

Variabilität elektrophoretischer Peroxidasmuster in Ökotypen von *Silene vulgaris* – die Klonung als methodischer Ansatz für streßphysiologische Untersuchungen

Von

R. MAIER, H. ASFOUR, W. RÜCKER und K. BURIAN

(Vorgelegt in der Sitzung der math.-nat. Klasse am 14. November 1996
durch das w. M. Karl BURIAN)

Einleitung

Silene vulgaris (MÖNCH) GARCKE, die Klatsch-Nelke, ist weit verbreitet und tritt, unter Einbeziehung der Unterarten, von der Ebene bis in den alpinen Raum auf. Die Pflanze wächst u.a. in Wiesen und lichten Wäldern, besiedelt Ruderalstandorte, Schutthalden und schwermetallhaltige Böden. Es sind u.a. blei-, zink-, kupfer-, nickel- und cadmiumresistente Formen bekannt, auch wurde eine Verträglichkeit gegenüber NO₂, SO₂ und O₃ nachgewiesen (DUECK et al. 1986). Um die physiologische Leistung zu betonen, wird im folgenden nicht die auf morphologische Merkmale gestützte Unterteilung in Subspecies verwendet, sondern der standortsbezogene Begriff „Ökotyp“, da die Morphologie nicht notwendigerweise mit den Standortseigenschaften gekoppelt ist (u.a. BRÖKER 1963, ULRICH 1990).

Silene vulgaris weist sowohl zwischen den Ökotypen wie auch innerhalb eines Ökotyps eine große Variabilität im elektrophoretischen Esterase- und Peroxidasmuster auf, wie dies MOSHAMMER et al. (1991) für Standorte im Ostalpenraum zeigen. An einer Reihe von Enzymen wurde dies

auch bei Pflanzen im Verbreitungsgebiet der BRD und der Benelux-Staaten nachgewiesen (VERKLEIJ 1980, VERKLEIJ et al. 1987, VERKLEIJ et al. 1991). Diese Variabilität ist Ausdruck eines genetischen Potentials, das der Plastizität und damit dem evolutiven Vorteil von *Silene vulgaris* in der Anpassung an den Lebensraum zugrunde liegt (s. auch BRADSHAW 1984, MÜLLER-STARCK 1985, BERGMANN & SCHOLZ 1987).

Um die Reaktion der Pflanze auf einen Stressor, wie z.B. Schwermetall, herauszuarbeiten, wird im klassischen Experiment einer Nullvariante (Kontrolle) die Experimentvariante (mit Stressor) gegenübergestellt. Das setzt allerdings voraus, daß Pflanzen beider Varianten im Indikatormerkmal der gleichen Grundgesamtheit angehören, sodaß Abweichungen dem Stressor zugeschrieben werden können. Dies gelingt bei Versuchen mit Kulturpflanzenarten, sodaß, wie z.B. im Falle des elektrophoretischen Enzymmusters als Indikatormerkmal eine geringe Variabilität innerhalb einer Sorte unter gleichen Versuchsbedingungen vorliegt (u.a. MAIER 1979, GRIESSLER 1985). Bei Wildpflanzen kann – wie bei *Silene vulgaris* – eine hohe Variabilität im Enzymmuster gegeben sein, streßphysiologische Enzymuntersuchungen im Sinne des klassischen Laborexperimentes scheitern daran. Um dennoch Resistenzstudien anstellen und Besiedlungsstrategien bzw. Adaptierungsmechanismen bei derartigen Pflanzen aufklären zu können, wurde versucht, durch Klonung eine genetische Einheitlichkeit herzustellen, um Enzymmuster als bioindikatorische Methode einsetzen zu können.

Material und Methoden

Pflanze: *Silene vulgaris* von Standorten in Kärnten. Näher dargestellt werden die Ökotypen „Bleiberg“ (Abraumhalde eines Blei-Zink-Bergbaues), „Bergwerks-graben“ (Abraumhalde eines Blei-Zink-Bergbaues bei Meiselding, Gem. Möllbling), „Forst“ (Sausalpe, Lavanttal), „Straganz“ (Gem. Möllbling).

In-vitro-Kultur: Jeder durch Knospenregeneration herauskultivierte Klon geht auf einen in vitro gekeimten Samen zurück. Für Keimung und Weitervermehrung wurde ein Nährmedium nach LINSMAIER & SKOOG (1965), geringfügig modifiziert (N-Konz. halbiert), mit Zusatz von 0,1 mg/1NAA, verwendet. Analysiert wurden ca. 3 Monate alte Pflanzen. Für den Bleiversuch (mit $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) wurden 14 Tage alte, bewurzelte Pflänzchen vom Agarmedium in flüssiges Medium auf Filterbrücken (HELLER 1953) übertragen, die Nährsalzkonzentration halbiert, Phosphat zur Gänze weggelassen, um größtmögliche Verfügbarkeit von Blei zu gewährleisten. Stickstoff wurde nur als Nitrat geboten, als Ausgleich

zum zugesetzten $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ wurde NaNO_3 verwendet. Wachstum (Frischgewicht) und isoelektrisches Peroxidasmuster wurden untersucht.

Probenaufbereitung: Für die Auftrennungen wurden Preßsäfte aus tiefgefrorenem Pflanzenmaterial von ganzen Pflänzchen hergestellt und jeweils 15 μl für die isoelektrische Fokussierung verwendet.

Isoelektrische Fokussierung: Multiphor 2 (Pharmacia), Ampholine PAG, pH-Gradient 3,5–9,0 (Pharmacia).

Peroxidasenachweis: Benzidin-Guajacol und H_2O_2 (vgl. MAIER 1978).

Ergebnisse und Diskussion

In der in-vitro-Kultur, die in vorliegenden Experimenten zur Anwendung kam, konnten zwischen den verschiedenen Ökotypen morphologische Unterschiede, vor allem beim Ökotyp Bleiberg – mit deutlich kleineren Blättern – festgestellt werden; die Unterschiede betreffen die Größe und Form der Blätter, Verzweigung, sowie das Ausmaß der Wurzelbildung. Innerhalb eines Klones, aber auch bei den herausgearbeiteten Klonen eines Ökotyps waren keine morphologischen Unterschiede zu erkennen.

Für die Enzymanalysen wurden 3 Monate alte, voll entwickelte (vergleichbarer physiologischer Zustand) in-vitro-Pflänzchen verwendet. Dies deshalb, weil nach MOSHAMMER et al. (1991) sich das Enzymmuster der Peroxidasen mit fortschreitender Entwicklung bis zum Adultstadium ändert, dann aber im wesentlichen gleich bleibt (s. auch VERKLEIJ 1980). Blätter und Sprosse wurden aus methodischen Gründen (geringe Probenmenge) nicht getrennt untersucht, unterstützt auch durch die Ergebnisse von MOSHAMMER et al. (1991), daß Divergenzen im elektrophoretischen Muster der Peroxidase zwischen Blatt und Stengel kaum auftreten.

Die Enzymbanden der Peroxidasen verteilen sich im isoelektrischen Feld über den gesamten pH-Bereich. Die Enzymmuster zwischen den Pflanzen verschiedener Herkunft wie auch von Pflanzen innerhalb eines Ökotyps zeigen beträchtliche Abweichungen, sodaß eine Zuordnung des Enzymmusters zu einem Ökotyp nicht möglich ist (MOSHAMMER et al. 1991). Das bestätigen auch die vorliegenden in-vitro-Tests. Abbildung 1 u. 2 zeigen aus einer Reihe derartiger Untersuchungen die unterschiedlichen isoelektrischen Peroxidasmuster. In Abbildung 1 ist dies für 6 jeweils auf einen Samen des Ökotyps „Bleiberg“ zurückgehende Klone dargestellt; innerhalb der 3 Pflanzen des entsprechenden Klons ist das Muster im wesentlichen einheitlich. Abbildung 2 zeigt das gleiche Ergebnis: Die isoelektrischen Peroxidasmuster der Ökotypen „Bergwerksgraben“, „Forst“ und „Straganz“ (sowie „Bleiberg“ in Abbildung 1)

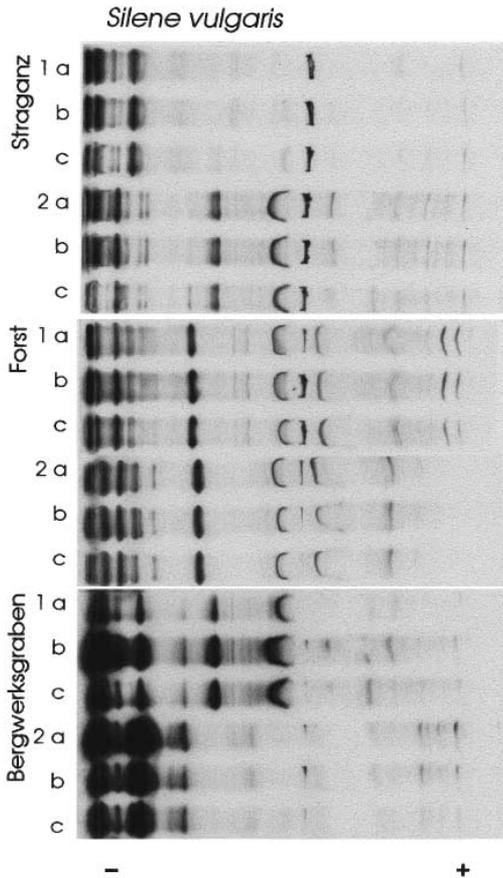


Abb. 2. Isoelektrisches Peroxidasemuster von *Silene vulgaris*, Ökotyp „Straganz“, „Forst“ und „Bergwerksgraben“. 1, 2 In-vitro-Klone, zurückgehend auf jeweils 1 Samen. a–c Pflanzen eines Klons

und damit auch die Variabilität polymorpher Enzyme vermindert sein könnte. Allerdings zeigen auch Proben vom Freiland innerhalb einer Population (Kahlenberg, Wien) erhebliche Unterschiede im enzymatischen Muster (MOSHAMMER et al. 1991).

Das Schwermetall Blei, dem Kulturmedium hinzugefügt, führt bei den verwendeten Konzentrationen zu einem veränderten isoelektrischen Peroxidasemuster in Hinblick auf Lage und Intensität der substrataktiven Banden; hohe Konzentrationen haben eine Abschwächung der Peroxidasebanden zur Folge. Innerhalb eines Klons bleiben die Peroxidasemuster bei der jeweiligen Schwermetallkonzentration vergleich-

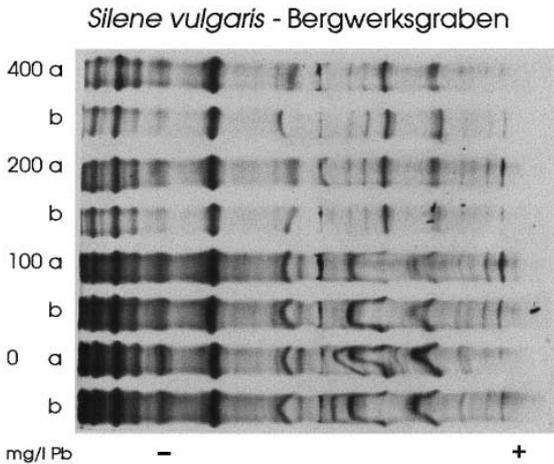


Abb. 3. Isoelektrisches Peroxidasemuster von *Silene vulgaris*, Ökotyp „Bergwerksgraben“. 0 bleifrei, 100–400 mg/l Pb Bleikonzentration im Medium. a, b Pflanzen eines Klons

bar, wie Abbildung 3 am Beispiel des Ökotyps „Bergwerksgraben“ zeigt, sodaß von einer gleichen Schwermetallwirkung auf einen Klon ausgegangen werden kann.

Durch Klonierung besteht also die Möglichkeit, bei *Silene vulgaris*, einer Pflanzenart, deren elektrophoretisches Enzymmuster stark variiert, vergleichbares Ausgangsmaterial für physiologische Untersuchungen zu schaffen. Allerdings ist dabei zu berücksichtigen, daß die einzelnen herausgezüchteten Klone in sich zwar gleiche, aber untereinander verschiedene Enzymmuster zeigen, sodaß bei physiologischen Untersuchungen die Notwendigkeit besteht, mehrere Klone heranzuziehen, um bei der Beurteilung eines Ökotyps nicht dem Zufallsergebnis eines einzelnen Klons zu unterliegen.

Zusammenfassung

Das isoelektrische Peroxidasemuster wird als Indikator für die genetische Variabilität von *Silene vulgaris* herangezogen. Für die Untersuchungen wurden Pflanzen von Standorten in Kärnten (Ostalpen) aus Samen kultiviert. Ziel vorliegender Untersuchungen war es, mit Hilfe der Gewebekulturtechnik zu klären, ob die starke Variabilität im elektrophoretischen Enzymmuster von Peroxidasen bei *Silene vulgaris*, einer eurypöken Art, durch Klonierung vereinheitlicht werden kann, um für

physiologische Untersuchungen gleiches Ausgangsmaterial zu schaffen. Die Versuche zeigen, daß die Enzymmuster zwischen den verschiedenen Ökotypen und zwischen den herausgezüchteten Klonen eines Ökotyps deutlich unterschiedlich sind. Innerhalb eines Klons jedoch, und das gilt auch bei Schwermetallstreß, sind die Enzymmuster vergleichbar.

Literatur

- ANTONOVICS J., BRADSHAW A. D. and TURNER, R. G.: Heavy metal tolerance in plants. *Adv. Ecol. Res.* 7, (1971) 1–85.
- BERGMANN F. and SCHOLZ, F.: The impact of air pollution on the genetic structure of Norway spruce. *Silvae Genetica* 36, (1987) 80–83.
- BRADSHAW A. D., 1984: The importance of evolutionary ideas in ecology – and vice versa. In: SHORROCKS B. (ed.): *Evolutionary Ecology*, 1–25. Blackwell, Oxford.
- BRÖKER W.: Genetisch-physiologische Untersuchungen über die Zinkverträglichkeit von *Silene inflata* Sm. *Flora* 153, (1963) 122–156.
- DUECK TH. A., ERNST W. H. O., MOOI J. and PASMAN F. J. M.: Effects of SO₂, NO_x and O₃ in combination on the yield and reproduction of *Silene cucubalus* populations. *J. Plant Physiol.* 122, (1986) 97–106.
- GRIESSLER B., 1985: Nachweis der Einzel- und Kombinationswirkungen von Blei und Streusalz auf Proteine und unspezifische Enzyme von *Zea mays* und *Pisum sativum* mit Hilfe der Gelelektrophorese. Diss. Univ. Wien.
- HELLER R.: Recherches sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultives in vitro. *Ann. Sc. Nat. Bot. Veg.* 14, (1953) 1–223.
- LINSMAIER E. M. and SKOOG F.: Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18, (1965) 100–127.
- MAIER R.: Aktivität und multiple Formen der Peroxydase in unverbleiten und verbleiten Pflanzen von *Zea mays* L. und *Medicago sativa* L. *Phyton* 19, (1978) 83–96.
- MAIER R.: Zur Bioindikation von Bleiwirkungen in Pflanzen über Enzyme. *Jahresbd.d.Ges.f. Ökologie* VII, (1979) 315–322.
- MOSHAMMER C., MAIER R. and RÜCKER W., 1991: Esterase- und Peroxidasmuster zur Charakterisierung der intraspezifischen Variabilität von *Silene vulgaris*. *Elektrophorese-Forum* '91, 581–585, München.
- MÜLLER-STARCK G.: Genetic differences between 'tolerant' and 'sensitive' beeches (*Fagus sylvatica* L.) in an environmentally stressed adult forest stand. *Silvae Genetica* 34, (1985) 241–246.
- ULRICH S. M.: Comparative studies on metal tolerance and metal uptake in *Silene vulgaris*. *Phyton* 30(2), (1990) 323–324.
- VERKLEIJ J. A. C., 1980: Isoenzyme variation in pioneer species from ecological different habitats. Thesis Free Univ. Amsterdam.
- VERKLEIJ J. A. C., Lolkema, P. C. and ERNST W. H. O.: The effect of heavy metals on isozyme gene expression in *Silene cucubalus*. *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research* 16: Agriculture, Physiology and Medicine, (1987) 209–221.
- VERKLEIJ J. A. C., Lolkema P. C., De Neeling A. L. and HARMENS H.: Heavy metal resistance in higher plants: Biochemical and genetic aspects. In: ROZEMA J. and VERKLEIJ J. A. C. (eds.): *Ecological Responses to environmental Stresses*, (1991) 8–19. Kluwer Academic Publishers.

Anschrift der Verfasser: Univ. -Prof. Dr. Rudolf MAIER, Dipl.-Ing. Dr. Helmy ASFOUR, Univ.-Doz. Dr. Waltraud RÜCKER, Univ.-Prof. Dr. Karl BURIAN, Institut für Pflanzenphysiologie, Abt. f. Physiologie, Ökologie und Anatomie der Pflanzen, Althanstraße 14, A-1091 Wien.