Man ging davon aus, dass gerade die Moose der Polregionen sehr sensiv auf UV-B Strahlung reagieren müssten, da das kalte Klima die Pflanzen stressen müsse, und die tiefen Temperaturen Reparaturmechanismen hemmen würden. Diese Annahme widerlegen Rozema *et al.* (2002) mit der Hypothese, dass Moose evolutionär gesehen älter sind als Blütenpflanzen und dadurch besser an höhere UV-B Strahlung angepasst sein könnten.

In dem Review von 2005 beschrieben Rozema *et al.*, dass verstärkte UV-B Strahlung auf Pflanzen von polaren Ökosystemen- und zwar weder auf blühende Pflanzen noch auf Moose- eine Wirkung zeigt. Wachstum und Photosyntheserate werden nicht signifikant beeinflusst.

Viele Freilandstudien bestätigen, dass gerade Moose gut an UV-Strahlung angepasst sind (Boelen *et al.* 2006).

## 1.6 Auswirkungen auf das Ökosystem

„Unter Ökosystem versteht man die Gesamtheit an agierenden abiotischen und biotischen Komponenten in einem abgegrenzten Gebiet.“ (Sitte *et al.* 2002)

Erhöhte UV-Strahlung kann durch direkte und indirekte Schäden große Auswirkungen auf Pflanzen, Mikroben und auch Tiere haben, und dadurch auch auf ganze Ökosysteme, sowohl landwirtschaftlich, wie auch nicht landwirtschaftlich genutzte (Wälder, Savannen, Wüsten, Tundra, etc.). Jeder Teil eines komplexen Ökosystems kann von der erhöhten UV-Strahlung

betroffen sein. Die kurzwellige Strahlung kann Einfluss haben auf die Biomasseproduktion, die Saatgutproduktion, Krankheiten von Pflanzen und Tieren, auf Pflanzen- und Tierpopulationen, auf den Mineralhaushalt, oder sie kann Änderungen in der Zusammensetzung der Spezies hervorrufen (Caldwell *et al.* 1998). Bis heute wurden bei Studien über die Effekte erhöhter UV-B Strahlung auf terrestrische Ökosysteme hauptsächlich höhere Pflanzen erforscht (Caldwell *et al.* 1998). Nun gibt es aber auch neueste Forschungen, die den Effekt von UV-Strahlung auf Moose untersuchen (Boelen *et al.* 2006; Gehrke 1999; Wolf *et al.* 2010).

UV-Stress hat Effekte auf verschiedenste Faktoren, so dass Ökosysteme zum Beispiel durch Veränderung der Luftqualität (Tang *et al.* 1998) oder Unterschiede in der Zersetzung von Pflanzen beeinflusst werden; der Zerfall der Pflanzenstreu kann durch photochemische Reaktionen beschleunigt oder durch verminderte Bakterienaktivität verlangsamt werden (Zepp *et al.* 1998).

Die Frage, welches Ökosystem am meisten unter der erhöhten UV-Strahlung zu leiden hat, ist daher schwer zu beantworten. Die Auswirkungen auf Wälder, Grasland und andere nichtlandwirtschaftlich genutzte Ökosysteme sind sehr komplex und man kann sie nicht nur auf die Abnahme der Primärproduktion minimieren. Wir wissen nicht, welche Konsequenzen die andauernde erhöhte UV-Belastung auf das Ökosystem wirklich hat, ohne Langzeitexperimente durchzuführen und die Reaktionen des Ökosystems zu studieren. Die Wissenschaft hat bis jetzt wohl noch zu wenig Aufmerksamkeit auf diesen Aspekt gerichtet (Caldwell *et al.* 1998).

## 1.7 Ziel dieser Diplomarbeit

Einerseits kann man davon ausgehen, dass Moose, da sie weder eine schützende Kutikula noch Behaarung haben, von UV-Strahlung beeinträchtigt werden. Andererseits findet man Moose gerade auch in den Polregionen der Erde, wo das Ozonloch besonders groß, und somit auch die UV-Strahlung stark erhöht sind.

Diese Diplomarbeit will testen und zeigen, wie gut oder schlecht das Modellmoos *Physcomitrella patens* mit UV-Stress umgehen kann.

Ziel der Diplomarbeit ist eine Charakterisierung der cytomorphologischen Veränderung in *P. patens* nach UV-Stress unter Verwendung verschiedener Methoden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchspflanze

#### 2.1.1 *Physcomitrella patens*

*P. patens* ist ein pleurokarpes Laubmoos und gehört zu der Familie der Funariales. Die Moospflänzchen werden bis zu 5 mm groß, die oberen Blätter sind vergrößert, breit, lanzettlich, am Rand stumpf gezähnt. vor allem findet man dieses Moos auf verschlämmten oder tonigen Böden, insbesondere an trocken gefallenen Flussufern und abgelassenen Teichen (Frahm & Frey 2004).

Der einfache Bauplan aus nur wenigen verschiedenen Zelltypen (Reski 1998), der kurze Lebenszyklus von nur 4 Wochen (Frahm 2001), die einfache Kultivierbarkeit, das haploide Genom sowie eine sehr effiziente homologe Rekombination machen das Moos *P. patens* zu einem Modellorganismus der Pflanzenwissenschaften (Cove & Knight 1993).

Das Genom mit rund 500.000 Basenpaaren, die in 27 Chromosomen organisiert sind, wurde 2006 als erstes Genom einer Landpflanze außerhalb der Bedecktsamer vollständig sequenziert (Rensing *et al.* 2008).



Abb.3.: *P. patens*, Gametophyt

## 2.1.2 Kultivierung

Die Moospflänzchen wurden in der „Core Facility Cell Imaging & Ultrastructure Research“ der Universität Wien auf Agarplatten in Sterilkultur gezogen (Sassmann *et al.* 2010). Die Arbeitsgruppe verfügt über große Erfahrung in diesem Bereich und es gibt ausreichenden Platz zum Aufstellen der Kulturplatten.

Die kleinen *P. patens* Moospflänzchen wuchsen auf einem Medium nach Benecke (1903).

Stammlösung von Benecke:

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.....200 mg/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....400 mg/l

MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O).....100 mg/l

CaCl<sub>2</sub> (2H<sub>2</sub>O).....100 mg/l

Um 1 Liter Agar herzustellen, wurden die 4 Stammlösungen 1:100 in Aqua dest. verdünnt und 8 g Agar hinzugefügt. Danach muss ein pH-Wert von 5,8 eingestellt, die Lösung gekocht und autoklaviert werden.

Die Mooskulturen wurden aus Stammkulturen des Labors gezüchtet und alle 4 Wochen überimpft. Dazu wurden einzelne Stämmchen in sterile Petrischalen mit autoklaviertem Agar gepflanzt und danach mit Parafilm gut verschlossen.

Zum Wachsen wurden die beimpften Petrischalen in einen Kulturschrank mit konstanten Licht- und Temperaturverhältnissen gestellt: bei einem 14 h Tag/ 10 h Nacht Rhythmus betrug die Temperatur 24°C, und die Lichtintensität lag bei 48  $\mu\text{Ms}^{-1}\text{m}^{-2}$ .

Für die Bestrahlungsversuche wuchsen die frisch eingesetzten Pflänzchen direkt unter einer eigens angefertigten Apparatur für die UV-Bestrahlung heran. Auch hier waren die Konditionen konstant: 2 h normales Licht, 10 h normales Licht + UV-B, 2 h normales Licht, 10 h Nacht, Temperatur: 25°C, (30  $\mu\text{W cm}^{-2}\text{nm}^{-1}$ ).

### 2.1.3 UV- Bestrahlung von *P. patens*

Die Moose wurden in eine eigens angefertigte Apparatur zur UV-Bestrahlung gestellt. In den Vorversuchen bestand sie aus 4 Lampen für sichtbares Licht (Philips, TL47), 2 UV-A Lampen (Philips, TL9) und 2 UV-B Lampen (Philips, TL12).

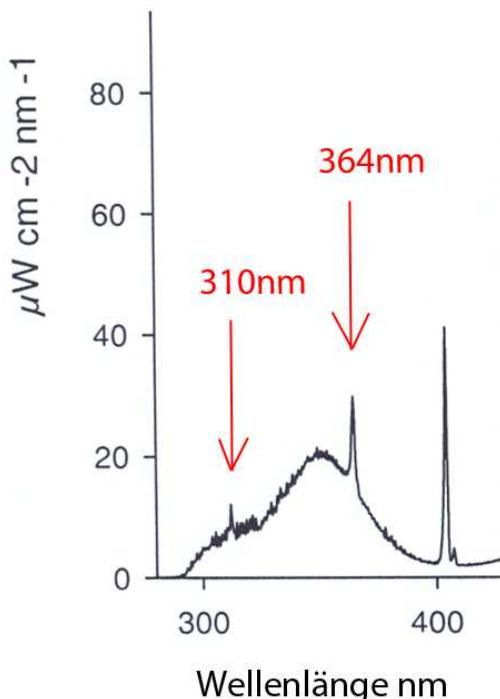


Abb.4.: Spektrale Intensitätsverteilung 2x UV-A & 2x UV-B;  
290 nm- 400 nm: 1100  $\mu\text{W}$

Um den Stress durch UV-B Strahlung noch zu erhöhen, wurden alle weiteren Versuche mit 4 Lampen für sichtbares Licht (Philips, TL47) und 4 UV-B Lampen (Philips, TL12) durchgeführt.

Bei allen Bestrahlungsversuchen wurden die UV-B Lampen mit einer dünnen Celluloseacetatfolie umwickelt, die die sehr kurzwellige & schädliche UV-B Strahlung absorbierten. Diese ist biologisch nicht relevant, da sie zwar in der Sonnenstrahlung vorkommt, aber von der Stratosphäre vollständig absorbiert

wird. Wird diese Folie allerdings entfernt, sieht man sofort die Auswirkung auf die Pflanzen. Es kommt innerhalb eines Tages zum Ausbleichen. Allerdings sind keine weiteren Schäden sichtbar.

Erneuert man die Folie, so können sich die Pflanzen regenerieren, auch wenn sie nicht mehr ganz so grün werden wie die Kontrollpflänzchen.

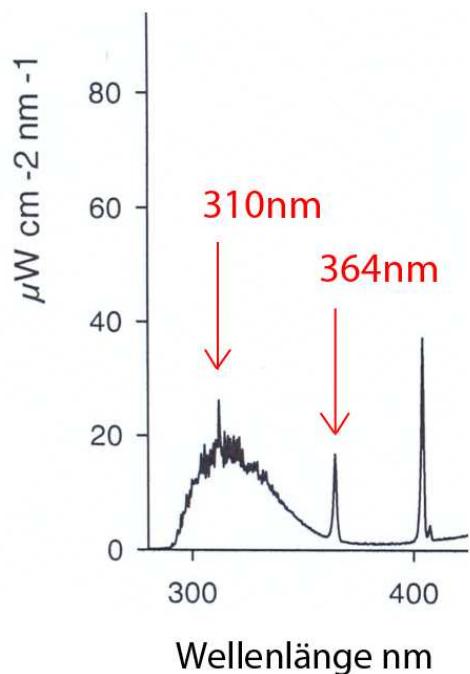


Abb.5.: Spektrale Intensitätsverteilung 4x UV-B;  
290 nm- 400 nm: 800  $\mu\text{W}$

Diese Kombination von UV- und sichtbarem Licht ist essentiell, um die natürliche Lichtsituation für Pflanzen zu simulieren. Eine reine UV-Bestrahlung würde Ergebnisse liefern, die nicht mit natürlichen Standorten vergleichbar wären.

10 Petrischalen mit Moospflanzen wurden in einem Abstand von 38 cm unter die Lampen gestellt. Ein Ventilator sorgte für eine konstante Temperatur von 25°C. 5 Petrischalen wurden der UV-Strahlung ausgesetzt, 5 weitere wurden durch eine Ultraphan-UV Folie, die sämtliches UV-Licht absorbiert, vor der Strahlung geschützt und dienten als Kontrolle. Der Versuch dauerte 4 Wochen,

mögliche Veränderungen der Biomasse wurden jede Woche durch Photos dokumentiert. Der Versuch wurde in derselben Anordnung vier Mal wiederholt.

Die Petrischalen, in denen die Moose kultiviert wurden, sind für UV-Strahlung in den relevanten Wellenlängen bis zu 75% durchlässig.

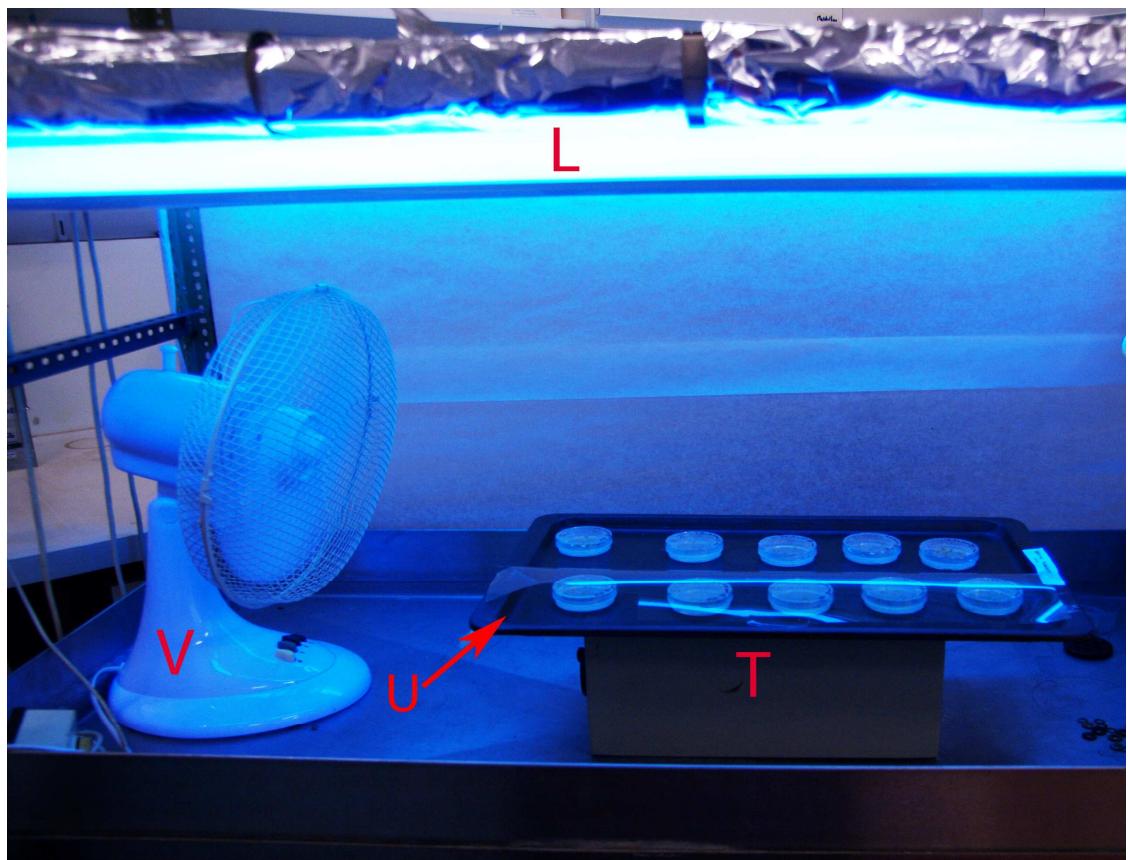


Abb.6.: „UV-Gestell“: mit Leuchtstoffröhren (L) für UV- und sichtbares Licht, Tablett (T) mit den Moospflänzchen in Petrischalen (5 Kontrollpflänzchen sind abgedeckt mit Ultranaphanfolie (U)) & Ventilator (V)

In den Vorversuchen, bei denen zusätzliche UV-A und UV-B Lampen verwendet wurden, hatte die Belastung sichtlich keinen negativen Effekt auf das Versuchsmoos, im Gegenteil: im Vergleich zu den Kontrollpflanzen, die gar nicht mit UV bestrahlt wurden, konnte eine Zunahme an Biomasse in Form von mehr buschartigen Gametophyten und mehr Protonemabildung festgestellt werden. Die Kontrollpflänzchen waren auch von gutem Wuchs, allerdings nicht im gleichen Ausmaß.

Um den Stress auf die Moospflänzchen noch weiter zu erhöhen, wurden bei diesem Versuchsansatz die UV-A Lampen weggelassen und stattdessen weitere UV-B Lampen verwendet.

## 2.2 Mikroskopie

### 2.2.1 UV- Mikroskopie

Die „Core Facility Cell Imaging & Ultrastructure Research“ verfügt über ein spezielles Durchlicht-UV-Mikroskop der Firma Zeiss, das mit variabler Wellenlänge arbeitet. Mit diesem Gerät können Proben mit Wellenlängen von 290 bis 700 nm bestrahlt werden. Als Lichtquelle dient eine Xenonlampe (XBO 75/ 100 W) mit einem Spektrum von 290 nm bis 900 nm. Da die Auflösung eines Mikroskops von der numerischen Apertur des Objektivs und der Wellenlänge des verwendeten Lichts abhängt (Abbe 1873), bewirkt kurzwelliges Licht eine höhere Auflösung. Dies ist ein zusätzlicher Vorteil des UV-Mikroskops.

Alle Objektive und auch der Kondensor (0,8) bestehen aus Quarz, um das UV-Licht nicht zu absorbieren.

Objektive:

Ultrafluar 10/ 0,2, 160/ 0,35 Quarz

Neofluar 10/ 0,30, 160/ -

Ultrafluar 32/ 0,40 Glycerin, 160/ 0,35 Quarz

Ultrafluar 100/ 1,25 Glycerin, 160/ 0,35 Quarz

Stärkere Vergrößerung kann durch zusätzlichen Abstand von reellem Zwischenbild und Kamera erzielt werden. Zur photographischen Dokumentation steht eine UV-sensitive Kamera zur Verfügung.

Für das UV-Mikroskop sind normale Objektträger nicht geeignet, da Glas für Licht von sehr kurzwelliger Strahlung undurchlässig ist. Es müssen

Quarzobjektträger verwendet werden. Auch Quarzdeckgläser werden verwendet, allerdings ist es auch möglich normale Standarddeckgläser zu benutzen, da sie die UV-Wirkung auf das Präparat nicht beeinträchtigen und außerdem dünner sind und daher ein Mikroskopieren von dickeren Präparaten ermöglichen.



Abb.7.: UV-Mikroskop

UV-Mikroskopie wurde schon zu Zeiten von August Köhler (1904) verwendet. Nach Ernst Abbe (Abbe 1873), der das Auflösungsvermögen eines Mikroskops mit der Formel  $d = \lambda / (2 n * \sin\alpha)$  definierte, ist die Auflösung eines Mikroskops abhängig von der Wellenlänge ( $\lambda$ ), der Brechzahl des Mediums zwischen dem Gegenstand und dem Objektiv ( $n$ ) und dem halben Öffnungswinkels des Objektivs ( $\alpha$ ). Eine Steigerung der Auflösung ist demnach durch Verwendung kürzerer Wellenlängen, wie zum Beispiel UV-Licht, möglich. Für Hellfeldmikroskopie in weißem Licht rechnet man mit einer Auflösung von ca. 0.2 µm. Durch die Verwendung des kurzweligen UV-Lichtes kann die Auflösung bis auf das Doppelte gesteigert werden (Köhler, 1904).

## 2.2.2 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Abgesehen von dem zuvor beschriebenen UV-Mikroskop wurde für die Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskopie ein Mikroskop der Firma Olympus (BX41) verwendet.

Objektive:

- 10x Obj., Plan CN, n. A./ 0,25,  $\infty$  / - / FN 22
- 20x Obj., Plan CN, n. A./ 0,40,  $\infty$  / 0,17 / FN 22
- 40x Obj., Plan CN, n. A./ 0,65,  $\infty$  / 0,17 / FN 22
- 60x Obj., Plan CN, n. A./ 0,80,  $\infty$  / 0,17 / FN 22
- 100x Obj., Plan CN, n. A./ 1,25, Oil,  $\infty$  / - / FN 22

Fluoreszenzlampe: Olympus U-RFL-T

Bildaufnahme mit dem Programm Cell-D

Zusätzlich wurde mit einem Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) der Firma Leica (DMRE2) gearbeitet.

Objektive:

- HC PL Fluotar, 10x/ 0,3
- HC PL Fluotar, 20x/ 0,5
- HCX PL Apo, 40x/ 1,25, Oil
- HCX PL Apo, 63x/ 1,25, Oil

## 2.3 Färbungen

### 2.3.1 DAPI-Färbung

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ist ein Farbstoff, der sich bevorzugt an A-T reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA bindet und dadurch einen fluoreszierenden Komplex bildet (Kapuscinski 1995). Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich mit blauer bis cyaner Farbe. In Verbindung mit doppelsträngiger DNA liegt das

Absorptionsspektrum bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emmissionsspektrum bei 461 nm. DAPI kann auch an RNA binden, bildet aber einen nicht stark fluoreszierenden Komplex mit einem Emmisionsmaximum um die 500 nm (Krishan & Dandekar 2005; Tanious *et al.* 1992).

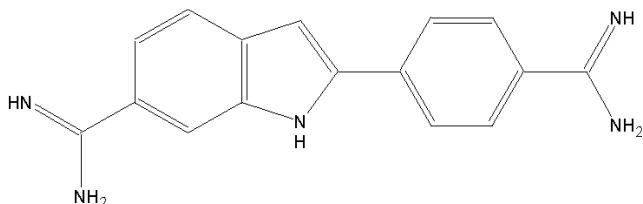


Abb.8.: chemische Struktur von DAPI<sup>3</sup>

Für die Stammlösung wurden 5 mg DAPI-Pulver (Firma Serva) in 1 ml destilliertem Wasser gelöst. Sie wurde 1:100 verdünnt in PBS. Ein paar Tropfen dieser Mischung wurden nun auf die Probe aufgetragen, der Farbstoff musste mindestens 20 Minuten einwirken. Während der Einwirkdauer musste das Präparat im Dunklen gelagert werden. Nach dem Einwirken wurde das Präparat drei Mal mit PBS ausgewaschen.

Um eine DAPI-Färbung an den *P. patens* Zellen vorzunehmen, war eine vorherige Fixierung und Perforierung der Zellwände notwendig.

Fixiert wurden Präparate von einzelnen Blättchen mit einer Mischung aus einer 4%igen Formaldehyd- und einer 5% Glutaraldehydlösung (1000 µl HCHO + 5 µl C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>). Die Fixierdauer lag bei mindestens einer Stunde, danach musste das Präparat drei Mal mit Puffer ausgewaschen werden. Zum Waschen der Proben wurde immer phosphatgepufferte NaCl-Lösung, PBS, verwendet.

Zur Perforierung der Zellwände und Membranen wurden sowohl die Enzyme Cellulase und Pektinase verwendet, als auch ein Tensid aus der Gruppe der Octylphenolethoxylate, Triton X-100.

Die Enzyme Cellulase und Pektinase wurden in einer 1:1-Mischung verwendet, die Einwirkdauer betrug mindestens 30 Minuten; bei Triton wurde zu 100 µl

---

<sup>3</sup> <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f1/DAPI.gif>

PBS nur eine Pipettenspitze Triton zugegeben, die Einwirkdauer lag hier bei 10 Minuten. Danach musste das Präparat wieder drei Mal mit Puffer gewaschen werden.

PBS Stammlösung:

120 mmol NaCl, 2,7 mmol KCl und 10 mmol Phosphatpuffer in 1000 ml destillierten Wasser lösen

Die Proben wurden mit einem Fluoreszensmikroskop (Olympus) dokumentiert und mit dem Programm Cell-D ausgewertet.

### 2.3.2 Färbung mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)

Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) ist ein Di-Tetrazoliumsalz und Redox-Farbstoff.

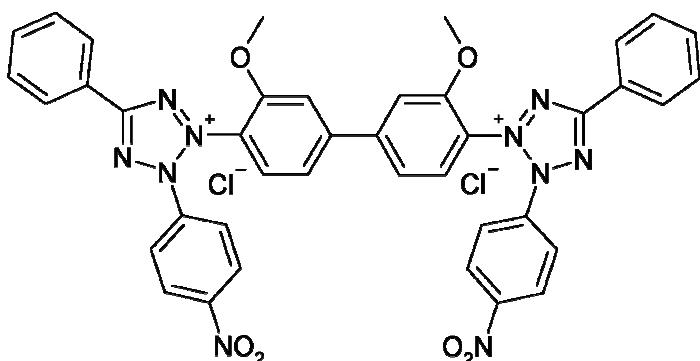


Abb.9.: chemische Struktur von NBT<sup>4</sup>

Tetrazoliumsalze sind Wasserstoffakzeptoren und können bei richtigen physiologischen Bedingungen enzymatisch zu unlöslichen, farbigen Formazanen reduziert werden. So wird das Di-Tetrazoliumsalz zuerst zu einem roten Mono-Formazanfarbstoff reduziert, und in weiterer Folge zu einem blauen Di-Formazanfarbstoff.

---

<sup>4</sup> [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/62/Nitroblue\\_tetrazolium\\_chloride.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/62/Nitroblue_tetrazolium_chloride.png)

Durch diese Reaktion kann man Dehydrogenierungsreaktionen im Stoffwechsel histochemisch nachweisen (Kartusch 1974). Enzyme der Atmungskette können Tetrazoliumsalze reduzieren. Allerdings sind weder der genaue Mechanismus noch der Ort der Reaktion bekannt. Bei der Verwendung von Nitro-BT wird angenommen, dass die Reduktion durch den NADH bzw. Succinat oxidierenden Enzymkomplex vor dem Cytochrom b erfolgt (gelesen in Kartusch 1974).

Allerdings hemmt UV-Strahlung die Formazanbildung, das heißt, wenn die Stoffwechselprozesse durch die Bestrahlung verlangsamt werden, dann ist die Formazanbildung verringert. So können bestrahlte, geschädigte Zellen von unbestrahlten unterschieden werden.

Als Material dienten neben Blättchen von *P. patens* auch Epidermisschuppen von *Allium cepa*. Präpariert wurden die *Allium cepa* Epidemisschuppen nach Kartusch (1972). Die gesamten Zwiebelschuppen wurden entlüftet und dann die obere Epidermis mit einer Rasierklinge in kleine, ca. 5 mm breite und 10 mm lange Stückchen, geschnitten. Diese Schnitte lösen sich leicht vom darunter liegenden Parenchym und wurden dann mindestens 2 Stunden in einem Schälchen mit Wasser schwimmen gelassen. Bei *P. patens* wurden ganze Gametophyten mindestens 2 Stunden in einem Schälchen mit Wasser aufbewahrt. Die Behandlung mit NBT erfolgte nach (Kartusch 1974).

Mit Hilfe des UV-Mikroskops wurden die Präparate mit einer Wellenlänge von 310 nm bestrahlt, und zwar unterschiedlich lange: 15, 30 und 45 Sekunden, und eine Kontrolle, die gar nicht bestrahlt. Danach wurden die Präparate für weitere 2 Stunden in Wasser aufbewahrt und dann gefärbt. Als Tetrazoliumsalz wurde NBT (Serva) verwendet. Da Tetrazoliumsalze toxisch wirken, wurde mit einer Konzentration von 0,004% gearbeitet.

Zusammensetzung des Inkubationsmediums (Kartusch 1974):

20 µl NBT-Lösung (2 mg/ml)

50 µl m/15 Phosphatpuffer (pH 7)

auf 1000 µl aufgefüllt mit Aqua dest.

### 2.3.3 Aktinfärbung mit Alexa-Phalloidin

Phalloidin gehört zu der Gruppe der Phallotoxine und ist ein Toxin des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amantia phalloides*). Es bindet mit hoher Affinität an F-Aktin. Gekoppelt mit einem Fluoreszenzfarbstoff kann man so Aktinmikrofilamente in der Zelle sichtbar machen (Cooper 1987).

Gefärbt wurden sowohl *P. patens* als auch *A. cepa* Innenepidermis Präparate mit Alexa Fluor 488 Phalloidin. Das Absorptionsmaximum liegt bei 495 nm und das Emissionsmaximum bei 518 nm.

Stammlösung Alexa Fluor 488 Phalloidin:

Der Inhalt eines Fläschchens Alexa Fluor 488 Phalloidin von der Firma Molecular Probes musste in 1,5 ml Methanol gelöst werden, um eine Endkonzentration von 6,6 µM zu erhalten. Um einen Objektträger mit fixierten Zellen zu färben, wurden ungefähr 5 µl der methanolischen Stammlösung benötigt.

Anstatt einer Fixierung wurde Traas-Puffer verwendet, da er bereits ein Detergenz zur Membranpermeabilisierung (NP-40) enthält, das das Eindringen in die Zelle ermöglicht.

Zusammensetzung des Traas-Puffers:

1% Mannitol	(4%	stock: 250 µl)
50 mM PIPES	(100mM	stock: 500 µl)
5 mM EGTA	(500mM	stock: 10 µl)
2 mM MgSO <sub>4</sub>	(20mM	stock: 100 µl)
0,01% NP-40	(10%	stock: 1 µl)
5% DMSO	(100%	stock: 50 µl)
In H <sub>2</sub> O dest:		89 µl

Als Färbelösung wurde eine Mischung von 80 µl Traas Puffer und 20 µl Stammlösung Alexa Phalloidin verwendet.

Die fertige Färbelösung konnte gleich auf die auf einem Objekträger liegende Probe aufgetragen werden (~30 µl); der Farbstoff muss nur 5 bis 10 Minuten einwirken, überschüssiger Farbstoff wurde aber dann mit Puffer ausgewaschen.

Die Proben wurden mit Hilfe eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops und im CLSM analysiert.

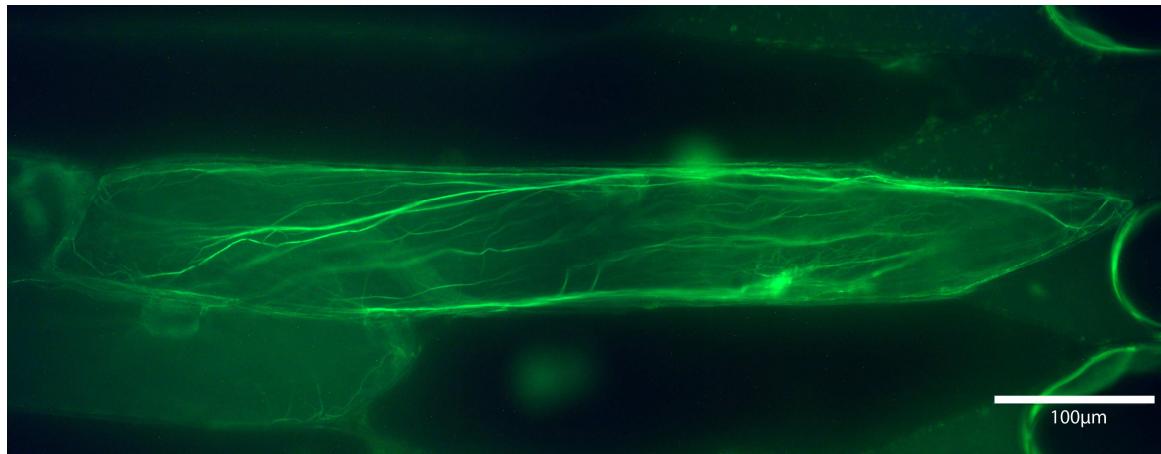


Abb.10.: Aktingerüst bei *Allium cepa*, Olympus, gefärbt mit Alexa-Phalloidin

## 2.4 Latrunculin-B

Latrunculin ist ein an Aktin-A bindendes Zellgift, das von verschiedenen Schwämmen produziert wird, wie zum Beispiel der Gattung *Latrunculia*. Latrunculin-B wird verwendet, um das Aktin-Cytoskelett der Zellen zu depolymerisieren. Es kann an Aktin-Monomere binden und so eine Aktin-Polymerisation verhindern (Wakatsuki *et al.* 2000).

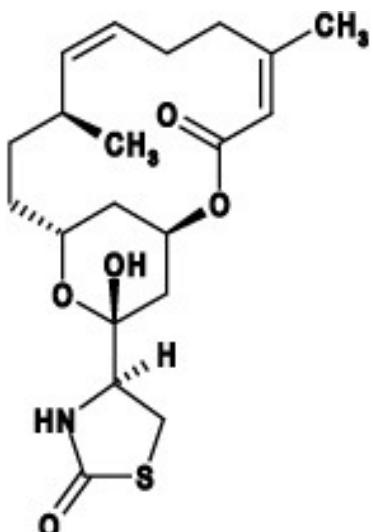


Abb.11.: chemische Struktur von Latrunculin-B<sup>5</sup>

Eine Stammlösung von Latrunculin-B (Firma Calbiochem, 10 mM) wurde mit DMSO hergestellt. Diese wurde mit destilliertem Wasser zu einer  $10^{-5}$  M Lösung verdünnt und vorsichtig auf ein Moosblättchen getropft. Das Präparat kann sofort mikroskopiert werden, das Gift wirkt innerhalb von 5 bis 10 Minuten.

Um zu sehen wie schnell das Gift wirkt, wurde dieser Versuch auch mit *Allium cepa* Zellen durchgeführt. Hier kann man die Organellenbewegung leichter verfolgen als in *P. patens*.

## 2.5 High Pressure Liquide Chromotography (HPLC)

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist ein Verfahren aus der analytischen Chemie und wird zur Auf trennung und Analyse von Stoffgemischen benutzt.

In dieser Arbeit wurde dieses Verfahren angewendet, um sekundäre Inhaltsstoffe, die durch UV-Stress gebildet werden können, nachzuweisen. Vor allem Benzoesäure könnte hier eine Rolle spielen, da sie in Schwermetall-gestressten *P. patens* gefunden wurde (Sassmann 2010).

---

<sup>5</sup> <http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/formula/350-359.gif>

Die verwendete Apparatur ist ein Dionex Summit mit einem „photodiode array detector“ (PDA) und einem Famos Auto-Sampler. Die verwendeten Säulen sind Phenomenex Synergi Max C12, 150\*2 mm, 5 µm Partikelgröße.

### **2.5.1 Moosproben Vorbereitung**

Insgesamt wurden 3 Extrakte von bestrahlten und drei von unbestrahlten *P. patens* Pflänzchen hergestellt.

Um ein Extrakt herzustellen, wurde Moosmaterial von mindestens 4 Petrischalen benötigt (die Pflänzchen sind 4 Wochen gewachsen) und darauf geachtet, dass so wenig Agar wie möglich an den Pflänzchen kleben bleibt.

Das Pflanzenmaterial wurde in einer Reibschale mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann zermörsert. Danach wurde die Reibschale gründlich mit 100 ml reinem Methanol, welches mit konzentrierter Essigsäure (99:1) versetzt wurde, gespült. Die Flüssigkeit wurde in einem kleinen Fläschchen aufgefangen. Vor der Weiterverarbeitung wurde der Extrakt über Nacht in einem Kühlraum mit 4°C gelagert.

Der Extrakt wurde durch Watte in einen Rundkolben abfiltriert, und gut mit Methanol nachgespült. Danach wurde der Rundkolben in den Rotovapor eingespannt und das Methanol bei einer Temperatur von ca. 40°C verdampft. Die Reste wurden mit 1%iger Essigsäure gelöst.

### **2.5.2 Säulenvorbereitung**

Der erste Schritt war die Vorbereitung des benötigten Amberlits: ungefähr 15 bis 20 g pro Säule Amberlit XAD-1180 musste zuerst in H<sub>2</sub>O/Essigsäure quellen, dann weiter in Methanol. Das Methanol wurde nach ca. 15 Minuten abgegossen, und danach quoll das Amberlit in MQ-Wasser noch ca. 10 Minuten weiter.

Eine 5 cm dicke Schicht Watte wurde in die Säule geben, dann die Amberlit/H<sub>2</sub>O-Mischung darauf, das Ventil der Säule musste dazu geschlossen sein. Das

Wasser ließ man anschließend abrinnen, aber nur soweit, dass die Watte nicht ganz trocken fiel. Dann wurde noch eine Schicht Watte darauf gegeben, damit die Säule stabil blieb. Mit MQ-Wasser musste danach einmal durchgespült werden.

Nun folgte die Auftrennung des Extrakts in eine nicht lipophile Wasserphase und eine lipophile Ethanolphase.

Die Verdampfungsreste der Proben wurden danach mit MQ-Wasser und 1% Essigsäure verdünnt und konnten dann in die vorbereitete Chromatographensäule gegossen werden. Nachgespült wurde mit einem mit 1%iger Essigsäure versetztem MQ-Wasser (ca. 1 l vorbereitet).

Sobald das gesamte Wasser durchgelaufen war, wurde die Säule noch mit 50 ml Ethanol gespült und aufgefangen. Man erhielt eine Ethanolphase. Diese musste bis zur letzten Bearbeitung wieder im Kühlraum bei 4°C gelagert werden.

### **2.5.3 Ethanolphase**

Die gewonnene Ethanolphase wurde noch einmal bei 40°C im Rotovapor einrotiert, danach mit wenig Ethanol gelöst und in ein vorher abgewogenes Fläschchen gegeben. Dann wurde das Gemisch noch einmal einrotiert, das Fläschchen danach noch einmal abgewogen, und dann der Rest bei -20°C eingefroren.

Vor der Messung wurde die trockene Probe mit einem 1:1 Gemisch von Methanol und 1% Essigsäure wieder gelöst. Davon wurden 100 µl in ein vorbereitetes Mikrotiterfläschchen gegeben, verplompt und für die HPLC-Messung bereitgestellt.

## 2.6 Bildbearbeitung

Die Dokumentation erfolgte zum Teil mit einer UV-sensitiver Digitalkamera, zum Teil auch am CLSM.

Falls notwendig, wurden die verwendeten Bilder mit Adobe Photoshop CS4 bearbeitet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 UV- Bestrahlung von *P. patens*

Vier Wochen lang wurden 10 Petrischalen mit *P. patens* in einer Apparatur mit künstlichem Licht und zusätzlichem UV-Licht bestrahlt, um zu sehen, welchen Effekt dieses auf die Moospflänzchen hat. Der Wachstumsverlauf wurde wöchentlich durch Photos dokumentiert.

#### 3.1.1 Versuche

Für den Vorversuch wurden 2 UV-A, 2 UV-B und 4 PAR Lampen verwendet.  
Bei allen weiteren Versuchen wurden 4 UV-B und 4 PAR Lampen verwendet.

Die Kontrollen wurden mit einer UV-undurchlässigen Folie (Ultraphan Folie) abgedeckt.

##### 3.1.1.1 Vorversuche

In den Vorversuchen wurden 4 Lampen mit sichtbaren Licht (Philips, TL 47), zwei Lampen für UV-A (Philips, TL9) und zwei Lampen für UV-B Strahlung (Philips, TL12) verwendet.

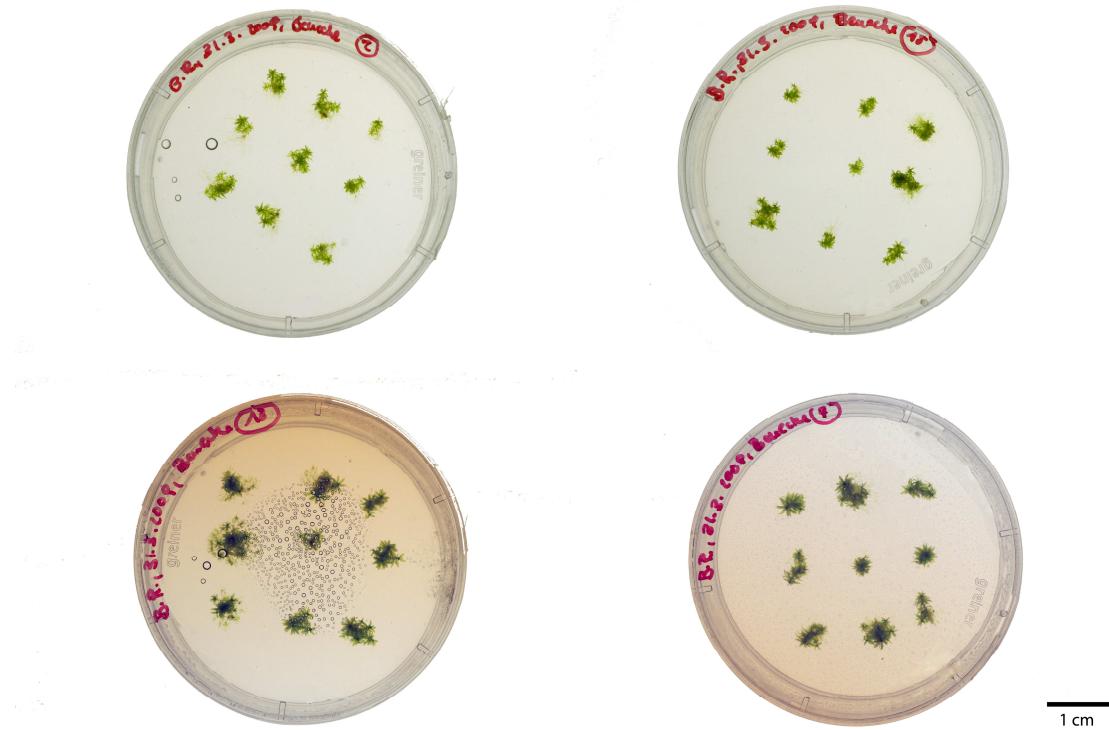


Abb.12.: *P. patens*, Vorversuch;  
obere Reihe: Kontrolle; untere Reihe: bestrahlte Pflanzen, nach 1 Woche

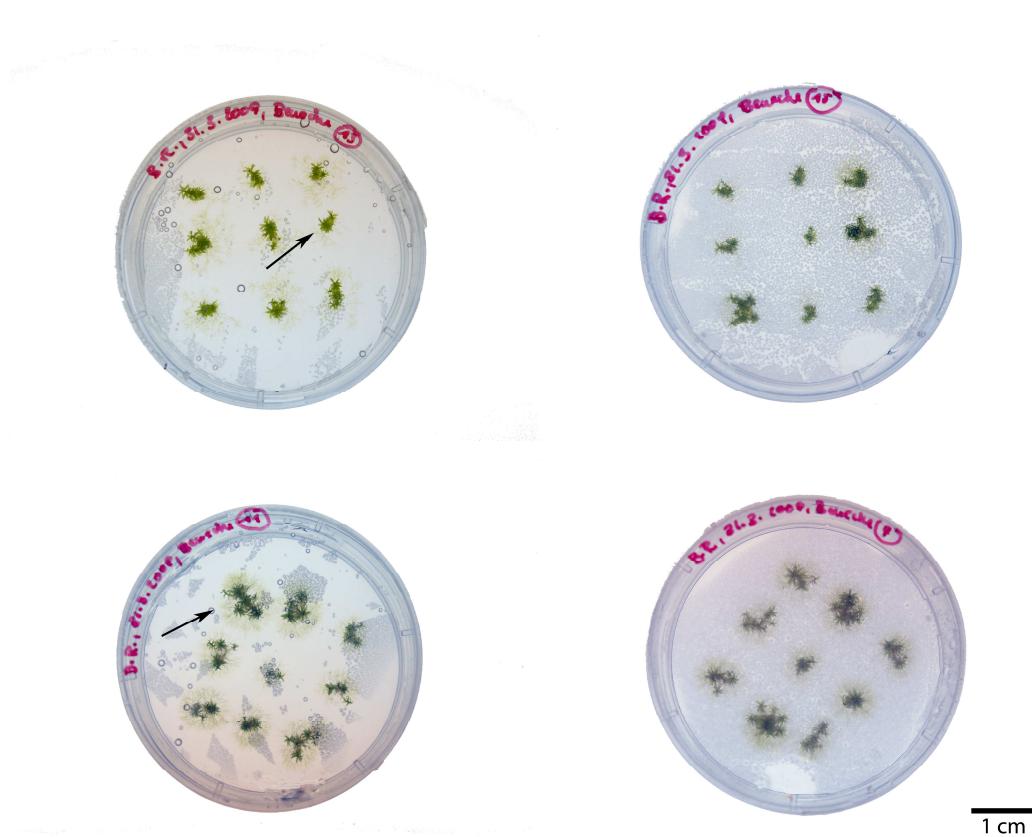


Abb.13.: *P. patens*, Vorversuch;  
obere Reihe: Kontrolle; untere Reihe: bestrahlte Pflanzen, nach 4 Wochen  
die mit Pfeilen gekennzeichneten Pflänzchen werden im Detail in Abb.14  
dargestellt

Im Vergleich zur Kontrolle waren die bestrahlten Pflänzchen oft größer, das heißt, sie bildeten mehr Biomasse und das Protonema war stark ausgeprägt.

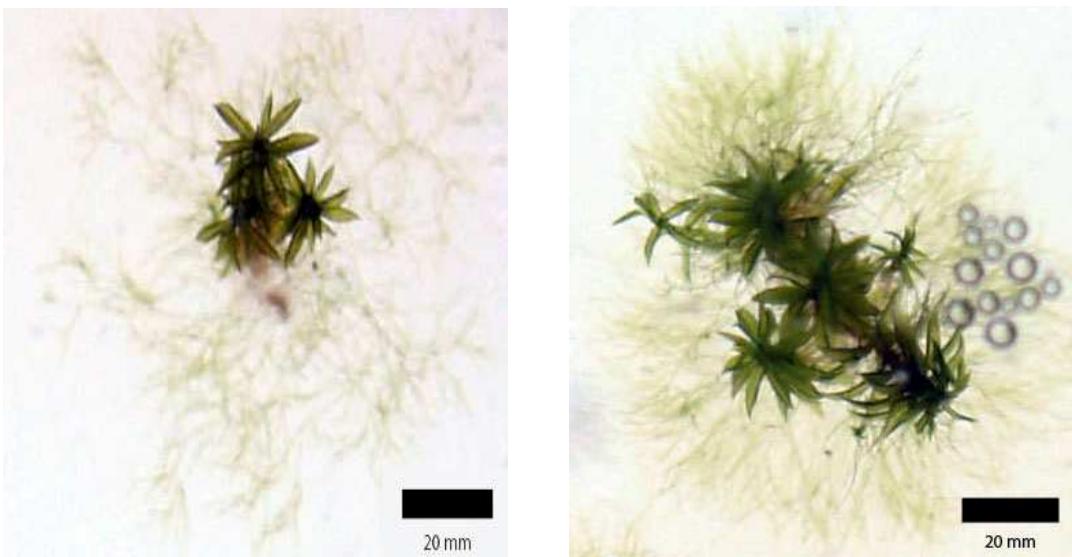


Abb.14.: *P. patens*, Vorversuch; Detail

Links: Kontrolle; rechts: bestrahlte Pflanze; nach 4 Wochen

Die UV-Strahlung schadete den Moospflänzchen nicht. Das Wachstum wurde positiv beeinflusst.

### 3.1.1.2 Versuch I

Um den UV-Stress auf die Moospflänzchen zu erhöhen, wurden die 2 UV-A Lampen durch 2 UV-B Lampen ersetzt, das heißt 4 Lampen mit sichtbarem Licht und 4 Lampen für zusätzliche UV-B Strahlung wurden verwendet.

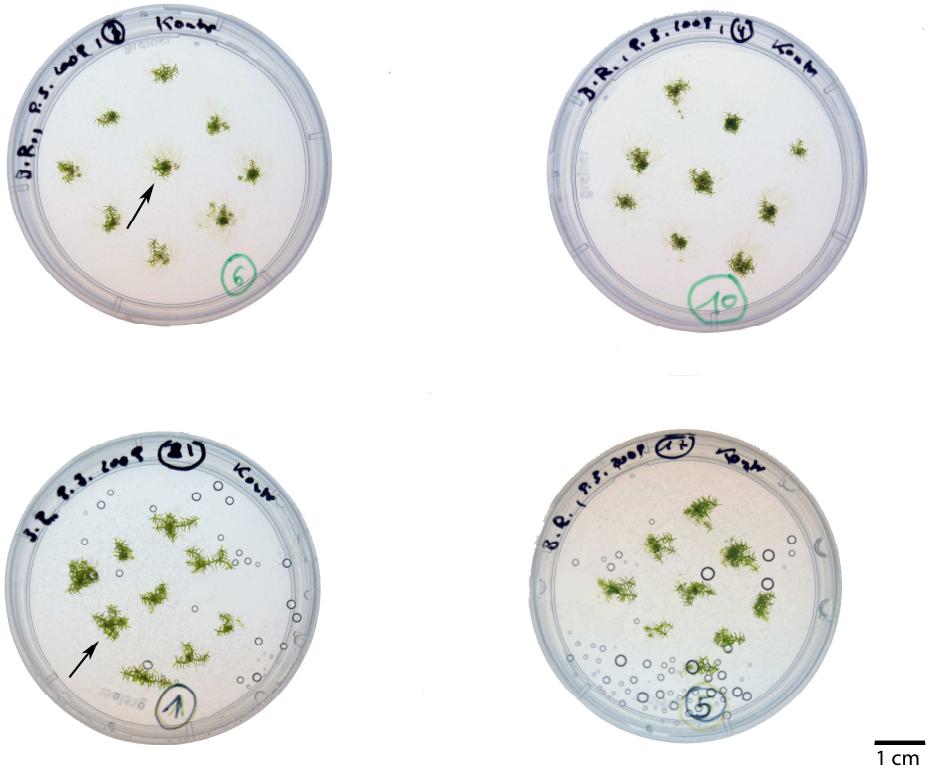
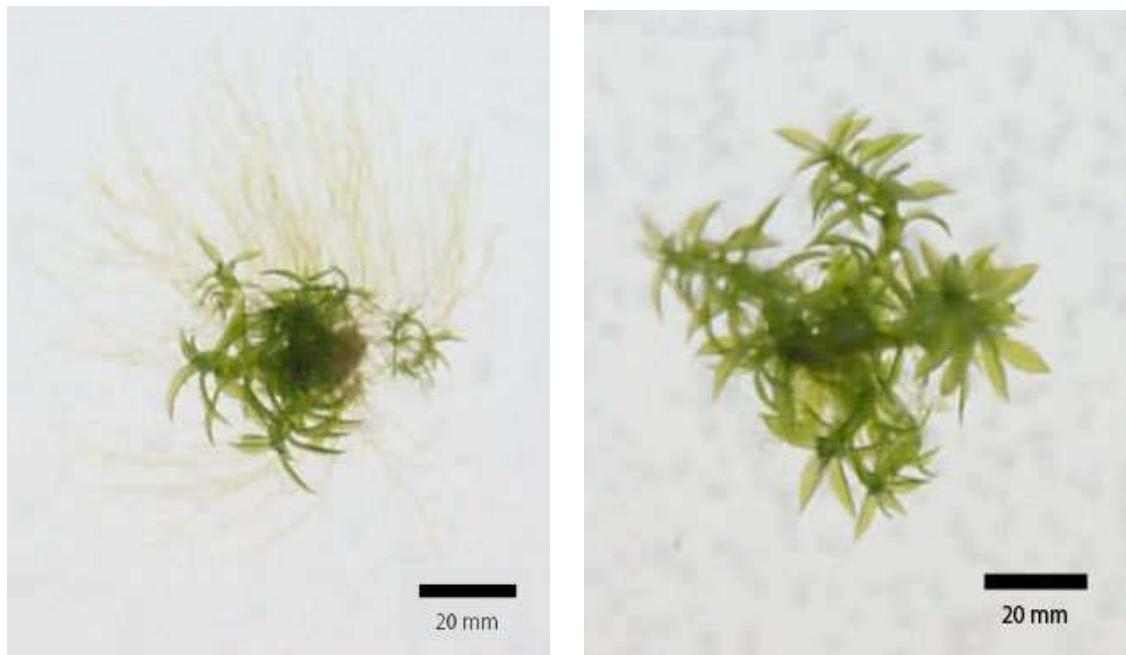


Abb.15.: *P. patens*, Versuch I.;

obere Reihe: Kontrolle, untere Reihe: bestrahlte Pflanzen, nach 4 Wochen.

Die mit Pfeilen gekennzeichneten Pflänzchen werden im Detail in Abb.16 dargestellt

Auch hier wurden die Pflänzchen nicht durch die zusätzliche Strahlung im Wachstum gehemmt, es bildete sich im Gegenteil auch hier mehr Biomasse.

Abb.16.: *P. patens*, Versuch I.; Detail

Links: Kontrolle; rechts: bestrahlte Pflanze; nach 4 Wochen

Allerdings war das Erscheinungsbild der Gametophyten nicht gleich wie in den Vorversuchen. Die Moospflänzchen waren nicht so buschartig, auch das Protonema war nicht so stark ausgebildet. Stattdessen bildeten sich um das ursprünglich überimpfte Moos viele neue kleine Gametophyten.

Das deutet darauf hin, dass die älteren Stadien der Moospflänzchen, die Gametophyten, besser mit dem UV-Stress umgehen können, als das junge Protonema.

In Abbildung 17 sieht man *P. patens* Pflänzchen, die für zwei Monate mit zusätzlichen UV-B Licht bestrahlt wurden. Hier verändert sich das Erscheinungsbild noch mehr: die bestrahlten Proben haben nicht nur mehr Protonema, sondern gleich auch neue Gametophyten gebildet.

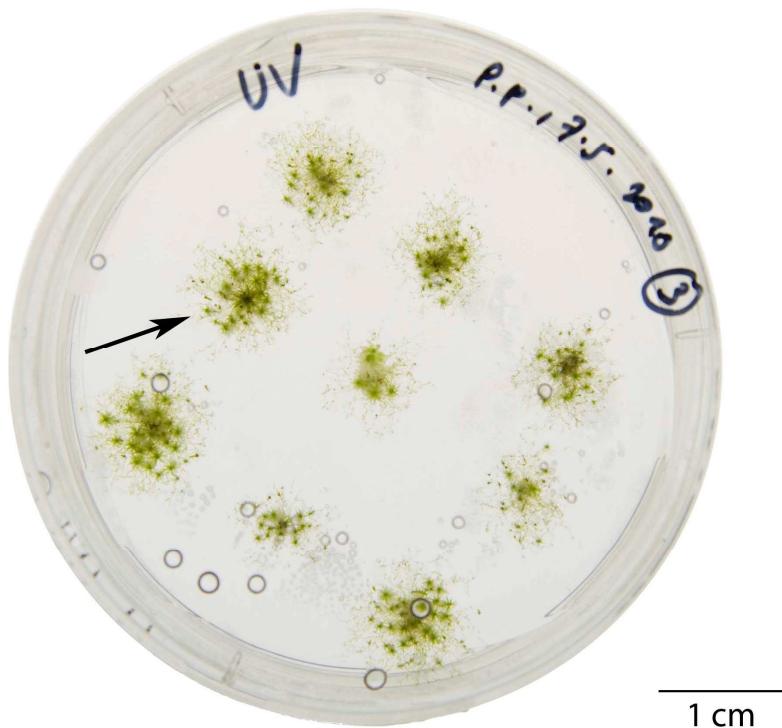


Abb.17.: *P. patens*; bestrahlte Pflanze, nach 2 Monaten  
das mit einem Pfeil gekennzeichnete Pflänzchen wird im Detail in Abb.18  
dargestellt

Abbildung 18 zeigt diese Form der Mooskolonien in einer stärkeren  
Vergrößerung.

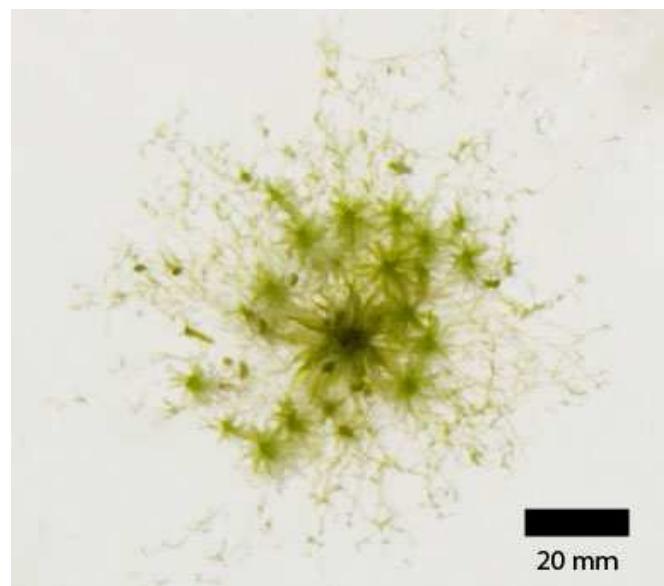


Abb.18.: *P. patens*; bestrahlte Pflanze, nach 2 Monaten, Detail

### 3.1.1.3 Versuch II

In einem weiteren Versuchsansatz wurden bei der Kultivierung nicht ganze Gametophyten umgesetzt, sondern nur einzelne Blätter. Wiederum gab es 5 bestrahlte und 5 Kontroll- Petrischalen.

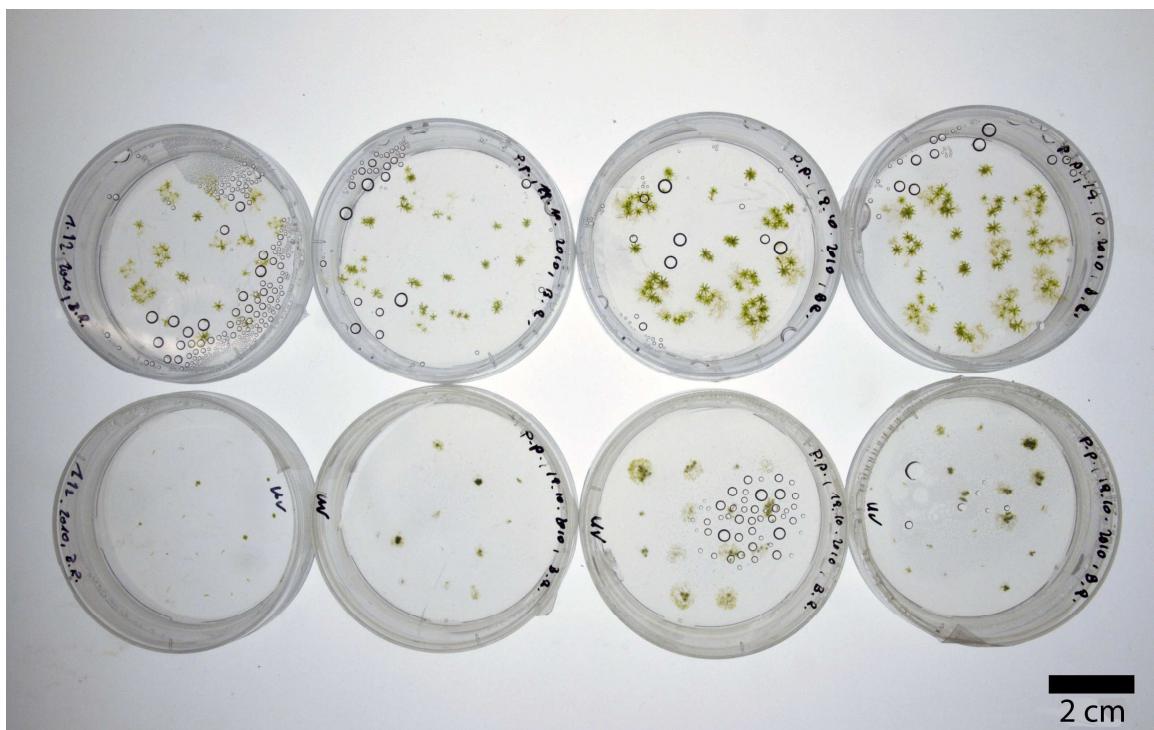


Abb.19.: *P. patens*, Versuch II; obere Reihe: Kontrolle; untere Reihe: bestrahlte Pflanzen, nach 4 Wochen

Im Gegensatz zu den anderen Versuchen wurden hier nach 4 Wochen Bestrahlung die bestrahlten Pflänzchen eindeutig in ihrem Wachstum gehemmt, während sich die nicht bestrahlten besser entwickeln konnten.

Um die Auswirkungen von UV-B Strahlung auch auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden weitere Messungen und Versuche durchgeführt, die im Folgenden beschrieben sind.

### 3.2 Zellenvermessungen

Mit dem Programm Cell-D (Olympus) ist es möglich, die Länge und die Breite von Zellen zu messen. Diese Daten sollten Aufschluss darüber geben, ob die Zellgröße durch UV-Strahlung beeinflusst wird. Alle Proben wuchsen für vier Wochen unter dem UV-Licht, die Kontrolle wurde mit Ultranaphanfolie abgedeckt. Die Messungen wurden zweimal durchgeführt.

Ausgewertet wurden die Ergebnisse mithilfe des Programs „Excel“ (Microsoft).

Bei der **ersten Messung** wurden insgesamt 135 Zellen vermessen.

Das Vermessen der Zellbreite ergab, dass die Kontrollzellen breiter waren als die bestrahlten Zellen. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Verringerung der Zellbreiten bei bestrahlten Pflanzen tatsächlich aufgrund der Strahlung resultiert, liegt bei 95,7%.

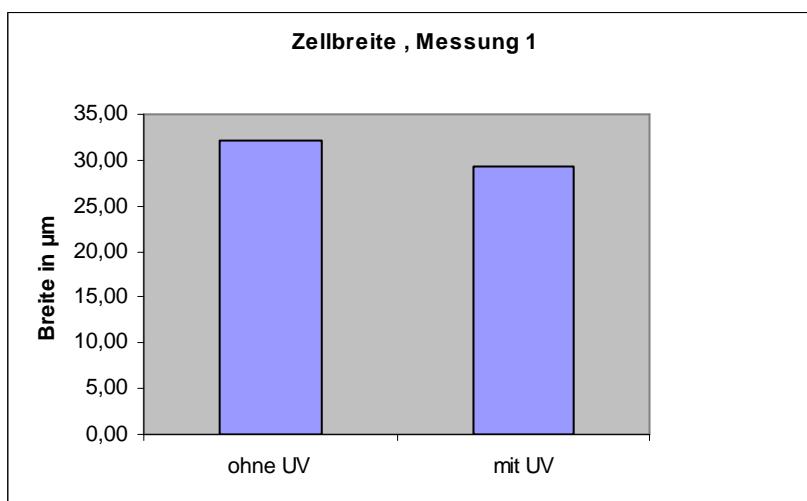
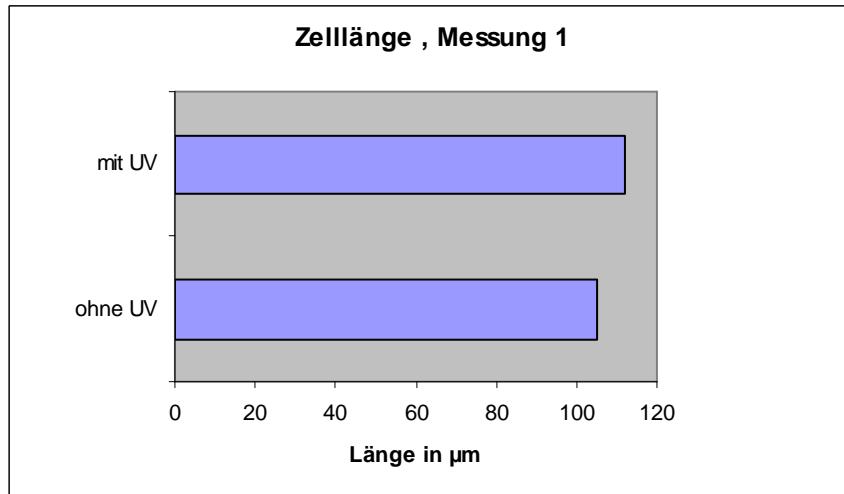
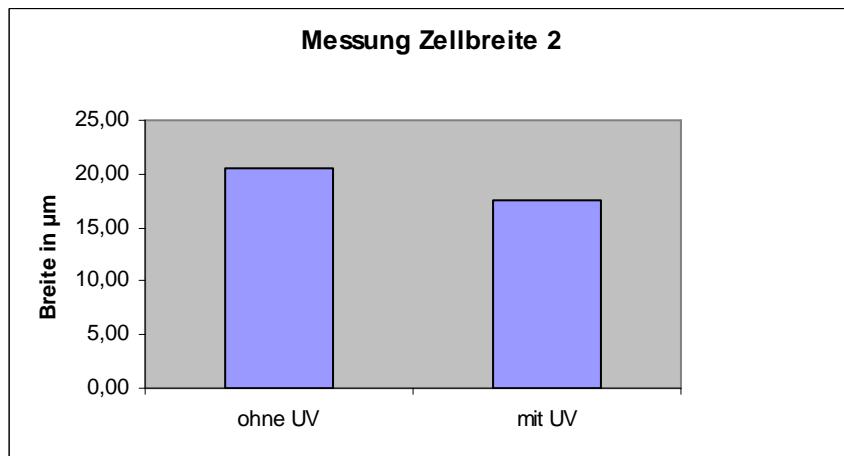


Abb.20.: Vermessung der Zellbreiten von *P. patens*

Die Vermessung der Zelllängen hat indes gezeigt, dass die bestrahlten Zellen länger sind als die Zellen der Kontrollpflanzen. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Ergebnis auf die Strahlung zurückzuführen ist, liegt bei 81,4%.

Abb.21.: Vermessung der Zelllängen von *P. patens*

Bei der **zweiten Messung** wurden insgesamt 124 Zellen gemessen. Diese Messung bestätigt die Ergebnisse der ersten Messung: auch hier sind die Kontrollzellen breiter als die bestrahlten Zellen. Hier liegt sogar ein höchst signifikantes Ergebnis vor. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Verringerung der Zellbreite auf die Bestrahlung zurückzuführen ist, liegt bei 100%.

Abb.22.: Vermessung der Zellbreiten von *P. patens*

Auch die zweite Vermessung der Zelllängen hat das Ergebnis der ersten Messung bestätigt: die bestrahlten Zellen sind länger als die Zellen der Kontrollpflanzen. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Veränderung aufgrund der Strahlung geschieht, liegt bei 97,7%.

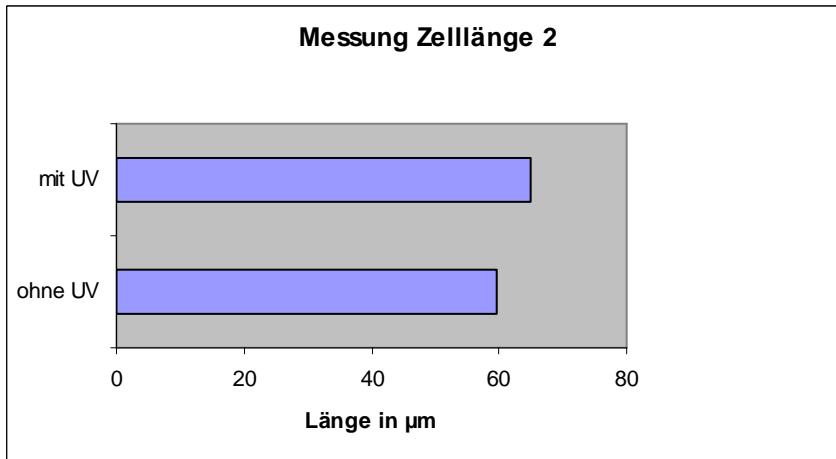


Abb.23.: Vermessung der Zelllängen von *P. patens*

Die Differenzen der Mittelwerte der Zellbreitenmessung aus Messung 1 (95,7%) und 2 (100%) sind so signifikant, dass die Nullhypothese (keine Auswirkung der UV-Strahlung) verworfen werden muss. Das heißt, dass die Verringerung der Zellbreite auf die Bestrahlung zurückzuführen ist. Das bedeutet, dass bestrahlte Zellen schmäler werden als die unbestrahlten Zellen.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild: bestrahlte Zellen bilden schmälere, aber dafür längere Zellen, während die Kontrollzellen breiter und kürzer sind.

### 3.3 Färbungen

#### 3.3.1 DAPI-Färbung

Um zu sehen, welche Wirkung die UV-Bestrahlung auf die Zellen (länger/schmäler, kürzer/breiter) hat, wurde DAPI als Kernmarker verwendet und so die Zell-Zahl ermittelt.

Mithilfe des Programms „Cell-D“ war es möglich, die Menge der Zellkerne auf einer bestimmten Fläche quantitativ zu erfassen und so die bestrahlten mit den nicht bestrahlten Pflanzen in Gegensatz zu stellen. Flächen von  $100 \mu\text{m}$  mal  $100 \mu\text{m}$ , insgesamt 307 Zellen, wurden vermessen.

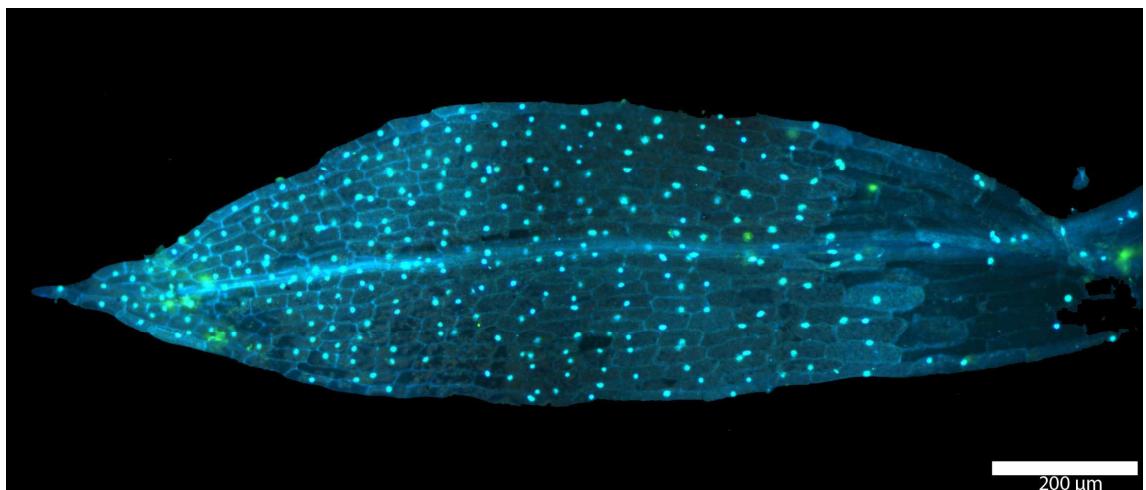


Abb.24.: *P. patens*, DAPI, Kontrolle

Es wurden 153 Messungen an Kontrollproben vorgenommen. Insgesamt wurden 1683 Zellkerne gezählt, das ergibt einen Mittelwert von 11 Zellkernen pro  $100 \mu\text{m}$  mal  $100 \mu\text{m}$  Fläche.

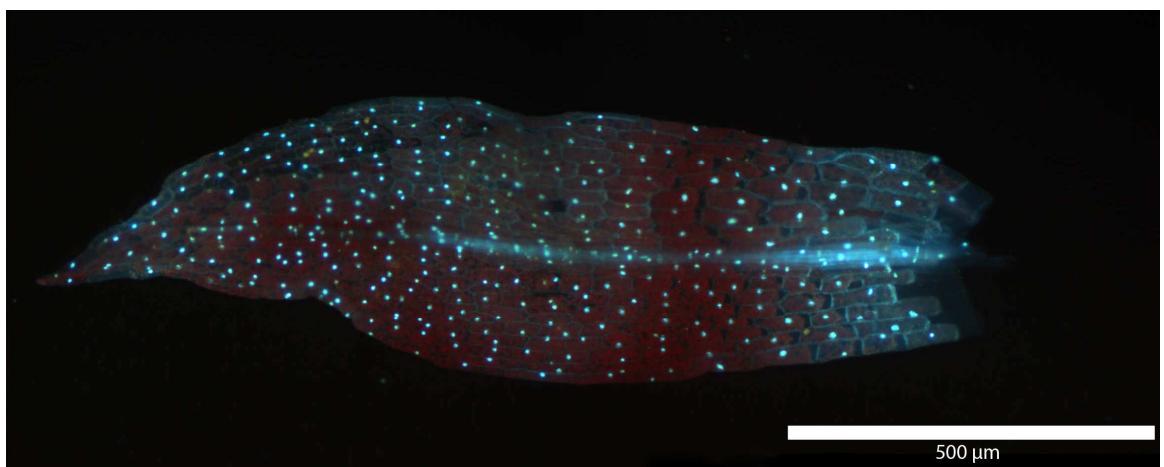


Abb.25.: *P. patens*, DAPI, UV-bestrahlt

In bestrahlten Proben wurden 154 Messungen durchgeführt. 1630 Zellkerne wurden gezählt, das bedeutet, dass sich im Durchschnitt 10,58 Zellkerne auf einer Fläche von  $100 \mu\text{m}$  mal  $100 \mu\text{m}$  befinden.

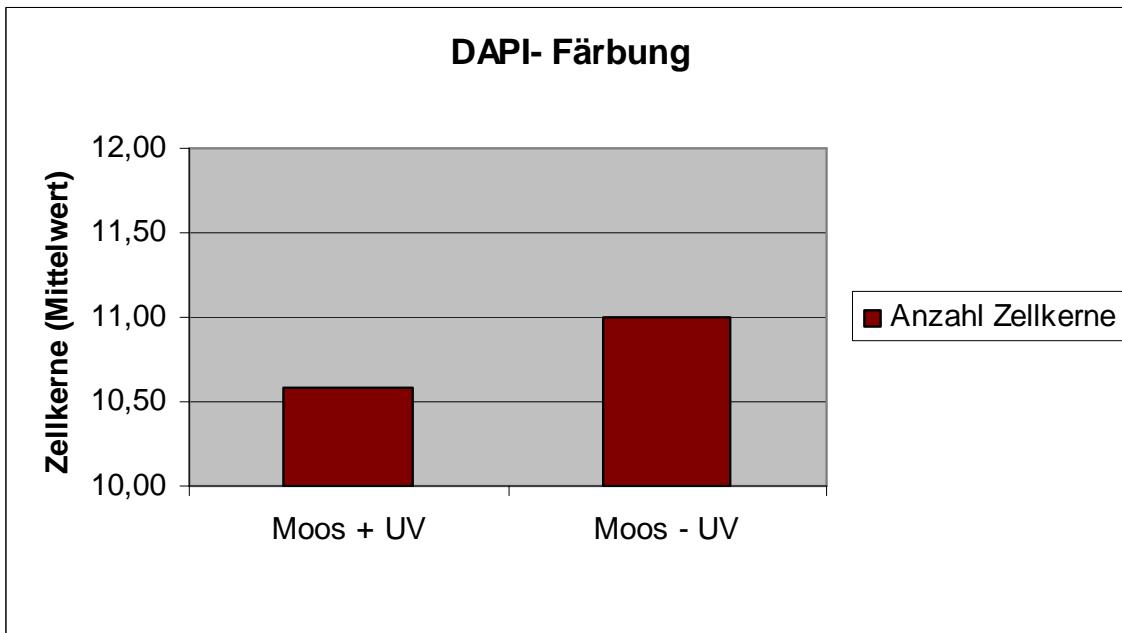


Abb.26.: Anzahl der Zellkerne

Daraus geht hervor, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Zahl der Zellkerne zwischen bestrahlten und Kontrollpflänzchen gibt. Das Ergebnis deckt sich auch mit dem Ergebnis der Zellvermessung: trotz der Formveränderungen der Zellen befinden sich gleich viele Zellen auf einer definierten Fläche.

### 3.3.2 NBT-Färbung

Um zu sehen, ob die UV-Bestrahlung Einfluss auf den Energiestoffwechsel hat, wurde eine Färbung mit NBT durchgeführt.

Bestrahlt wurden die Zellen mit Hilfe des UV-Mikroskops mit einer Wellenlänge von 310 nm.

#### 3.3.2.1 *P. patens*

Bei den Blättern von *P. patens* kam es bereits nach 2 Stunden zu einer leichten Färbung der unbestrahlten Kontrolle durch Formazanbildung.

Nach 5 Stunden war die Formazanbildung in der unbestrahlten Kontrolle weit fortgeschritten, die Chloroplasten waren stark dunkelblau gefärbt. Eine Bestrahlung für 15 und 30 Sekunden führte zu einer leichten Färbung der

Chloroplasten. Bei den für 45 Sekunden bestrahlten Zellen hingegen konnte gar keine Färbung beobachtet werden.

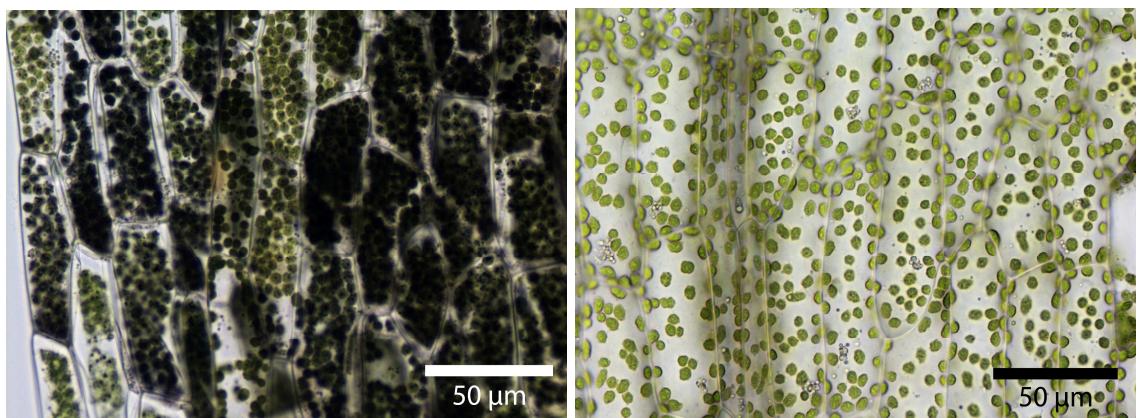


Abb.27.: *P. patens*, behandelt mit NBT, nach 5 h Inkubationszeit;  
links: unbestrahlte Kontrolle, rechts: 45 sec bestrahlt

Die Ergebnisse der Versuche zeigen eine klare Formazanbildung bei den unbestrahlten Kontrollzellen, bei leicht bestrahlten Zellen setzt die Färbung zeitverzögert ein, während bei stärkerer Bestrahlung die Färbung ganz gehemmt wurde. Dies deutet darauf hin, dass der Stoffwechsel durch die direkte UV-Bestrahlung gestört wurde.

### 3.4 UV-Mikroskopie

Das UV-Mikroskop ist ein Durchlichtmikroskop, in dem eine Probe mit einer gewünschten Wellenlänge (von 290 bis 700 nm) bestrahlt werden kann. Kurze Wellenlängen führen zu besserer Auflösung und zu höherem Kontrast, da Proteine kurzwellige Strahlung absorbieren (Pauluzzi *et al.* 1996). Dadurch können auch besonders feine, sonst kaum erkennbare Strukturen in ungefärbten Präparaten sichtbar gemacht werden. Abbildung 28 zeigt die unterschiedliche Auflösung bei verschiedenen Wellenlängen. Außerdem ist es auf diese Weise auch möglich, den direkten Einfluss bestimmter Wellenlängen im UV-Bereich bis zum sichtbaren und IR-Spektrum auf lebende Zellen zu beobachten.

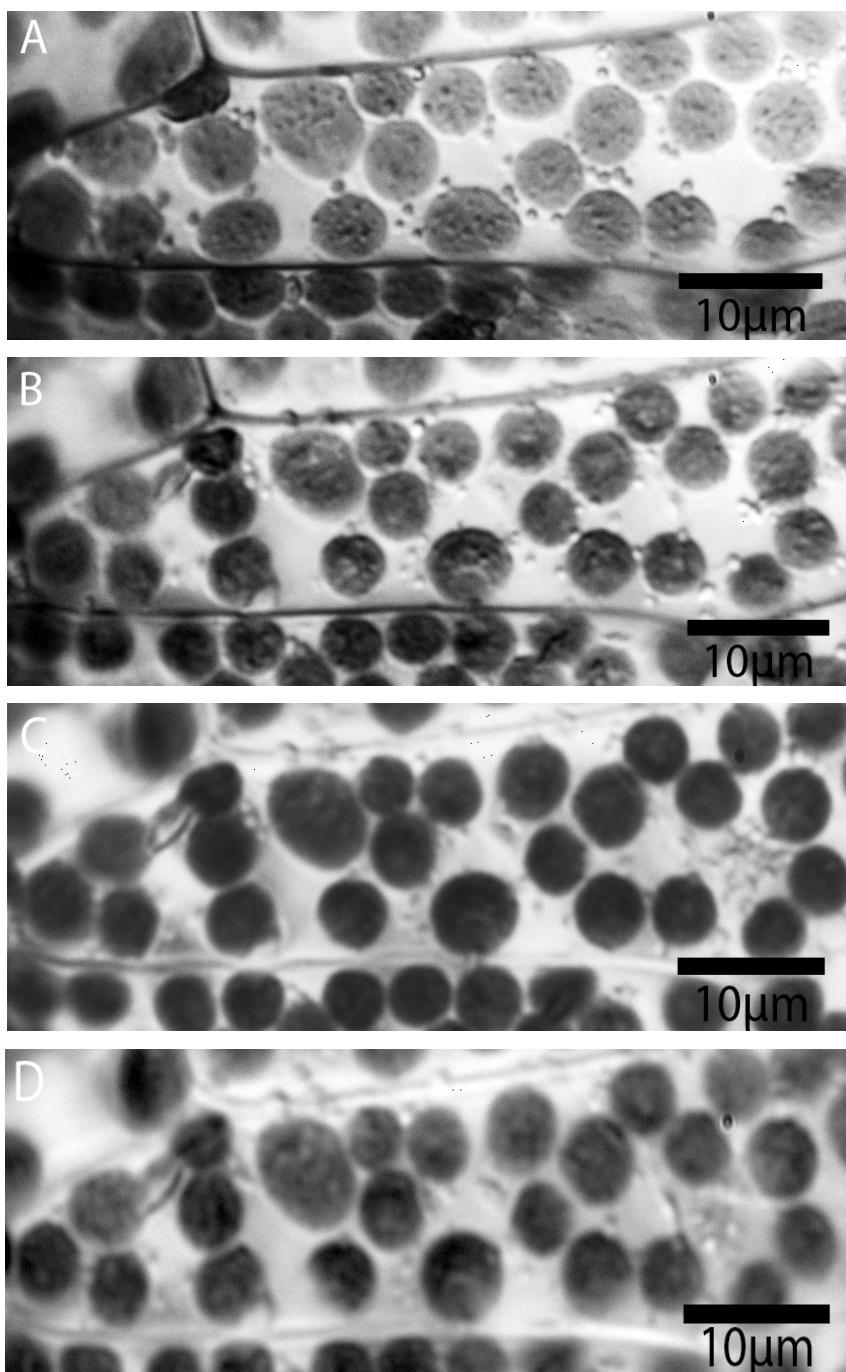


Abb.28.: *P. patens*, Kontrolle;

Wellenlängenserie am Bsp. der Chloroplasten und kleinen Vesikeln

- A: 300 nm + B: 360 nm: Chloroplasten haben einen scharfen Rand und kleine Vesikel sind deutlich am und auf den Chloroplasten zu erkennen  
C: 420 nm + D: 500 nm: mit zunehmender Wellenlänge wird die Kontur der Chloroplasten zunehmend unscharf und kleine Organellen sind kaum aufgelöst

Die verwendete Quecksilberdampflampelampe weist zwei energiereiche Peaks im ihrem Strahlungsspektrum auf. Diese liegen bei den Wellenlängen 364 nm und 310 nm. In dieser Arbeit wurden die Aufnahmen meist bei 364 nm gemacht, da in diesem Bereich die besten Aufnahmen mit der UV-sensitiven Kamera gemacht werden konnten.

Direkte Bestrahlungen von Zellen wiederum, wie bei der NBT-Färbung, wurden mit einer Wellenlänge von 310 nm durchgeführt.

Strukturen, die mit dem UV-Mikroskop sehr gut erkennbar waren, waren zum Beispiel die Grana innerhalb der Chloroplasten, sowie auch die kleinen Ölkörperchen der Mooszellen, die aufgrund der starken Lichtbrechung gut erkennbar waren (Abb. 29A). Oft kam es zu Ansammlungen dieser Elaioplasten (Abb. 29B). Ob diese Anhäufungen durch UV-Strahlung induziert werden, oder wodurch sie sonst gebildet werden, ist noch nicht geklärt.

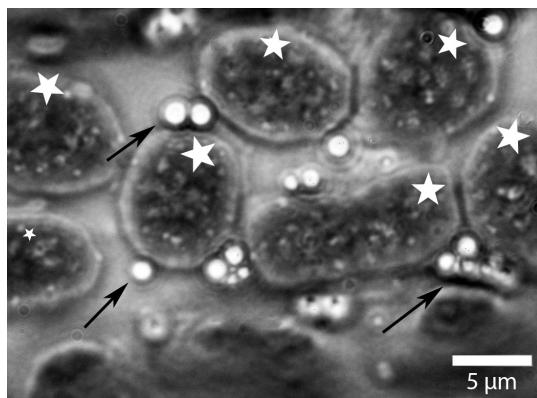
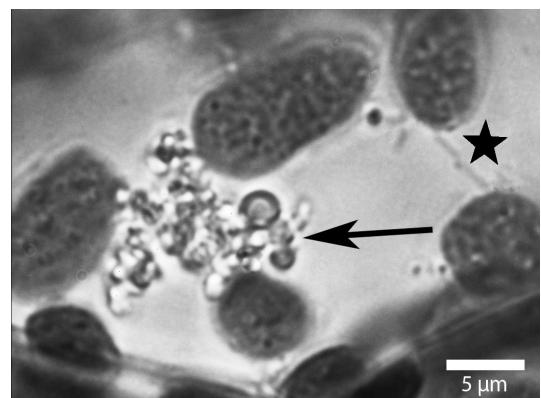


Abb.29.: A) *P. patens*, Kontrolle  
Ölkörperchen (Pfeile)  
Chloroplasten mit Grana (Sterne)



B) *P. patens*, Kontrolle  
Ansammlung von Ölkörperchen  
ER-Schlauch (Stern)

Ein weiteres gut erkennbares Zellorganell ist der Zellkern. Abbildung 30 zeigt einen Zellkern einer unbestrahlten Probe, bei dem auch nach einer Bestrahlung von einer halben Stunde mit UV-Licht (mit 364 nm) des UV-Mikroskops keine morphologischen Veränderungen erkennbar sind.

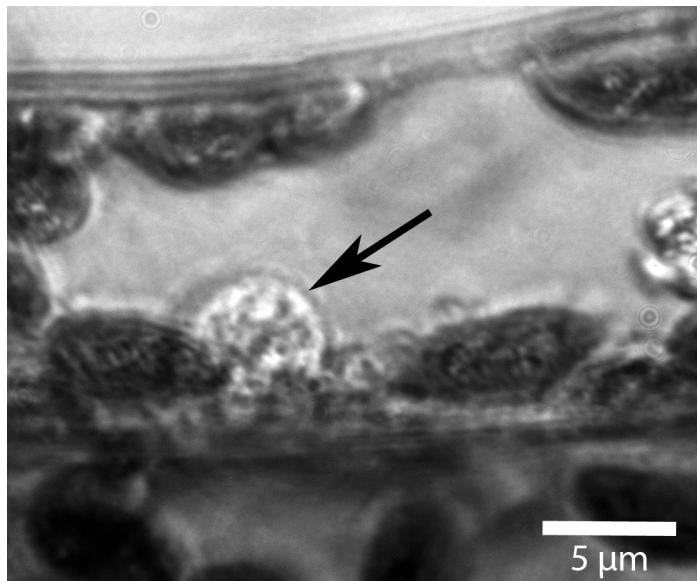


Abb.30.: *P. patens*, Kontrolle; 364 nm  
Zellkern (Pfeil)

Auch Mitochondrien konnten beobachtet werden. Wie man in Abbildung 31 erkennen kann, sind diese Mitochondrien einer unbestrahlten Probe eng mit den Chloroplasten assoziiert und sehen normal aus, das heißt sie sind schmal und länglich. Auch trotz einer halbstündigen Bestrahlung mit UV-Licht mit der Wellenlänge 364 nm sind keine Veränderungen erkennbar. Nur wenn sich die Chloroplasten bewegen, so folgen ihnen auch die Mitochondrien.

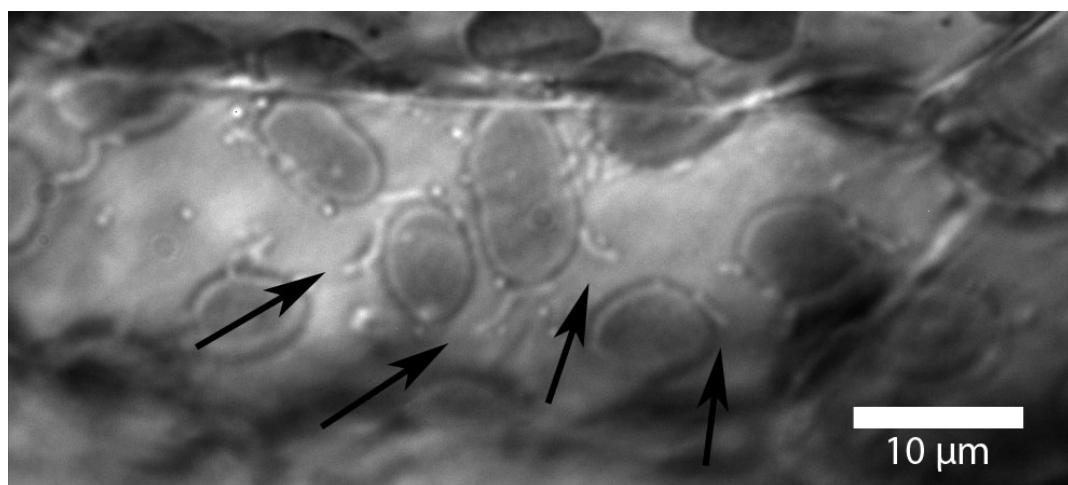


Abb.31.: *P. patens*, Kontrolle; 364 nm  
Mitochondrien (Pfeile)

Auch die schlauch- oder/und blasenförmige Strukturen des endoplasmatischen Retikulums (ER) waren gut zu erkennen (Abb. 30), oft lagen mehrere schlauchartige Gebilde eng nebeneinander. In Innenepidermiszellen der Zwiebelschuppe von *Allium cepa* wurden diese Strukturen als „intraplasmatische Vakuolen“ bezeichnet (Url 1964b).

Durch die Bestrahlung mit UV-Licht kann es nicht nur zu DNA-Schäden, sondern möglicherweise auch zu Brüchen der Aktinmikrofilament-Bündel kommen, die normalerweise das ER in ihrer länglichen Form halten.

In Abbildung 32 sind ER-Schlüsse erkennbar, die stark aufgequollen sind und dadurch einen deutlich größeren Durchmesser haben (Abb. 32).

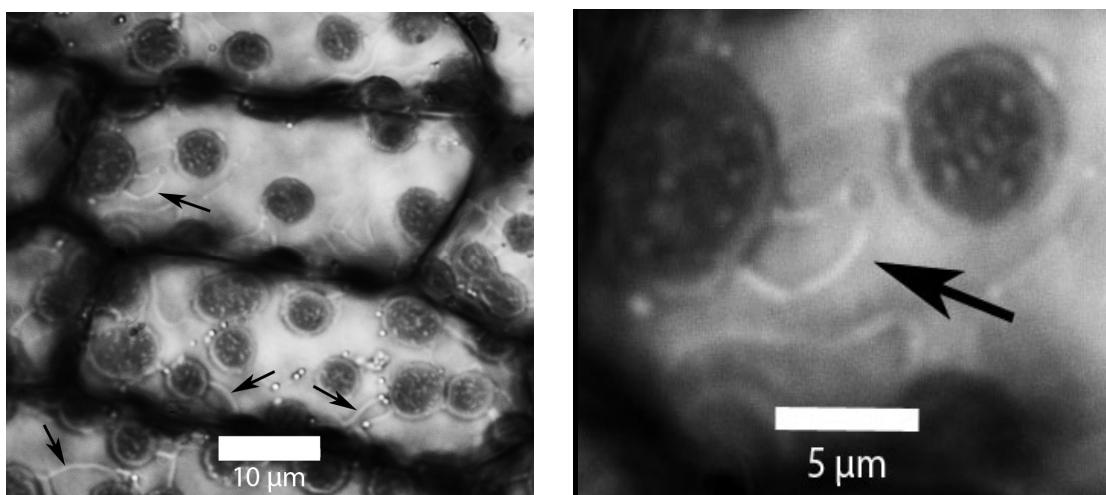


Abb.32.: *P. patens*, geschädigte Zellen; 364 nm

links: ER-Schlüsse (Pfeile) rechts: ER-Schlüsse im Detail

Auch die Chloroplasten wurden vom UV-Licht beeinflusst. Bei direkter Bestrahlung mit 364 nm begannen die Chloroplasten innerhalb der Zelle zu wandern. In Abbildung 33 sieht man, wie sich die Chloroplasten innerhalb von 30 Minuten von der Mitte weg immer weiter zum Rand bewegten. Auch hier kann man wieder ER-Schlüsse erkennen.

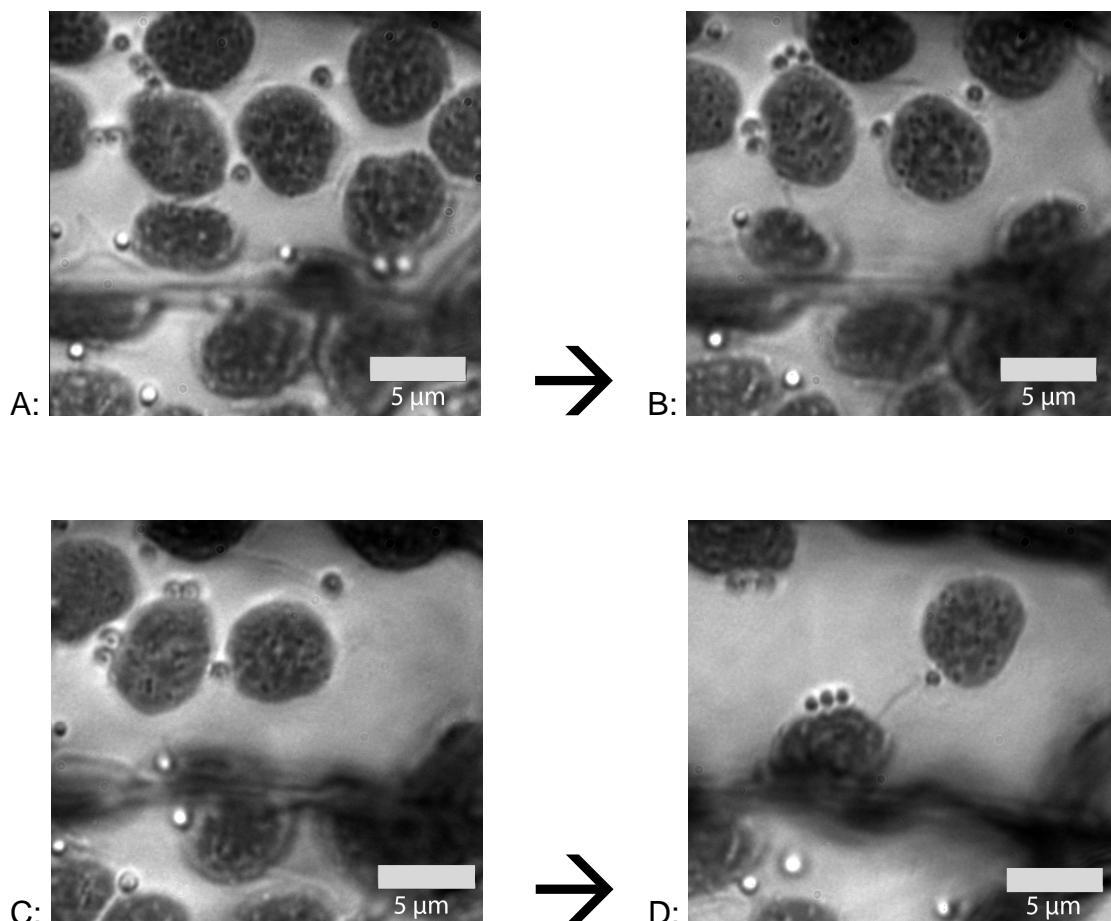


Abb.33.: *P. patens*, Kontrolle; 364 nm; Chloroplastenbewegung: je länger die Bestrahlung mit UV-Licht, desto mehr drängen sich die Chloroplasten an den Zellrand (A: 0 min, B: 10 min, C: 20 min, D: 30 min)

### 3.4.1 Behandlung mit dem Toxin Latrunculin-B

Um Festzustellen, wie schnell das Toxin wirkt, wurden zuerst Zellen von *Allium cepa*- mit besser sichtbarer Organellenbewegung- mit Latrunculin-B behandelt. Innerhalb von fünf bis zehn Minuten stoppt die Bewegung.

Bei Lang-Pauluzzi (1999) wird beschrieben, dass in *Allium cepa* Zellen nach der Behandlung mit  $10^{-7}$  M Latrunculin-B die Organellenbewegung innerhalb weniger Sekunden stoppt. Dies deutet auf eine schnelle Destabilisierung der Aktinfilamente hin.

Nur ein kleiner Tropfen einer  $10^{-5}$  M Latrunculin-B Lösung reichte aus, um auch die Organellenbewegung in den Blättern von *P. patens* zu stoppen.

Dies war allerdings nicht so leicht festzustellen, da die Organellen auch unter normalen Umständen nur sehr langsam strömen. Deswegen wurde auch hier ein Fokus auf die Chloroplasten gelegt, die sich normalerweise unter UV- und Starklichteinfluss an den Rand bewegen.

Bei einer Behandlung mit Latrunculin-B kam es aber zu keiner weiteren Bewegung mehr. Auch nach einer Stunde befanden sich die Chloroplasten noch an demselben Platz. Dies ist in Abbildung 34 durch Pfeile im rechten und linken Bild dargestellt. Das deutet darauf hin, dass die Aktinfilamente zerstört wurden und die Organellenbewegung gestoppt wurde.

Nur die kleinen Ölkörperchen schienen in ihrer Bewegung nicht eingeschränkt zu sein. Diese wurden nicht von dem Toxin beeinflusst, da sie sich innerhalb der Vakuole befinden, sie bewegen sich in den behandelten und in den Kontrollproben mit Brown'scher Molekularbewegung.

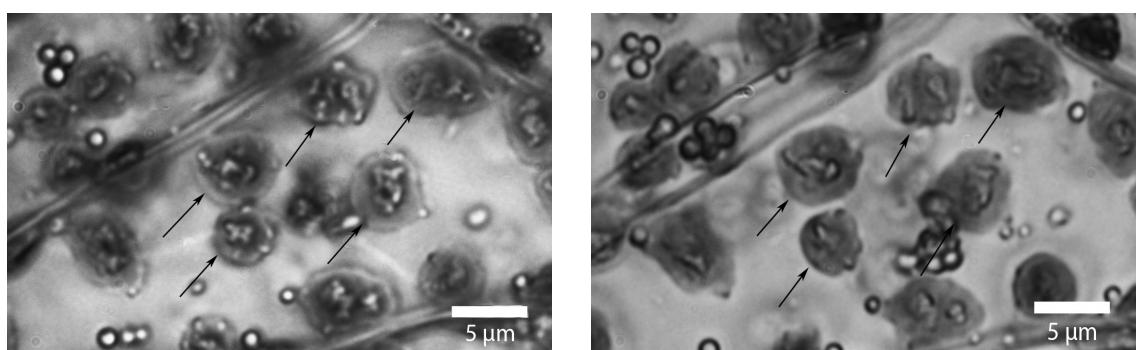


Abb.34.: *P. patens*, behandelt mit Latrunculin-B;  
links: nach 5 min Inkubation; rechts: nach 1 h Inkubation  
Die Pfeile zeigen auf die Position der Chloroplasten

### 3.4.2 Alexa-Phalloidin Färbung

Um die Position der Aktinfilamente genauer zu analysieren, wurden die Mooszellen mit Phalloidin gefärbt. Phalloidin ist ein Toxin aus der Gruppe der

Phallotoxine und ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Alexa) gekoppelt. Es bindet spezifisch an F-Aktin und macht so diesen Teil des Cytoskeletts sichtbar.

Da sowohl im UV- als auch im Lichtmikroskop ein Effekt der Strahlung auf die Chloroplasten zu sehen war, wollten wir sehen, ob es in *P. patens* zwischen den Chloroplasten und den Aktinmikrofilamenten eine enge Verbindung gibt.

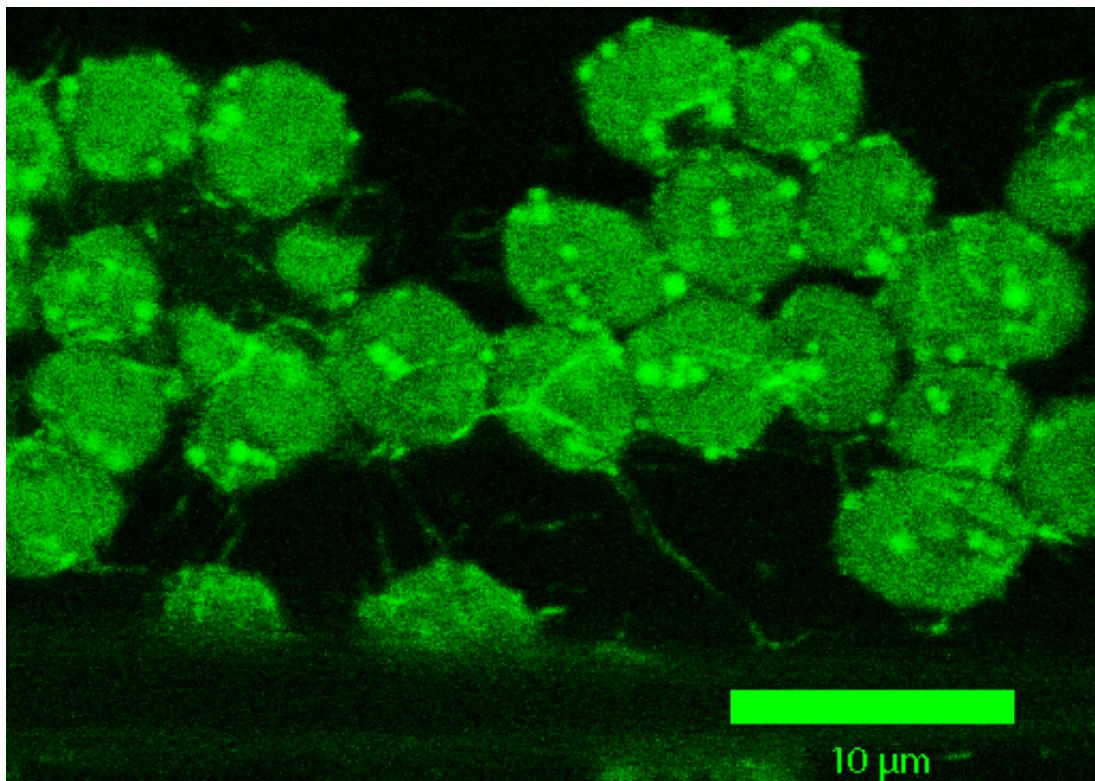


Abb.35.: *P. patens*, Kontrolle, Alexa Phalloidin Färbung

Die Chloroplasten werden regelrecht von den Aktinfilamenten umspinnen (Abb. 35). Die Färbung der *P. patens* Zellen mit Alexa Phalloidin hat eindeutig gezeigt, wie eng die Chloroplasten und die Aktinmikrofilamente miteinander verbunden sind.

### 3.5 High Pressure Liquide Chromotography (HPLC)

Mit Hilfe der High Pressure Liquide Chromotography, kurz HPLC, sollte gezeigt werden, ob in *P. patens* durch zusätzliche UV-Bestrahlung bestimmte durch Stress gebildete Inhaltsstoffe vorkommen.

Dank der freundlichen Unterstützung des Departments „Chemical Ecology and Ecosystem Research“ der Universität Wien waren diese Messungen möglich.

Es wurden drei bestrahlte Proben, die 4 Wochen lang dem erhöhten UV-Stress ausgesetzt waren, und drei Kontrollproben verwendet. Die Probenvorbereitung erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben.

Die Ergebnisse sind als Kurven in Abbildung 36 dargestellt. Die drei blauen Peaks zeigen die Benzoesäure-Werte für die UV-bestrahlten Proben. Der erste Peak liegt bei 1800 und ist somit besonders hoch, mit 1190 liegt der zweite Wert in der Mitte und der letzte bei 970 ist also relativ niedrig. Die Werte der Kontrollproben liegen allesamt im Mittelfeld, zwischen 1150 bis 1480.

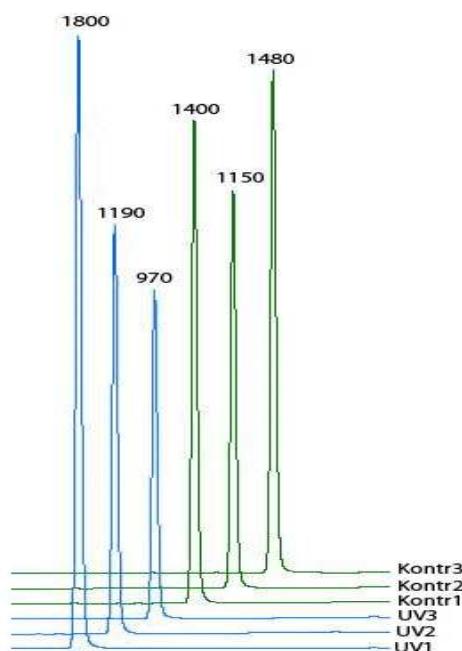


Abb.36.: Die HPLC-Peaks für die drei bestrahlten und die drei Kontrollproben

Der bei der HPLC gefundene Hauptbestandteil ist Benzoësäure, eine einfache aromatische Carbonsäure. Allerdings kommt diese nicht nur in den bestrahlten Proben, sondern auch in der Kontrolle vor. Daher kommt es zu keinem signifikanten Ergebnis. Das kann daran liegen, dass auch die Kontrollpflänzchen irgendeiner Art von Stress ausgesetzt waren. Es wird angenommen, dass ein erhöhtes Vorkommen an Benzoësäure in Pflanzen eine allgemeine Reaktion auf Stress ist (Seneratna *et al.* 2003).

Außer Benzoësäure wurden keine weiteren Verbindungen gemessen (wie zum Beispiel Flavonoide).

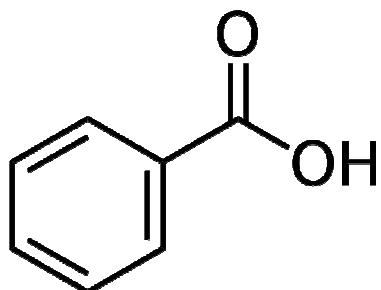


Abb.37.: chemische Struktur von Benzoësäure<sup>6</sup>

---

<sup>6</sup> <http://de.wikipedia.org/wiki/Benzoësäure>

## 4 Diskussion

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen von UV-Strahlung auf das Moos *P. patens*.

Da Moose im Vergleich zu höheren Pflanzen keine schützende Kutikula oder Behaarung der Blättchen besitzen, musste von besonderen Auswirkungen der UV-Strahlung auf diese Organismengruppe ausgegangen werden. Des Weiteren besitzen Moosgametophyten während ihrer dominanten Phase im Lebenszyklus ein haploides Genom. Dadurch war anzunehmen, dass Schädigungen der DNA in diesem Zyklus besonders dramatisch sind.

Andererseits haben Moose, beziehungsweise deren Vorfahren, schon vor ca. 450 Millionen Jahren, im Ordovizium, auf der Erde existiert (Zimmer *et al.* 2007); damals war die UV-Strahlung, die die Erdoberfläche erreicht hat, um vieles höher als heute. Daher kann man erwarten, dass sich schon damals Schutzmechanismen und entsprechende Signalwege entwickelt haben, die auch heute noch in allen Landpflanzen zu finden sein sollten (Wolf *et al.* 2010).

Daher kann man hoffen, dass Moose auch weiterhin in den Polregionen der Erde relativ ungestört weiterwachsen werden, obwohl gerade jene Gebiete von den schädlichen Einflüssen des Klimawandels, wie zum Beispiel besonders hoher UV-B Strahlung durch reduzierte Ozonschicht, betroffen sind.

Wie Pflanzen nun genau mit UV-Strahlung umgehen, hängt davon ab, wie viel UV-Strahlung sie ausgesetzt sind und in welcher Umwelt sie wachsen und bestrahlt werden. Oft sind Pflanzen, die in ihrer natürlichen Umgebung wachsen, weniger UV-sensitiv als Pflanzen, die in einem Glashaus oder in Klimakammern wachsen (Caldwell & Flint 1994).

In einem Review von Boelen *et al.* (2006) wird zusammengefasst, dass beinahe alle Freilandstudien gezeigt haben, dass Moose sehr gut an UV-Strahlung angepasst sind, und dass das Wachstum kaum beeinträchtigt wird. Auch Rozema *et al.* (2005) kommen zu dem Schluss, dass Bryophyten trotz ihrer nicht differenzierten Blätter, die oft nur aus einer Zellschicht bestehen, nicht

empfindlicher auf UV-Licht reagieren als andere Gefäßpflanzen und teils einen guten Schutz gegen UV-Strahlung entwickelt haben.

## 4.1 UV-Bestrahlung von *P. patens*

Als Versuchsobjekt wurde das Laubmoos *P. patens* verwendet und vier Wochen lang mit zusätzlichem UV-B bestrahlt. Unter normalen Umständen lebt *P. patens* an sonnenexponierten Standorten (Rensing *et al.* 2009), daher kann davon ausgegangen werden, dass es gut mit UV-Stress umgehen kann.

Die verwendeten UV-Lampen wurden mit einer Celluloseacetatschicht umgeben, die die sehr kurzwellige, schädliche, und in der Natur nicht vorkommende UV-B Strahlung absorbiert. Sobald allerdings die schützende Celluloseacetatfolie entfernt wird, kommt es zu sehr starker Ausbleichung der Blätter. Auch bei den Versuchen von Wolf *et al.* (2010) kommt es bei einer Bestrahlung der kleinen Moospflänzchen mit höher dosiertem UV-B außer einigen gebleichten Stellen zu keinen weiteren Schäden.

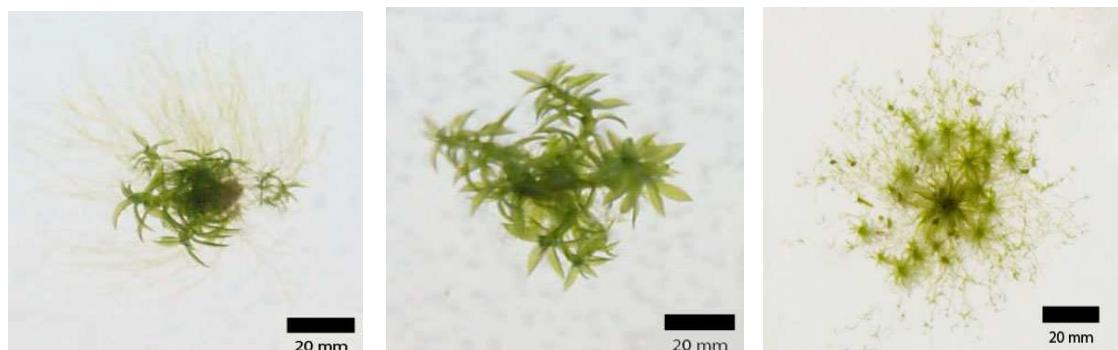
### 4.1.1 Wachstumsversuche

Der Vorversuch (UV-A und UV-B Lampen) zeigt einen eindeutigen Unterschied. Abbildung 38 zeigt links die Kontrollpflanze, und rechts die mit UV-A und –B bestrahlte Pflanze: nach 4 Wochen Bestrahlung hat das bestrahlte Pflänzchen eindeutig mehr Protonema und auch Gametophyten ausgebildet, als die Kontrolle.

Abb.38.: *P. patens*, Vorversuch; Detail

Links: Kontrolle; rechts: bestrahlte Pflanze; nach 4 Wochen

Auch in Versuch I (nur UV-B Lampen) kommt es zu einem deutlichen Biomassezuwachs nach vier Wochen Bestrahlung. Abbildung 38 fasst dieses Ergebnis zusammen.

Abb.39.: *P. patens*, Versuch I.; Detail

Links: Kontrolle, nach 4 Wochen; Mitte: bestrahlte Pflanze, nach 4 Wochen;  
Rechts: bestrahlte Pflanze, nach 2 Monaten

Nach vier Wochen haben die bestrahlten Pflänzchen weniger Protonema als die Kontrollpflänzchen. Dafür erscheinen die Pflänzchen kompakter. Nach 2 Monaten aber haben die bestrahlten Proben nicht nur mehr Protonema, sondern gleich auch neue Gametophyten gebildet. Dies bestätigt die Überlegung, dass die älteren Gametophyten, im Gegensatz zum jungen Protonema, besser an UV-Strahlung angepasst sind.

Einige Freilandstudien, die UV-Strahlung an Bryophyten untersuchten, kamen zu demselben Ergebnis: fast alle Studien zeigten, dass Moose gut an UV-B

Strahlung angepasst sind, und dass sich die Strahlung kaum auf das Wachstum auswirkt. Langzeitstudien haben gezeigt, dass sich die Biomasseproduktion kaum ändert, die UV-B Strahlung aber Auswirkungen auf das Wachstum des Sprosses haben kann (Boelen *et al.* 2006).

Eine altersabhängige Empfindlichkeit gegen UV-B wurde auch bei höheren Pflanzen gefunden. In der Studie von Wolf *et al.* (2010) wurde gezeigt, dass Jungpflanzen von *Arabidopsis thaliana* mit UV-B Strahlung viel schlechter umgehen können als die Gametophyten von *P. patens*.

Der zweite Bestrahlungsversuch, bei dem nicht ganze Gametophyten, sondern nur einzelne Blätter umgesetzt wurden, zeigt allerdings eine starke Hemmung im Wachstum. Dieser Versuch bestätigt die Ergebnisse von Versuch I: es scheint nun eindeutig, dass die jüngeren Stadien von *P. patens* schlechter mit UV-Stress umgehen können, als die älteren Stadien.

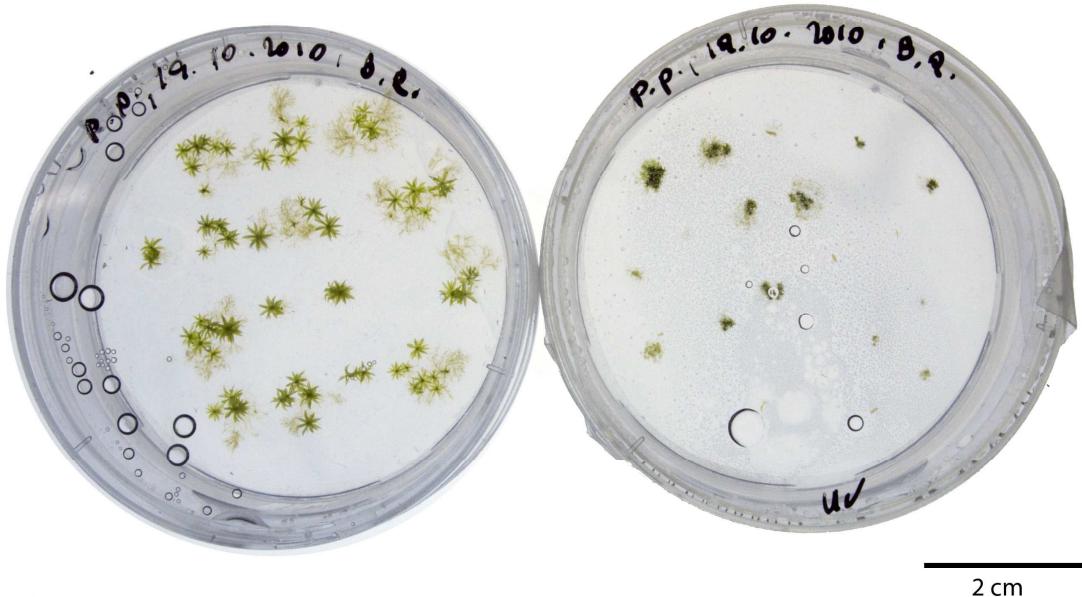


Abb.40.: *P. patens*, Versuch II; links: Kontrolle; rechts: UV- bestrahlt, nach 4 Wochen

In einem ähnlichen Versuch mit Sporen statt Blättchen zeigten Wolf *et al.* (2010), dass sich auch in diesem Fall keine richtigen Pflänzchen entwickeln. Dies deckt sich mit Versuch II: auch in diesem Fall können sich keine richtigen Pflänzchen

entwickeln, im Gegensatz zur Kontrolle können die Blätter nicht keimen. Dies deutet darauf hin, dass die ausgewachsenen, langlebigen Gametophyten besser vor UV-Strahlung geschützt sind als das kurzlebige, junge Protonema und die kleinen Blättchen.

## 4.2 Morphologie der Zellen

Die Vermessung der Zellen von bestrahlten Pflänzchen hat ergeben, dass bestrahlte Zellen schmäler aber dafür länger werden, während die Zellen der Kontrollpflänzchen breiter und kürzer werden. Die Messung der Zellbreiten ergibt ein signifikantes Ergebnis. Das heißt, die Veränderung der Breite ist eindeutig auf die UV-Strahlung zurückzuführen. Die Zelllängenmessung ergibt zwar kein signifikantes Ergebnis, aber man kann doch eine Tendenz erkennen, dass die bestrahlten Zellen länger sind als die Kontrollzellen.

Die Wahrscheinlichkeit, dass die Veränderung der Zelllängen auf die Bestrahlung zurückzuführen ist, liegt bei 81,4 und 97,7%. Diese Wahrscheinlichkeiten sind im Allgemeinen nicht hoch genug, um eine statistisch gesicherte Aussage zu ermöglichen. Dies wird durch die starke Streuung der Zelllängen bedingt, die eine Aussage mit hoher Wahrscheinlichkeit prinzipiell unmöglich macht. Da aber zwischen Zellbreite und Zelllänge ein großer Zusammenhang besteht, muss davon ausgegangen werden, dass das Ergebnis der Zelllängenmessung auch ein reales Ergebnis ist.

In Abbildung 41 und 42 sind die Messwerte der Zellbreiten und –längen der ersten Messung als Graphen dargestellt, und daraus resultierend auch die Graphen der Normalverteilungen für die Kontrollpflanzen. Die orange und die grüne Kurve zeigen, wie die Normalverteilung theoretisch aussehen sollte. Daran kann man die Werte der Messung vergleichen: die blaue und die rosa Kurve zeigen die Messwerte der Zelllänge ohne und mit UV. Wie sich zeigt, orientieren diese Werte sich an der theoretischen Normalverteilung. Allerdings ist die Kurve eher flach, was auf eine hohe Streuung der Messwerte hindeutet. Die statistische Aussage ist nicht signifikant.

Die rote und die schwarze Kurve zeigen die Messwerte der Zellbreiten bei den Kontrollproben und bei den bestrahlten Proben. Auch hier orientieren sich die Werte entlang der Normalverteilung. Die rote Kurve hat zwei Peaks, was bei geringem Stichprobenumfang vorkommt. Um eine genauere Kurve zu erhalten, wären noch mehr Messungen nötig. Wie man sieht, ist die Kurve hoch, aber nicht zu breit; man kann sagen, dass die Werte der Zellbreite normalverteilt sind.

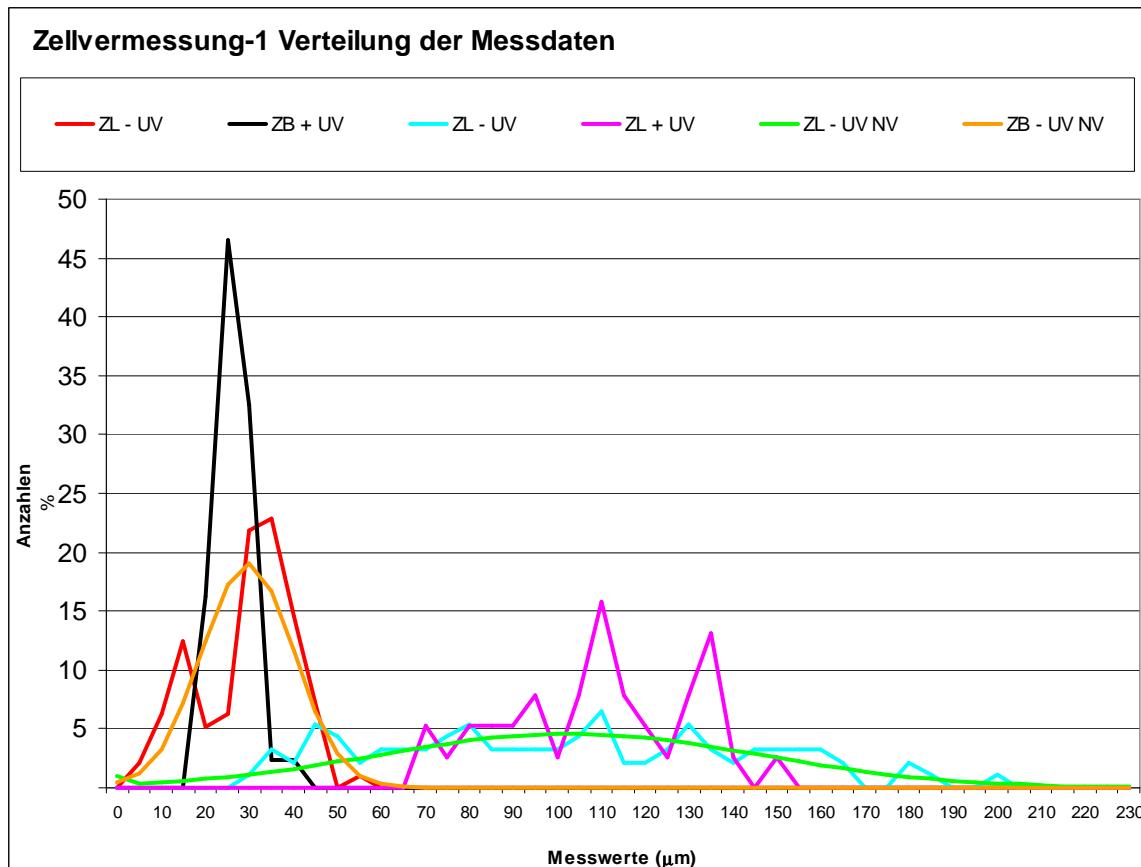


Abb.41.: Zellvermessung 1: Normalverteilungen (ZB: Zellbreite, ZL: Zelllänge, NV: Normalverteilung)

Auch bei der zweiten Messung (Abb. 4 2) verhält es sich ähnlich: auch hier orientieren sich die Werte der Zelllängen und –breiten entlang der Normalverteilung. Die Kurve der Zelllänge ist eher flach, was wieder auf eine hohe Streuung der Messwerte hindeutet, während die Kurve der Zellbreite hoch ist und daher normalverteilt ist.

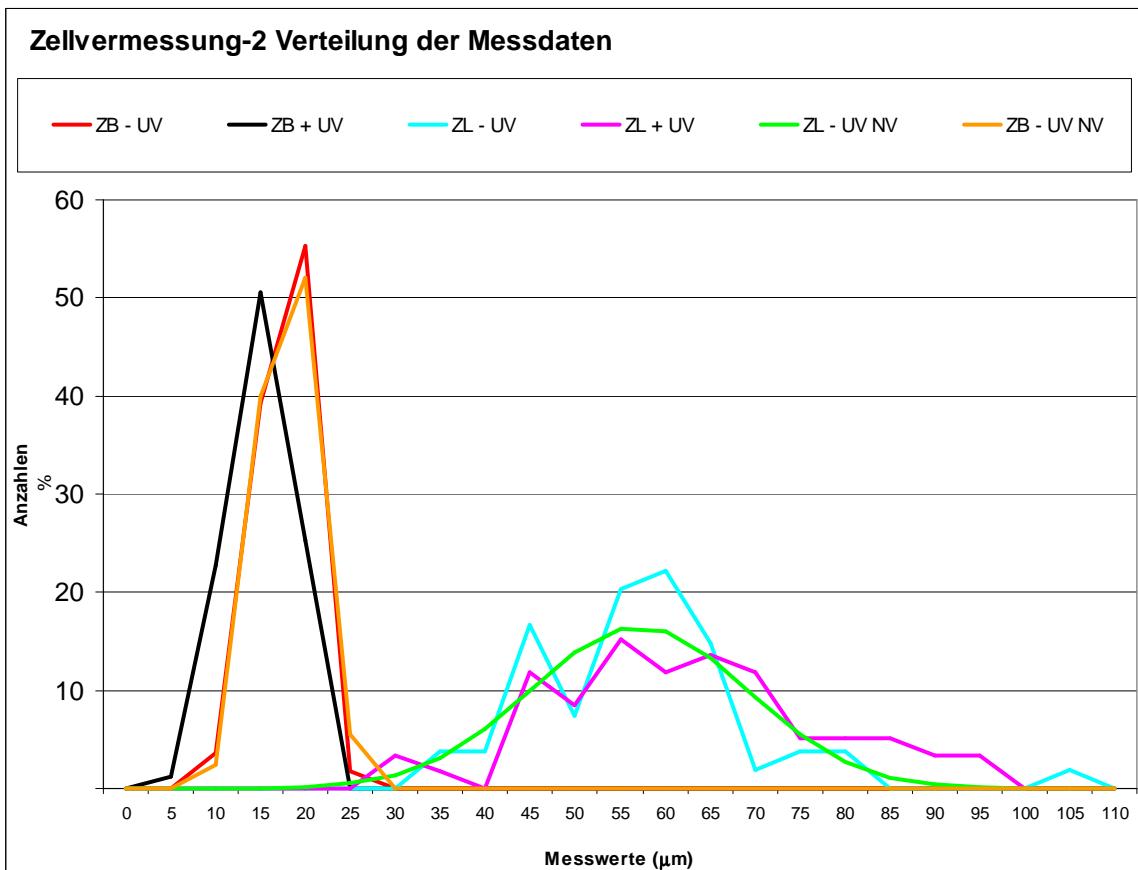


Abb.42.: Zellvermessung 2: Normalverteilungen (ZB: Zellbreite, ZL: Zelllänge, NV: Normalverteilung)

In einer Freilandstudie von Gehrke (1999) wurden zwei Moose, *Hylocomium splendens* und *Polytrichum commune*, die in subarktischer Heidelandschaft die Moosschicht dominieren, 3 Jahre lang mit zusätzlichem UV-B bestrahlt und beobachtet. *H. splendens* reagierte sensibler auf die Bestrahlung, als *P. commune*: im ersten Jahr war das Längenwachstum beider unbeeinflusst. Aber schon im zweiten Jahr zeigte sich bei *H. splendens* ein negativer Einfluss auf das Längenwachstum, während bei *P. commune* erst nach drei Jahren erste Effekte sichtbar wurden. Jährlich verringerte sich auch die Trockenmasseproduktion bei *H. splendens*, während es bei *P. commune* zu keiner Änderung kam. Aufgrund der jährlichen Längenabnahme konnte man nach drei Jahren Bestrahlung bei *H. splendens* auch eine Abnahme der Blattzahl beobachten, während bei *P. commune*, wo das Längenwachstum nicht so stark beeinflusst wurde, sogar noch ein Anstieg der Blätterdichte beobachtet werden konnte. Das heißt, dass Moose, sogar wenn sie im gleichen Ökosystem vorkommen, sehr unterschiedlich mit UV-Strahlung umgehen können.

Die Färbung der Zellkerne mit DAPI hat ergeben, dass sich bei bestrahlten wie auch unbestrahlten Pflanzen auf gleichgroßer Fläche beinahe gleich viele Zellen befinden. Das bedeutet, dass die UV-Strahlung keinen Einfluss auf die Teilungsrate hat. Das Ergebnis deckt sich auch mit dem Ergebnis der Zellvermessung, denn trotz der Formveränderungen der Zellen befinden sich gleich viele Zellen auf einer definierten Fläche.

Um noch genauere Ergebnisse bei der Zellvermessung und bei der DAPI-Färbung zu erhalten, wären weitere Wiederholungen von Vorteil. Außerdem sollte versucht werden, Ergebnisse mit möglichst wenig Streuung zu erhalten, indem man zum Beispiel die zu vermessenden Blätter immer genau aus derselben Wachstumsphase entnimmt.

### 4.3 Physiologische Reaktionen auf UV- Stress

Der Energiestoffwechsel spielt eine wichtige Rolle für das Überleben UV-bestrahlter Zellen.

NBT ist ein Di-Tetrazoliumsalz, das als Wasserstoffakzeptor wirken und durch Enzyme der Atmungskette unter bestimmten physiologischen Bedingungen zu einem blauen Farbstoff reduziert werden kann. Dadurch können Dehydrogenisierungsreaktionen im Stoffwechsel nachgewiesen werden (Kartusch 1974).

Um den Farbstoff zu testen, wurde der Versuch zuerst mit *Allium cepa* Zellen durchgeführt. Die bestrahlten *Allium cepa* Zellen reagierten wie erwartet: Nach 4 Stunden zeigten noch alle Proben Organellenbewegung. Die Kontrolle, die nicht bestrahlt wurde, zeigte eine klare Färbung der Zellen. Die Präparate, die für 15 beziehungsweise 30 Sekunden bestrahlt worden waren, zeigten eine verzögerte Wirkung: nur der Rand war leicht gefärbt, in der Mitte waren nur vereinzelt gefärbte Zellen zu erkennen. Die für 45 Sekunden bestrahlten Proben hingegen wurden gar nicht gefärbt.

Nach 6 Stunden ist keine Organellenbewegung mehr erkennbar, alle Proben sind gefärbt, auch wenn noch immer ein Unterschied zwischen der Kontrolle und den bestrahlten Proben erkennbar ist. Das ist dadurch zu erklären, dass das gebildete Formazan toxisch auf die Zellen wirkt: sie sterben und färben sich blau.

Während die unbestrahlten Zellen schon nach 4 Stunden deutlich blau gefärbt waren, setzte die Färbung bei den 30 und 45 Sekunden bestrahlten Zellen erst später ein. Dies deutet darauf hin, dass die Dehydrogenisierungsreaktionen durch die UV-Strahlung beeinflusst wurden.

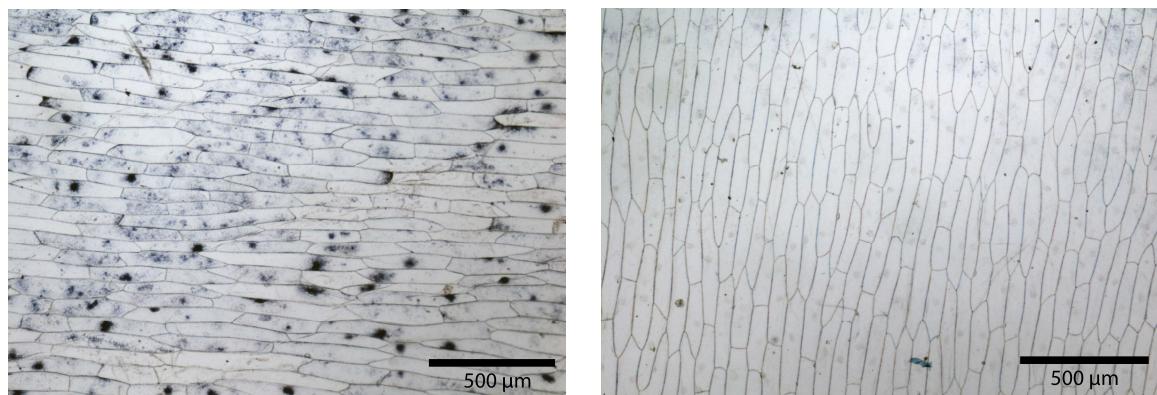


Abb.43.: *Allium cepa*, mit NBT behandelt, nach 10 h Inkubationszeit;  
links: unbestrahlte Kontrolle, rechts: 15sec bestrahlt

Auch bei *P. patens* verhielt es sich ähnlich: die länger bestrahlten Zellen (15 und 30 Sekunden) verfärbten sich erst später als die Kontrollzellen. Die mit 45 Sekunden bestrahlten Proben färbten sich gar nicht. Auch hier ist der Einfluss der UV-Strahlung eindeutig sichtbar.

Die Färbung bei *P. patens* hat allerdings ein anderes Erscheinungsbild wie bei *Allium cepa*: der Farbstoff lagert sich hauptsächlich in den Chloroplasten an, während es bei *Allium cepa* zu einer Anhäufung von Plasma kommt, in der sich viele Zellorganellen in lebhafter Brown'scher Bewegung befinden. Welche Zellorganellen genau gefärbt werden, lässt sich nicht so leicht sagen. Kartusch (1974) schreibt, dass der Ausfall und die Lokalisation der Niederschläge von der Art und der Konzentration des verwendeten Tetrazoliumsalzes abhängen.

## 4.4 Das Cytoplasma und seine Organellen

Aktinmikrofilamente bilden mit den Mikrotubuli das Cytoskelett der Pflanze.

Mit der Alexa-Phalloidin Färbung in unbestrahlten Moosblättern konnte bewiesen werden, in welch engem Kontakt sich die Aktinfilamente mit den Chloroplasten befinden. Auch das ER steht im engen Kontakt mit den Aktinmikrofilamenten: in einer Studie von Lichtscheidl & Url (1990) wird beschrieben, dass das ER Netzwerk aus mobilen röhren- und lamellenartigen Strukturen besteht. In Epidermiszellen von *Drosera Tentakeln* wurden Aktinmikrofilament-ER Komplexe beschrieben, die in engem strukturellen Kontakt mit dem Plasmalemma, anderen Organellen und dem Zellkern stehen (Lichtscheidl *et al.* 1990) und Lichtscheidl und Url (1987) beobachteten starke Interaktionen von ER und Aktinmikrofilamenten in *Allium cepa*. Auch in *P. patens* konnte ein solches Netzwerk beobachtet werden.

Es scheint, dass UV-Strahlung einen Effekt auf das ER hat. Bei *P. patens* bilden sich Schläuche, die aussehen, als würden sie lose im Cytoplasma hängen. Diese Strukturen wurden auch in Innenepidermiszellen der Zwiebelschuppe von *Allium cepa* beschrieben und als „intraplasmatische Vakuolen“ bezeichnet (Url, 1964).

Auch Url (1964) beschreibt Mitochondrien in *Allium cepa* Zellen und die Wirkung der direkten kurzweligen Strahlung des UV-Mikroskops auf die Organellen. Er schreibt, dass Mitochondrien von der Strahlung getötet werden, sich aber kaum abrunden, sondern vielmehr „fixiert“ werden. Bei *P. patens* sind die Mitochondrien immer eng mit den Chloroplasten assoziiert. Bewegen diese sich an den Rand, so bewegen sich auch die Mitochondrien mit. Dass sie sich aufgrund der UV-Strahlung abrunden, konnte nicht beobachtet werden.

Auch der Zellkern zeigt nach halbstündiger Bestrahlung mittels UV-Mikroskop (mit 364 nm) keine Veränderungen.

Bei Bestrahlung der Chloroplasten mit UV-Licht oder Starklicht im UV-Mikroskop begannen diese in der Zelle zu wandern. Nach ca. 20 Minuten wurden die Chloroplasten komplett an den Rand verdrängt. Aber auch wenn man Zellen in einem normalen Durchlichtmikroskop zu lange bestrahlt, kommt es zu einer

Bewegung der Chloroplasten an den Rand. Sobald die Strahlung schadet, wandern die Chloroplasten an den Rand der Antiklinwände, um sich gegenseitig vor dem Licht zu schützen.

Bei Menzel & Elsner-Menzel (1999) wird lichtinduzierte Chloroplastenbewegung bei der Grünalge *Caulerpa* beschrieben: wird eine Zelle mit UV-Licht bestrahlt, so werden die bestrahlten Choloroplasten immobilisiert, während die außerhalb des Lichtstrahls liegenden Chloroplasten ihre ursprüngliche Position verlassen und sich langsam an den Rand des Strahls zubewegen.

In den Mesophyllzellen von *Garcinia indica* bewegen sich die Chloroplasten zu der periklinen Zellwand, wenn die Bestrahlung nicht zu stark ist. In einer Studie von Rodrigues *et al.* (2007) wurden die Pflanzen drei Tage lang mit UV-B Licht (280- 320 nm, mit einem Maximum bei 312 nm) bestrahlt.

Solange also Licht in einer förderlichen Intensität auf die Pflanze scheint, so bewegen sich die Chloroplasten zum Licht hin. Ist die Strahlung hingegen zu stark oder zu kurzwellig, dann wandern sie an an den Rand der Antiklinwände.

Takagi (2002) berichtet auch, dass sich die Chloroplasten in den Epidermiszellen von *Vallisneria gigantea* bei nicht so starkem roten Licht an der periklinen Zellwand, bei starkem blauen Licht hingegen an der äußeren antiklinen Zellwand anlagern. Es wird angenommen, dass diese unterschiedlichen Bewegungen auf der einen Seite die maximale Photosynthese gewährleisten und auf der anderen Seite diverse Photo-Schäden minimieren sollen.

Die Bewegungen der Chloroplasten jedenfalls erfolgt durch Aktinmikrofilamente. In einem Review schreibt Takagi (2002) von verschiedenen Studien, die zeigen, dass Aktinfilamente als Anker der Chloroplasten innerhalb der Zelle dienen. Eventuell kommt es durch die UV-Strahlung zu Schäden der Aktinanker.

Zum Nachweis, dass sich die Chloroplasten entlang der Aktinfilamente bewegen, wurde ein Versuch mit dem Zellgift Latrunculin-B durchgeführt. Das Gift zerstört die Aktinfilamente, dadurch kommt es innerhalb weniger Minuten zum Stillstand der Organellenbewegung. Die Chloroplasten, die sich sonst unter UV- und

Starklicht zum Rand hinbewegen, stoppten ihre Bewegung schon nach kurzer Zeit, und auch nach einer Stunde waren sie unverändert.

Auch bei *Arabidopsis thaliana* kam es bei der Behandlung mit Latrunculin-B zu einer Disruptur der Aktinmikrofamente, was weiters zu einer Umpositionierung der Chloroplasten führte. Eine Depolymerisierung der Mikrotubuli mit Oryzalin beeinflußte die Bewegung der Chloroplasten nicht. Dies deutet darauf hin, dass in *Arabidopsis thaliana* Aktinfilamente, und nicht Mikrotubuli, eine wichtige Rolle bei der Bewegung und Positionierung der Chloroplasten in der Zelle spielen (Kandasamy & Meagher 1999).

In einem Review von Takagi (2002) wird beschrieben, dass bei der Behandlung mit Cytochalasin (ein anderer Actin-Inhibitor) die lichtabhängige Chloroplastenbewegung bei Moosen, Algen, Farnen und Angiospermen gestoppt wurde. Auch bei der Grünalge *Caulerpa* konnte der Zusammenhang von lichtinduzierter Chloroplastenbewegung und den Aktinfilamenten gezeigt werden (Menzel & Elsner-Menzel 1999).

## 4.5 HPLC

Bei der Analyse von eventuellen Stressmetaboliten kam es zu einem erhöhten Vorkommen von Benzoesäure in den für vier Wochen mit UV-B bestrahlten Proben, allerdings auch in den unbestrahlten Kontrollproben.

Eine Studie von Senaratna *et al.* (2003), in der hauptsächlich mit den höheren Pflanzen *Phaseolus vulgaris* und *Lycopersicum esculentum* gearbeitet wurde, hat gezeigt, dass ein erhöhtes Vorkommen von Benzoesäure eine generelle Stressantwort darstellt, und zwar für verschiedene Arten von Stress. Einige Studien (Machuka *et al.* 1999; Wolf *et al.* 2010) haben gezeigt, dass sich *P. patens* unter Stress ähnlich verhält wie höhere Pflanzen. Daher kann man davon ausgehen, dass die erhöhte Benzoesäure auf die Strahlung zurückzuführen ist.

Es ist nicht auszuschließen, dass auch die Kontrollpflanzen einem gewissen Stress, wie zum Beispiel Temperaturstress oder Trockenstress, ausgesetzt

waren, und daher auch hier Benzoësäure nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise gehört die Bildung von Benzoësäure zu den Grundeigenschaften des Mooses. Nur kommt es durch Stressfaktoren zu einer erhöhten Bildung von Benzoësäure, während die Kontrolle nur einen geringen Anteil besitzt.

Um ein konkreteres Ergebnis zu erhalten, müssten mehr Wiederholungen dieser Analyse durchgeführt werden, was aus zeitlichen Gründen nicht möglich war.

Benzoësäure gilt als Stressmetabolit und Vorstufe der Salicylsäure (Senaratna *et al.* 2003). Bei Yalpani *et al.*, (1994) wird beschrieben, dass in *Nicotiana tabacum L.* Salicylsäure unter verschiedenen Stresseinflüssen vermehrt produziert wird. Zum Beispiel unter dem Einfluss von UV-C Strahlung oder Ozon kommt es zu einer Erhöhung der Salicylsäure um ein Neunfaches im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle. Und bei der Bestrahlung mit UV-B kommt es immerhin auch noch zu einer vierfachen Erhöhung des Salicylsäurewertes. Eine andere Studie beschreibt, dass auch in *Arabidopsis thaliana* Salicylsäure durch Behandlung mit Ozon vermehrt produziert wird (Sharma *et al.* 1996).

Viele höhere Pflanzen haben in ihre Kutikula eingelagerte phenolische Verbindungen (Day *et al.* 1992). Oft handelt es sich hierbei um Flavonoide, die bei einer erhöhten UV-Belastung vermehrt produziert werden (Searles *et al.* 2001). Auch in einigen Moosen konnten Flavonoide nachgewiesen werden, aber diese Studien haben auch gezeigt, dass die Produktion von Flavonoiden nicht durch zusätzliche UV-Bestrahlung mit UV-Lampen erhöht wurde (Boelen *et al.* 2006; Gehrke 1999). Im antarktischen Moos *Andreaea regularis* wurden UV-absorbierende Pigmente gefunden, und bei *Ceratodon purpureus* phenolische Komponenten, die als UV-Schutz gelten (Wolf *et al.* 2010). Und auch *Sphagnum*-Arten färben sich bei hoher Sonneneinstrahlung durch Anthocyane rot (Adlassnig, 2003).

Mit Hilfe von „Microarray analyses“ wurde gezeigt, dass auch bei *P. patens* bei zusätzlicher UV-B Bestrahlung Gene induziert werden, die Enzyme für die Phenylpropanoid- und Flavonoid Biosynthese kodieren. Verglichen mit *Arabidopsis thaliana* gibt es zwei Enzymfamilien, die in *P. patens* mehr produziert werden: das sind auf der einen Seite Enzyme der Chalcone Synthase (CHS) und

auf der anderen Seite der Phenylalanin Ammonium Lyase (PAL). Einige Mitglieder dieser Enzymfamilien werden durch UV-B Strahlung induziert (Wolf *et al.* 2010).

Außerdem wurden bei *P. patens* auch Flavonole gefunden, aber nur im geringen Maße. Anthocyane werden gar nicht gebildet, nur ein Quercin-Derivat konnte gefunden werden (Wolf *et al.* 2010).

Auch in dieser Diplomarbeit wurde versucht, phenolischen Verbindungen nachzuweisen, aber es konnten keine speziellen Flavonoide gefunden werden.

## 5 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Bestrahlung, dass *P. patens* gut mit UV-Strahlung umgehen kann. Verschiedene Studien, die das Verhalten unterschiedlicher Moose unter UV-Stress getestet haben, sind ebenfalls zu dem Ergebnis gekommen, dass sie allgemein sehr gut an UV-Strahlung angepasst sind und dass UV-B kaum Auswirkungen auf das Wachstum hat (Boelen *et al.* 2006). Wolf *et al.* (2010) kommen sogar zu dem Ergebnis, dass *P. patens* besser geeignet ist, UV-B Stress zu tolerieren, als *Arabidopsis thaliana*.

Weiterführende Forschungen in diesem Gebiet könnten zum Beispiel die Arbeit mit Mutanten beinhalten, die Aktinfilamente markieren. Dadurch könnte genau verfolgt werden, wie sich die Aktinmikrofilamente unter Bestrahlung mit UV verhält.

Interessant wäre auch, eine Färbung mit Alexa-Phalloidin an UV-bestrahlten Zellen durchzuführen um so das eventuell geschädigte Aktin sichtbar zu machen. Auf jeden Fall wäre ein High Pressure Freezing notwendig und die gefrorenen Schnitte müssten anschließend mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops visualisiert werden.

Auch die Sichtbarmachung der für das endoplasmatische Retikulum zuständigen Aktinmikrofilamente ist ein schweres Unterfangen, da diese sehr kurz sind.

Die Zellvermessung hat ergeben, dass bestrahlte Pflanzen schmälere, dafür aber auch längere Zellen haben, als die Kontrollpflanzen. Auch hier könnte ebenfalls mit Aktinfilament-Mutanten getestet werden.

Auch die Ergebnisse der HPLC bestätigen die vorangegangenen Ergebnisse: es ist ein erhöhtes Vorkommen der Benzoesäure, einem Stressindikator, gemessen worden, allerdings nicht nur bei den bestrahlten, sondern auch den unbestrahlten Pflanzen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Erhöhung der

## Schlussfolgerung und Ausblick

Benzoësäure unter Umständen auch durch einen anderen Stressfaktor, und nicht nur durch UV-Strahlung ausgelöst wurde.

Die Analyse der Stress induzierten Metaboliten, wie beispielsweise der Benzoësäure, zeigte erste vielversprechende Ergebnisse. Weiterführende Forschung auf diesem Gebiet würde sicherlich unser Verständnis der Stressreaktionen des Mooses *P. patens* auf UV Licht vertiefen.

## Literaturverzeichnis

Abbe E. (1873) Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Schulzes Archiv für mikroskopische Anatomie* 9: 413-468.

Boelen P., de Boer M. K., de Bakker N. V. J. & Rozema J. (2006) Outdoor Studies on the Effects of Solar UV-B on Bryophytes: Overview and Methodology. *Plant ecology* 182: 137-152.

Britt A. B. (1996) DNA Damage and Repair in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 75-100.

Caldwell M. M., Björn L. O., Bornman J. F., Flint S. D., Kulandaivelu G., Teramura A. H. & Tevini M. (1998) Effects of Increased Solar Ultraviolet Radiation on Terrestrial Ecosystems. *Journal of Photochemical & Photobiology B: Biology*

Caldwell M. M. & Flint S. D. (1994) Stratospheric Ozone Reduction, Solar UV-B Radiation and Terrestrial Ecosystems. *Climatic Change* 28: 375-394.

Cooper J. A. (1987) Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. *The Journal of Cell Biology* 105: 1473-1478.

Day T. A., Vogelmann T. C. & DeLucia E. H. (1992) Are some plant life forms more effective than others in screening out ultraviolet-B radiation? *Oecologia* 92: 513-519.

Gehrke C. (1999) Impacts of enhanced ultraviolet-B radiation on mosses in a subarctic heath ecosystem. *Ecology* 80: 1844-1851.

Hatcher P. E. & Paul N. D. (1994) The effect of elevated UV-B radiation on herbivory by *Autographa gamma*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 71: 227-233.

Hockberger P. E. (2002) A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochemistry and Photobiology* 76: 561–579.

Hollósy F. (2002) Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33: 179-197.

Jansen M. A. K., Gaba V. & Greenberg B. M. (1998) Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science* 3: 131-135.

Kandasamy M. K. & Meagher R. B. (1999) Actin-organelle interaction: association with chloroplast in arabidopsis leaf mesophyll cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 44: 110-118.

Kapuscinski J. (1995) DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry* 70: 220-233.

Kartusch R. (1972) Wirkung fraktionierter UV-Bestrahlung auf Epidermiszellen von *Allium cepa*. *Protoplasma* 74: 85-101.

Kartusch R. (1974) Wirkung kleiner UV-Dosen auf die Reduktion von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid in Epidermiszellen von *Allium cepa* L. *Protoplasma* 81: 383-392.

Keppler B. K. & Ding A. (1997) *Chemie für Biologen*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg; Berlin; Oxford.

Kiefer J. & Wienhard I. (1977) Biologische Wirkungen. In: *Ultraviolette Strahlung* pp. 445-551.

Köpke P., Reuder J. & Schween J. (2004) UV-Strahlung- gestern, heute, morgen. In: *Rundgespräche der Kommission für Ökologie, Bd. 27 "Erhöhte UV-Strahlung: Folgen und Maßnahmen"* pp. 19-28. Dr. Friedrich Pfeil, München.

Krishan A. & Dandekar P. D. (2005) DAPI Fluorescence in Nuclei Isolated from Tumors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 53: 1033-1036.

Lang-Pauluzzi I. (1999) The behaviour of the plasma membrane during plasmolysis: a study by UV microscopy. *Journal of Microscopy* 198: 188-198.

Larcher W. (1994) *Ökophysiologie der Pflanzen*, 5. Auflage. Ulmer-Verlag, Stuttgart.

Li J., Ou-Lee T.-M., Raba R., Amundson R. G. & Last R. L. (1993) Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *The Plant Cell* 5: 171-179.

Lichtscheidl I. K., Lancelle S. A. & Hepler P. K. (1990) Actin-endoplasmatic reticulum complexes in *Drosera*: Their structural relationship with the plasmalemma, nucleus, and cellorganelles in cells prepared in high pressure freezing. *Protoplasma* 155: 116-126.

Lichtscheidl I. K. & Url W. G. (1987) Investigation of the protoplasm of *Allium cepa* inner epidemic cells using ultraviolet microscopy. *European Journal of Cell Biology* 43: 93-97.

Lichtscheidl I. K. & Url W. G. (1990) Organization and dynamics of cortical endoplasmatic reticulum in inner epidermal cells of onion bulb scales. *Protoplasma* 157: 203-215.

Machuka J., Bashiardes S., Ruben E., Spooner K., Cuming A., Knight C. & Cove D. (1999) Sequence analyses of expressed sequence tags from an ABA-treated cDNA library identifies stress response genes in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiology* 40: 378-387.

Madronich S., McKenzie R. L., Björn L. O. & Caldwell M. M. (1998) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemical & Photobiology B: Biology* 46: 5-19.

Madronich S., McKenzie, R. L. et al. (1995) Changes in ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *Ambio* 24: 143-152.

Menzel D. & Elsner-Menzel C. (1999) Actin-based chloroplast rearrangements in the cortex of the giant coenocytic green alga *Caulerpa*. *Protoplasma* 150: 1-8.

Pauluzzi I., Lichtscheidl I. K. & Url W. G. (1995) UV microscopy of *Byblis* hair cells. *Proceedings Royal Microscopy Society* 30: 29.

Pauluzzi I., Lichtscheidl I. K. & Url W. G. (1996) Ultra-violet microscopy. *Proceedings Royal Microscopy Society* 31: 155-160.

Ravishankara A. R., Daniel J. S. & Portmann R. W. (2009) Nitrous Oxide (N<sub>2</sub>O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century. *Science* 326: 123-125.

Rensing S. A., Lang D. & Zimmer A. D. (2009) Comparative genomics. In: *The Moss Physcomitrella patens* pp. 42-75. Knight c., Perroud, P.-F., Cove, D.

Rodrigues V., Bhandari R., Khurana J. P. & Sharma P. K. (2007) Movement of chloroplasts in mesophyll cells of *Garcinia indica* in response to UV-B radiation. *Current Science* 92: 1610-1613.

Rowland F. S. (1990) Stratospheric Ozone Depletion by Chlorofluorocarbons. *Ambio* 19: 281-292.

Rozema J., Boelen P. & Blokker P. (2005) Depletion of stratospheric ozone over the Antarctic and Arctic: Responses of plants of polar terrestrial ecosystems to enhanced UV-B, an overview. *Environmental Pollution* 137: 428-442.

Rozema J., van de Staaij J., Björn L. O. & Caldwell M. (1997) UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends in Ecology & Evolution* 12: 22-28.

Rozema J., Björn L.O., Bornman J.F., Gaberscik A., Häder D.P., Trost T., Germ M., Klisch M., Gröniger A., Sinha R.P., Lebert M., He Y.Y., Buffoni-Hall R., de Bakker N.V., van de Staaij J. & B.B. M. (2002) The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems - an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology* 66: 2-12.

Sassmann S. (2010) Heavy metal tolerance and localization in the moss *Physcomitrella patens*. Universität Wien, Wien.

Sassmann S., Wernitznig S., Lichtscheidl I. K. & Lang I. (2010) Comparing copper resistance in two bryophytes: *Mielichhoferia elongata* Hornsch. versus *Physcomitrella patens* Hedw. *Protoplasma* 246: 119-123.

Schulze R. & Kiefer J. (1977) Allgemeine Einführung und Grundbegriffe. In: *Ultraviolette Strahlung* pp. 1- 16.

Searles P. S., Flint S. D. & Caldwell M. M. (2001) A meta-analysis of plant field studies simulating stratospheric ozone depletion. *Oecologia* 127: 1-10.

Senaratna T., Merritt D., Dixon K., Bunn E., Touchell D. & K. S. (2003) Benzoic acid may act as the functional group in salicylic acid and derivatives in the induction of multiple stress tolerance in plants. *Plant Growth Regulation* 39: 77-81.

Sharma Y. K., Leon J., Raskin I. & Davis K. R. (1996) Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: The role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 5099-5104.

Sitte P., Weiler E. W., Kadereit J. W., Bresinsky A. & Körner C. (2002) *Strasburger - Lehrbuch der Botanik*.

Solomon S. (1999) Stratospheric Ozone Depletion: A Review of Concepts and History. *Reviews of Geophysics* 37: 275-316.

Stafford H. A. (1991) Flavonoid Evolution: An Enzymic Approach. *Plant Physiology* 96: 680-685.

Stapleton A. E. (1992) Ultraviolet Radiation and Plants: Burning Questions. *The Plant Cell* 4: 1353-1358.

Takagi S. (2002) Actin-based photo-orientation movement of chloroplasts in plant cells. *The Journal of Experimental Biology* 206: 1963-1969.

Tang X., Madronich S., Wallington T. & Calamari D. (1998) Changes in tropospheric composition and air quality. *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology* 46: 83-95.

Tanious F. A., Veal J. M., Buczak H., Ratmeyer L. S. & Wilson W. D. (1992) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 31: 3103-3112.

Teramura A. H. & Sullivan J. H. (1994) Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth on terrestrial plants. *Photosyntheses Research* 39: 463-473.

Tevini M. & Häder D.-P. (1985) *Allgemeine Photobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Url W. (1964) Einige Beobachtungen an Innenepidermen der Zwiebelschuppe von *Allium cepa* L. im ultraviolette Licht. *Protoplasma* 59: 197-200.

Wakatsuki T., Schwab B., Thompson N. C. & Elso E. L. (2000) Effects of Cytochalasin D and Latrunculin B on Mechanical Properties of Cells. *Journal of Cell Science* 114: 1025-1036.

Wolf L., Rizzini L., Stracke R., Ulm R. & Rensing S. A. (2010) The Molecular and Physiological Responses of *Physcomitrella patens* to Ultraviolet-B Radiation. *Plant Physiology* 153: 1123-1134.

Yalpani N., Enyedi A. J., Leon J. & Raskin I. (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* 193: 372-376.

Zepp R. G., Callaghan T. V. & Erickson D. J. (1998) Effects of enhanced solar ultraviolet radiation on biogeochemical cycles. *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology* 46: 69-82.

Zimmer A., Lang D., Richardt S., Frank W., Reski R. & Rensing S. A. (2007) Dating the early evolution of plants: detection and molecular clock analyses of orthologs. *Molecular Genetics & Genomics* 278: 393-402.

# Lebenslauf

**Name:** Barbara Ruplitsch  
**Geburtstag/-ort:** 30. 12. 1981/ Klagenfurt  
**Staatsangehörigkeit:** Österreich  
**Eltern:** Werner Ruplitsch, seit August 2008 Pensionist,  
zuvor: Angestellter der Kärntner Sparkasse im EDV  
Bereich  
Brigitte Ruplitsch, Hausfrau  
**Geschwister:** Michael Ruplitsch  
Andreas Ruplitsch

## Ausbildung / Weiterbildung:

1988-1992 Volksschule Wölfnitz (Klagenfurt)  
1992-2000 BG Lerchenfeld-Gymnasium (Klagenfurt)  
Matura im Juni 2000  
2000-2001 Besuch der Wiener Kunstschule  
Malerei/ räumliches Gestalten  
2001-2011 Biologiestudium an der Universität Wien  
Studiengang: Ökologie  
Diplomarbeitsthema: „Das Moos *Physcomitrella patens*  
unter UV-Streß“

## Publikationen:

Posterpräsentation auf der Tagung der ATSPB, Juni 2010, Illmitz: „The moss  
*Physcomitrella patens* under UV-stress“  
Posterpräsentation am “9<sup>th</sup> Botanical Microscopy Meeting” der RMS, April 2011,  
Wageningen: „Growth effects of supplemental UV-B radiation on *Physcomitrella  
patens*“

**Berufserfahrung:**

2010

Tutorin für die Kurse:

„Schwermetallstress: Ökologie von Organismen - Ökologie von Organismen auf Schwermetallstandorten:  
Mechanismen der Stressbewältigung“  
„Funktionelle Cytologie und Anatomie der Pflanze - Struktur und Funktion der Drüsen von fleischfressenden Pflanzen“

**Förderung:**

Diese Diplomarbeit wurde durch eine Förderung des „Vereins zur Förderung der Pflanzenwissenschaften“ (SAPS) unterstützt