

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Institut für Pflanzenernährung
Herrenhäuser Str. 2
D-30149 Hannover



Einfluss von Arsenit auf das Wachstum von Reis (*Oryza sativa*)

Arbeit zur Erlangung des Abschlusses
„Master of Science in Gartenbauwissenschaften“

von

Holger Hoffmann
Stud. B. Sc. Gartenbauwissenschaften
Matrikelnummer: 2311180

2009

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Manfred Schenk danke ich herzlich für die Anregung dieser Arbeit und für die hilfreiche Betreuung, insbesondere für die vielen fachlichen Diskussionen.

Weiter danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Pflanzenernährung der Leibniz Universität Hannover für ihre Unterstützung beim Versuchsaufbau und der Versuchsbetreuung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wären nicht zustanden gekommen ohne die As-Messungen am UFZ-Leipzig. Hier geht mein Dank an Dr. Jürgen Mattusch.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	II
1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1 As-Formen.....	3
2.2 As-Dynamik.....	4
2.3 As und Reis.....	6
2.3.1 Wirkung von As auf das Wachstum von Reis.....	6
2.3.2 As(V) und As(V)-Reduktion.....	6
2.3.3 As(III).....	8
2.3.4 Wirkung der As(V)-Reduktion.....	9
2.3.5 Glutathion als Toleranzindikator?.....	10
2.4 As-Aufnahme.....	10
2.5 Struktur, Funktionsweise, Selektivität und Regulierung der Aqua(glycero)porine.....	12
2.6 As(III)-Aufnahme.....	16
2.6.1 Transporter.....	16
2.6.2 Aufnahmerate.....	16
2.7 Silizium.....	18
2.7.1 Eigenschaften.....	18
2.7.2 Einfluss von Si auf die As-Aufnahme.....	20
2.8 Hypothese.....	21
3. Methodenentwicklung.....	22
3.1 Ziel der Methodik.....	22
3.2 Pflanzenmaterial und Kulturverfahren.....	22
3.2.1 Kultur.....	22
3.2.2 Nährlösung.....	23
3.2.3 Ernte.....	23
3.3 Differenzbehandlung.....	23
3.4 Analytische Verfahren.....	23

3.4.1 Transpiration und Photosynthese.....	23
3.4.2 Wiegen der Frischmasse.....	24
3.4.3 Arsen im Pflanzenmaterial.....	25
3.4.4 Arsen in Nährlösungen.....	25
3.4.5 pH.....	25
3.5 Statistische Verfahren.....	25
3.5.1 Transpiration und Photosynthese.....	25
3.5.2 Frischmasse.....	26
3.6 Überprüfung der Versuchsbedingungen.....	27
3.7 Einfluss von As(III) auf Transpirations- und Photosyntheserate.....	27
3.8 Einfluss von As(III) auf die Frischmasse.....	30
3.9 Bewertung der Parameter zur Bestimmung der As(III)-Toxizität.....	32
4. Einfluss von Si auf Toxizität und Aufnahme<i>rate in vivo</i> von	
Arsenit bei Reis.....	34
4.1 Einleitung.....	34
4.2 Material und Methoden.....	37
4.2.1 Pflanzenmaterial und Kulturbedingungen.....	37
4.2.2 Bestimmung der As(III)-Toxizität im Frischmassewiegeversuch.....	37
4.2.3 Bestimmung der Aufnahme <i>rate</i>	38
4.2.4 Ernte und analytische Verfahren.....	39
4.2.5 Ermittlung der As(III)-Aufnahme <i>rate</i>	40
4.2.6 Statistische Verfahren.....	40
4.3 Ergebnisse.....	40
4.3.1 As(III)-Toxizität.....	40
4.3.1.a Wirkung von As(III) auf die Frischmasse.....	40
4.3.1.b Aufnahme und Verlagerung von As und Si.....	42
4.3.1.c Wirkung von As(III) auf Wachstum, Aufnahme und Verlagerung von As und Si von 6 Wochen alten Reispflanzen.....	45
4.3.2 As(III)-Aufnahme <i>rate</i>	48
4.4 Diskussion.....	50
4.4.1 As(III)-Toxizität.....	50

4.4.1.a Einfluss von As(III) auf den Frischmassezuwachs.....	50
4.4.1.b As in der Trockenmasse.....	52
4.4.1.c Einfluss von Kieselsäure auf die As-Gehalte in der Trockenmasse.....	54
4.4.1.d Einfluss von As(III) auf den Si-Gehalt in der Trockenmasse.....	55
4.4.1.e Wirkung von As(III) auf Wachstum, Aufnahme und Verlagerung von As und Si von 6 Wochen alter Reispflanzen.....	55
4.4.2 As(III)-Aufnahmerate.....	57
4.4.3 Wechselwirkung von Si, As(III) und Wassertransport bei Reis.....	58
5. Abschließende Betrachtung.....	60
6. Zusammenfassung.....	62
7. Anhang.....	63
8. Literaturverzeichnis.....	64
9. Eidesstattliche Erklärung.....	83

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Struktur- und Summenformeln der As-Formen.....	3
Abb. 2.2	As-Form in Abhängigkeit von Redoxpotential und pH.....	4
Abb. 2.3	Glutathion in der reduzierten (GSH) und oxidierten Form (GSSG)..	7
Abb. 2.4	Schematische Darstellung eines Aquaporins.....	13
Abb. 2.5	Van der Waals Radii und Solvent excluded surface (Connolly-Oberflächenmodell) von As(III) und Glycerol.....	18
Abb. 3.1	Messung der Transpirations- und Photosyntheserate an Reis.....	24
Abb. 3.2	Ermittlung der Frischmasse in vivo an jungen Pflanzen.....	24
Abb. 3.3	As-Spezies in der Nährlösung nach Zugabe von 0,6 mg NaAsO ₂ L ⁻¹ und Fe.....	27
Abb. 3.4	Einfluss der As(III)-Konzentration auf die Transpirationsrate (A) und Photosyntheserate (B) im Verlauf einer 10-tägigen Behandlung.....	28
Abb. 3.5	Einfluss der As(III)-Konzentration auf die Transpirationsrate (A) und Photosyntheserate (B) im Verlauf einer 1-tägigen Behandlung.....	29
Abb. 3.6	Frischmasse im Verlauf einer 11- tägigen u. 7-tägigen As(III)-Behandlung.....	31
Abb. 3.7	Einfluss der As(III)-Konzentration auf den Frischmassezuwachs nach 11-tägiger Behandlung.....	32
Abb.4.1	Versuchsaufbau zur Bestimmung der Aufnahme rate von As(III) durch Reis.....	39
Abb.4.2	Einfluss von As und Kieselsäure auf die FM-Entwicklung junger Reispflanzen	41
Abb.4.3	Einfluss einer 7-tägigen Behandlung mit As(III) bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot auf den FM-Zuwachs von Reissämlingen.....	42
Abb.4.4	As-Konzentration in Spross- und Wurzel-TM nach 7-tägiger Behandlung bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot...	43
Abb.4.5	Einfluss einer 7-tägigen Behandlung mit As(III) bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot auf As-Gehalt und –Translokation.....	44
Abb.4.6	Einfluss einer 7-tägigen Behandlung mit As(III) bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot auf die Si-Konzentration im Spross.....	44

Abb.4.7	Einfluss einer 7-tägigen Behandlung mit As(III) bei unterschiedlichem Si-Angebot auf den FM-Zuwachs von 6 Wochen alten Pflanzen.....	46
Abb.4.8	As-Konzentration in Spross- und Wurzel-TM nach 7-tägiger Behandlung bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot.....	46
Abb.4.9	Einfluss einer 7-tägigen Behandlung mit As(III) bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot auf As-Gehalt und -Translokation von 6 Wochen alten Reispflanzen.....	47
Abb.4.10	Einfluss einer 7-tägigen Behandlung mit As(III) bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot auf die Si-Konzentration in Spross und Wurzel von 6 Wochen alten Reispflanzen.....	47
Abb.4.11	Einfluss von As(III)- und Kieselsäureangebot auf die Arsenkonzentration in Spross- und Wurzel-TM nach 4-tägiger Behandlung.....	48
Abb.4.12	Anreicherung von As in der Wurzel-Frischmasse gegenüber der Außenkonzentration nach 4-tägiger Behandlung bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot.....	49
Abb.4.13	As(III)-Aufnahme nach 4-tägiger Behandlung bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot.....	49
Abb.4.14	Wechselwirkung von Si, As(III) und Wassertransport bei Reis.....	59
Abb.7.1:	As-Konzentration in Spross- und Wurzel nach 7-tägiger Behandlung bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot.....	63

Abkürzungsverzeichnis

As = Arsen

As(III) = Arsenit

As(V) = Arsenat

BVL = Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit

DMAA = Dimethylarsensäure

EC= Effective Concentration (effektive Konzentration). Konzentration, bei der 10% der maximal möglichen Wirkung eintritt.

FAO = Welternährungsorganisation (Food and Agriculture Organization)

FM = Frischmasse [g]

Gl. = Gleichung

(GS)₃= Triglutathion

GSH = Glutathion

GSSG = Disulfidglutathion

i.d.R. = in der Regel

IRRI = International Rice Research Institute

JECFA = FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

LGL = Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

MES = 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

MMAA = Monomethylarsensäure

PC = Phytochelatin

PMTDI = Provisional Maximum Tolerable Daily Intake

ROS = reaktive Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species)

s.a. = siehe auch

Sb = Antimon

TM = Trockenmasse [g]

TS = Trockensubstanz [g]

WHO = Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

1. Einleitung

Reis (*Oryza sativa*) ist ein Grundnahrungsmittel. Er stellt für die Hälfte der Erdbevölkerung das Hauptnahrungsmittel dar und ist, gemessen am weltweiten Ertrag, die dritt wichtigste Kulturpflanze (FAOSTAT 2005). Hierbei wird 80% des Ertrages im Nassanbau erzeugt (IRRI 2001). Bei dieser Anbauform kann es zur Akkumulation von Arsen im Reis kommen. Arsen (As) ist für seine bereits in geringen Mengen toxische Wirkung auf Menschen bekannt, wobei sich As-Formen und -Verbindungen in ihrer Toxizität unterscheiden. Anorganisches As ist z.B. toxischer als organisches As.

Pflanzen können As aufnehmen und über die Nahrungskette an den Menschen weitergeben. In der EU gibt es derzeit noch keine Grenzwerte für As in Lebensmitteln wie z.B. für Schwermetalle, da As-Fractionen wie anorganisches As bisher nur ungenügend bestimmt werden konnten. Dies ist seit kurzem möglich (LGL 2005, Van der Meer 2007) und mit der Weiterentwicklung exakter Bestimmungsmethoden ist auch mit der Einführung von Grenzwerten zu rechnen (BVL 2005). Im Moment bestehen folgende Richtlinien für As:

- 1.) Die Weltgesundheitsorganisation hat einen Grenzwert von $10 \mu\text{g As L}^{-1}$ für Trinkwasser festgelegt (WHO Guidelines for Drinking-Water Quality 1993).
- 2.) Die Welternährungsorganisation (FAO) und die WHO (JECFA) nennen als tolerierbare Aufnahmemenge (PMTDI) $1,5 \mu\text{g As kg}^{-1}$ Körpergewicht d^{-1} .
- 3.) In China wurde 2005 der Grenzwert für As in Lebensmitteln von 750 auf $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ gesenkt (Stone 2008).
- 4.) Für Reis haben einige Länder einen Höchstgehalt von 1 mg As kg^{-1} Korn-TS festgelegt (National Food Authority 1993). Dieser Wert wurde an Standorten mit gleichzeitig hohem As-Gehalt und hoher As-Verfügbarkeit andererseits erreicht (Meharg & Rahman 2003). Durch den Verzehr von Reis können also gesundheitsbedenkliche Mengen As aufgenommen werden.

Des Weiteren kann es durch As-Toxizität zu Ertragsminderungen kommen. Standorte mit hohem As-Gehalt können natürlichen (Deposition im Ganges-Delta, Vulkanismus in Argentinien) und menschlichen Ursprungs sein (Bewässerung mit belastetem Grundwasser im Ganges-Delta; Einsatz As-haltiger Pestizide in Baumwollplantagen in den USA oder von Kampfstoffen im Vietnamkrieg; Bergbau in China). Die Pflanzenverfügbarkeit von As andererseits ist in durchlüfteten Böden

gering. Erst durch den Anbau von Nassreis werden reduzierende Bedingungen geschaffen und es kann, wie im Fall des Ganges-Deltas oder ehemaligen Baumwollplantagen, wo belastetes Grundwasser zur Bewässerung verwendet wird, zu einer verstärkten As-Aufnahme kommen (Abedin et al. 2002b, Meharg & Rahman 2003). Hierbei herrschen anorganische As-Formen und unter diesen das Arsenit [As(III)] vor (Abedin et al. 2002), welches als die mobilere, phytotoxischere anorganische As-Form gilt (Abedin & Meharg 2002).

Die Aufnahme von As(III) sowie eine Toxizität durch As(III) bei Reis sind wiederum nur teilweise erforscht. Dabei ist die Aufnahme ein wichtiges Glied in der Kette: As im Boden → Verfügbarkeit → Aufnahme → Verlagerung → As im Korn, während eine Toxizität das Wachstum und somit den Ertrag beeinflusst. Zudem ist nicht bekannt, wie eine As(III)-Toxizität die As(III)-Aufnahme beeinflusst und welche Wirkungen die As(III)-Aufnahme auf den Toxizitätsgrenzwert hat.

Silizium (Si) ist im Gegensatz zu As für seinen positiven Einfluss auf das Wachstum von Reis bekannt. Dieser äußert sich u.a. durch eine erhöhte Toleranz gegen Trockenstress durch Verminderung der Transpiration, höhere Lichtausbeute in engen Beständen durch steilere Blattwinkelstellung sowie Resistenz gegen Krankheiten (Epstein 1994, 1999; Savant et al. 1997; Ma et al. 2001). Ma et al. (2008) zeigten, dass Si auch die As(III)-Aufnahme beeinflussen kann.

Ziel der folgenden Arbeit ist, den Einfluss von Si auf die Aufnahme von As(III) sowie eine Toxizität durch As(III) bei Reis zu untersuchen.

2. Literaturübersicht

2.1 As-Formen

As ist ein Halbmetall aus der 5. Hauptgruppe des Periodensystems und nimmt Oxidationsstufen von -3 bis $+5$ an (Latscha & Klein 2002). Es gibt eine Vielfalt an As-Formen, wobei in terrestrischer Umgebung die anorganischen überwiegen (Subramanian et al. 2002). Die wichtigsten anorganischen Formen sind hierbei das 5-wertige (oxidierte) Arsenat [As(V)] und das 3-wertige (reduzierte) As(III) (Abb. 2.1). So liegt im Grundwasser ca. 50% des Gesamtarsens als As(V) vor (Samantha et al. 1999). Organische Formen wie methylierte As-Säuren (MMAA, DMAA) (Abb. 2.1) kommen i.d.R. nur in geringer Menge vor (Rengel & Quaghebeur 2005). In der Bodenlösung dominiert As(V) unter oxidierenden Bedingungen, während unter reduzierenden Bedingungen hauptsächlich As(III) vorliegt (Masscheleyn et al. 1991, Marin et al. 1993). Abedin et al. (2002c) fanden bei Nassreis folgende As-Formen in der Bodenlösung: 36-63% As(III), 11-44% DMAA, 1-39% As(V) und 0-14% MMAA.

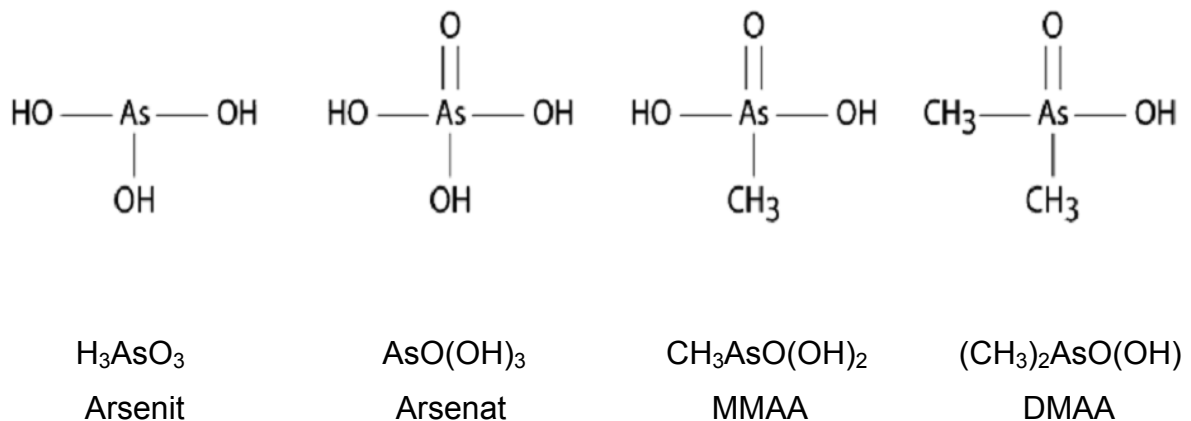


Abb. 2.1: Struktur- und Summenformeln der As-Formen (Rengel & Quaghebeur 2005).

As(III) besitzt außerdem eine hohe Affinität gegenüber Schwefel. Es bilden sich Thioarsenite bzw. As(III)-Sulfide, wobei die exakte Stöchiometrie der Thioarsenit-Komplexe nicht genau bekannt ist (Wood et al. 2002). Faktoren, die die As-Form beeinflussen, werden im Folgenden beschrieben.

2.2 As-Dynamik

Die As-Formen unterliegen Umwandlungsprozessen. Dies wiederum beeinflusst Verfügbarkeit und Toxizität des As. Welche As-Form vorliegt, hängt davon ab, wie pH, Redoxpotential, andere Stoffe, Druck, UV-Licht, Temperatur und Mikroorganismen zusammenwirken. Man kann grob zwischen anorganischen und durch Mikroorganismen beeinflussten Prozessen unterscheiden, wobei manche anorganisch und / oder mikrobiell ablaufen. Erstere können Oxidations-/ Reduktions-, Ligandentausch-, Ausfällungs- oder Adsorptionsreaktionen sein (Subramanian et al. 2002). Abb. 2.2 zeigt den Zusammenhang von pH und Redoxpotential in einem System mit 10 μM As, 10 μM S sowie O_2 und H_2O .

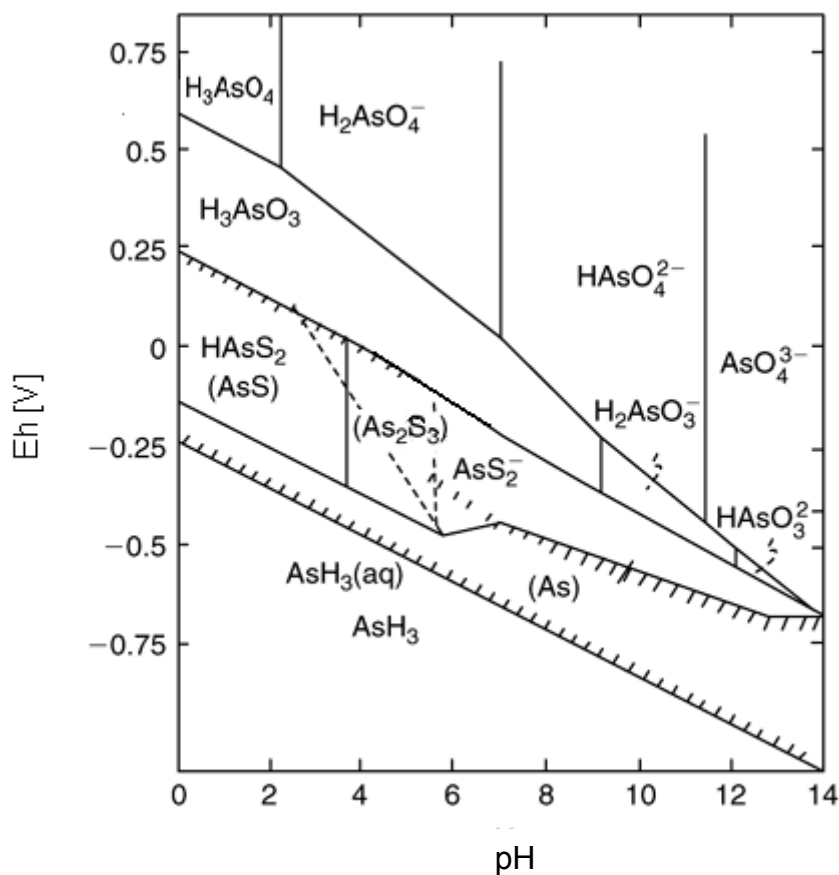


Abb. 2.2: As-Form in Abhängigkeit von Redoxpotential und pH bei 25 °C und 1 atm mit 10 μM As, 10 μM S (Ferguson & Gavis 1972).

Unter aeroben Bedingungen und bei neutralem bis schwach saurem pH liegt As(V) in den Dissoziationsstufen H_2AsO_4^- und HAsO_4^{2-} vor. Es hat ähnliche chemische Eigenschaften wie Phosphat (Hingston et al. 1972) und wird wie dieses stark an Tonminerale oder Fe-, Mn- oder Al-Oxide sorbiert (Grafe et al. 2001, Goldberg 2002, Kinniburgh & Cooper 2004). Aufgrund der hohen Affinität zu FeOH kann As(V) als

Fe(III)AsO₄ ausfallen (Pierce & Moore 1982, Takamatsu et al. 1985, Agget & Kriegman 1988). Wäre in dem System in Abb. 2.2 Fe enthalten, müsste dieses eine Fläche < pH 2,3 und Eh > 0,74 V enthalten. Unter leicht reduzierenden Bedingungen hingegen ist As(III) als ungeladenes H₃AsO₃ stabil. Sinkt das Redoxpotential weiter, können sich As-S-Komplexe bilden. Bei sehr niedrigem Redoxpotential kann außerdem flüchtiges AsH₃ entstehen (Subramanian et al. 2002).

Eine anorganische Oxidation von As(III) kann unterschiedliche Ursachen haben. So ist die Oxidation von As(III) durch O₂ bei neutralem pH langsam, kann aber von Fe (Spliethoff et al. 1995, Smedley et al. 2002, Samanta & Clifford 2005), Mn (Hammer et al. 1982) oder Al zusammen mit O₂ katalysiert werden. Es wird von einer raschen Oxidation von As(III) in Gegenwart von Al-, Fe- oder Mn-Hydroxiden berichtet (Raven et al. 1999, Matera et al. 2003). Eine Oxidation durch NO₃⁻ ist verhältnismäßig langsam (Hammer et al. 1982). Außerdem kann es zur Oxidation an Tonmineralen kommen, an die As(III) schwach und pH-abhängig sorbiert ist (Subramanian et al. 2002). UV-Strahlung und damit verbundene O₂-Radikalbildung kann die Oxidation von As(III) in wässrigen Lösungen verstärken (Hug et al. 2001). Organische Säuren wiederum können durch Komplexbildung mit z.B. Fe eine Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) verhindern und dadurch die As(III)-Oxidation vermindern (Neal et al. 2006).

Mikroorganismen - aerobe und anaerobe Bakterien - beeinflussen ebenfalls Redoxreaktionen zwischen As(III) und As(V) (McCleskey 2004), wobei sie sowohl Reduktion als auch Oxidation katalysieren (Oremland & Stolz 2003, Silver & Phung 2005). So gibt es einen über viele prokaryotische Taxa konservierten *ars* operon, welcher für eine Arsenat-Reduktase kodiert (ArsC) (Jackson & Dugas 2003). Die Reduktion kann der Detoxifizierung von aufgenommenem As(V) dienen. Zwar gilt As(III) als toxischer, doch kann dieses nun komplexiert, zu weniger toxischem organischem As methyliert (Turpeinen et al. 1999) oder mittels einer As(III)-Efflux-Pumpe (ArsB) oder einem Carrier aus der Zelle exportiert werden (Rosen 2002).

Eine Oxidation von As(III) hingegen kann als Energiequelle dienen (Santini et al. 2007, Oremland et al. 2002, Rhine et al. 2006), welche entweder an O₂ oder NO₃⁻ gekoppelt ist (Harvey et al. 2002). So berichten Ahmann et al. (1997) und Turpeinen et al. (1999) von einer raschen As(III)-Oxidation in Gegenwart von Mikroorganismen. Allerdings kann in *Agrobacterium tumefaciens* sowohl eine Oxidation als auch eine Reduktion ablaufen, wobei die Oxidation nicht mit einer Energiegewinnung für den Organismus gekoppelt ist (McDermott et al. 2006).

2.3 As und Reis

2.3.1 Wirkung von As auf das Wachstum von Reis

As beeinflusst das Wachstum von Reis meist negativ und kann zu Ertragsminderungen führen. Anorganisches As verursacht Symptome, die von geringerem Wurzelwachstum bis hin zum Pflanzentod reichen (Macnair & Cumbes 1987). So wird das als „Straighthead“ bekannte Symptom auf As zurückgeführt (Rahman et al. 2008). Es kommt zu kleinwüchsigen Pflanzen, einer geringeren Bestockung, Sterilität der Blüten, verzögerter Ernte, geringerem Tausendkorngewicht und geringerem Ertrag (Tsutsumi 1980, Rutger et al. 2005, Rahman et al. 2008). Allerdings gibt es auch Berichte, dass z.B. DMAA Trockenmasse und Anzahl der Bestockungstriebe (Marin et al. 1992) erhöht. Die möglichen Ursachen einer Ertragsdepression werden im Folgenden genauer betrachtet.

Im Zytoplasma finden sich die 4 As-Formen As(V), As(III), MMAA und DMAA wieder (Meharg & Hartley-Whitaker 2002). Diese unterscheiden sich deutlich in ihrer Toxizität gegenüber Pflanzen. Dabei gilt anorganisches As als toxischer als organisches und 3-wertiges toxischer als 5-wertiges As (Tamaki & Frankenberger 1992). Im Wesentlichen zeigen die Pflanzen 3 Reaktionen auf anorganisches As im Zytoplasma:

- 1.) Reduktion des As(V),
- 2.) Komplexierung des As(III) durch Glutathion (GSH) und / oder Phytochelatine,
- 3.) Produktion von Antioxidationsmitteln und Radikalfängern im Zusammenhang mit oxidativem Stress.

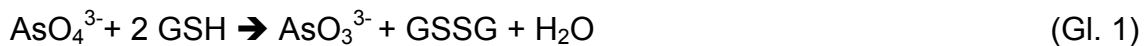
2.3.2 As(V) und As(V)-Reduktion

As(V) hat ähnliche chemische Eigenschaften wie Phosphat und kann den Energiehaushalt der Zelle stören. Es konkurriert mit Phosphat um ADP und bildet instabiles ADP-As(V), wodurch es die oxidative Phosphorylierung beeinträchtigt. (Kenney & Kaplan 1988, Ullrich-Eberius et al. 1989, Hartley-Whitaker et al. 2001, Meharg & Hartley-Whitaker 2002).

Bertolero et al. (1987) nehmen an, dass die As(V)-Konzentration im Zytoplasma nicht ausreicht, um den Stoffwechsel maßgeblich zu hemmen, da As(V) i.d.R. rasch reduziert wird. Eine Reduktion des As(V) in das zunächst toxischere As(III) ist erforderlich, da der Pflanze keine Detoxifizierungsmechanismen gegen As(V), wohl aber gegen As(III) zur Verfügung stehen.

2. Literaturübersicht

Die Reduktion selbst kann nicht-enzymatisch und möglicherweise auch enzymatisch ablaufen. Nicht-enzymatisch reduziert das in hohen Konzentrationen in der Zelle vorkommende Glutathion As(V) (Delnomdedieu et al. 1993). Hierbei reduzieren 2 Moleküle Glutathion 1 Molekül As(V) zu As(III), wobei das Glutathion unter Bildung von Disulfidbrücken oxidiert wird (GSSG) (Delnomdedieu et al. 1994) (Gl.1, Carter 1995):



Das GSSG wird wiederum zu 2 Molekülen Glutathion regeneriert (Cobett 2000). Glutathion und GSSG sind in Abb. 2.3 dargestellt:

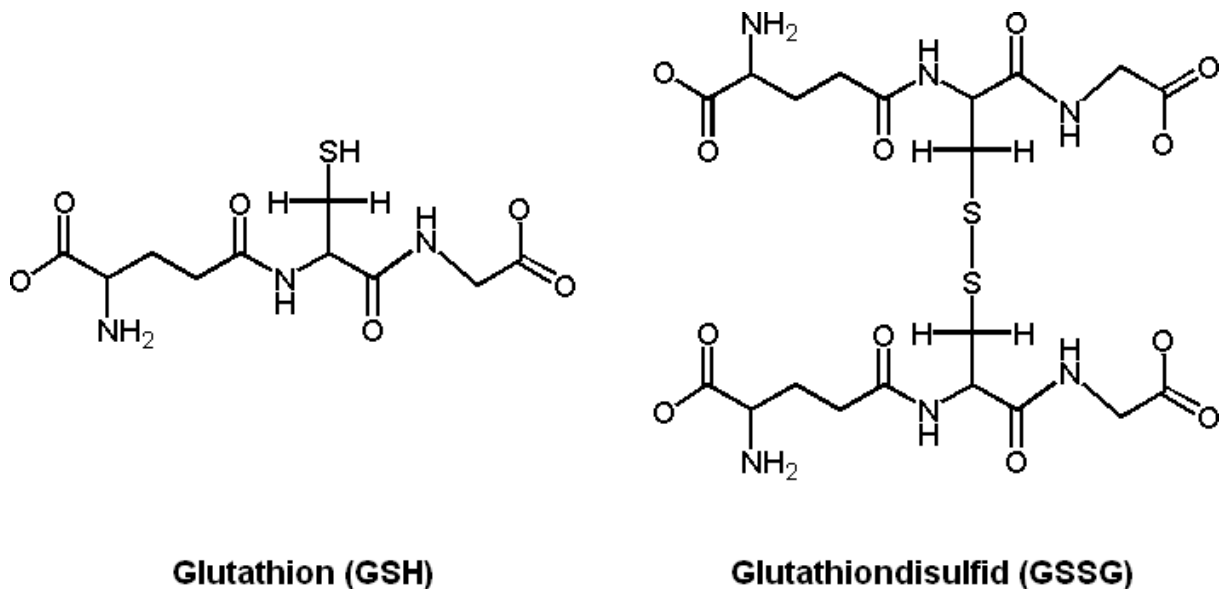
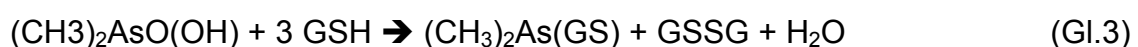
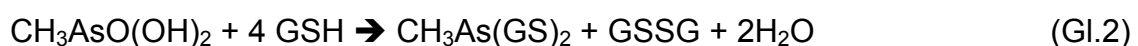


Abb. 2.3: Glutathion in der reduzierten (GSH) und oxidierten Form (GSSG).
[<http://www.med.unibs.it/~marchesi/ppp.html> 10.09.2003]

Denkbar ist auch eine Reduktion mit anschließender Komplexbildung der 5-wertigen MMAA und DMAA (Gl. 2 u. 3, Carter 1995):



Eine enzymatische Reduktion hingegen kann möglicherweise mittels einer Reduktase geschehen. So wurden im Reis homologe Gene des As(V)-Reduktase-

Gens *AtACR2* aus *Arabidopsis thaliana* gefunden (Duan et al. 2007). In *Arabidopsis thaliana* bewirkte ein silencing dieses Gens Hypersensitivität (Dhankher et al. 2006), da sich nun As(V) zu toxischen Konzentrationen akkumulieren konnte.

2.3.3 As(III)

As(III) reagiert leicht mit Thiolgruppen (-SH-Gruppen) von Proteinen und verursacht dadurch Funktionsstörungen von Enzymen und Gewebeproteinen mit folgendem Zelltod (Delnomdedieu et al. 1993, Ullrich-Eberius et al. 1989). So können u.a. Nitrat- und Nitritreduktase als auch Glutaminsynthetase beeinträchtigt sein (Jha & Dubey 2004). Als Folge der Enzymhemmungen können sich z.B. niedermolekulare Zucker anhäufen (Jha & Dubey 2004b). Als Folge kommt es neben Chlorosen und vermindertem Spross- und Wurzelwachstum auch zu Störungen bei der Aufnahme und Verlagerung anderer Nährstoffe (Shaibur et al. 2006).

Das bei der Reduktion entstandene, toxischere (s.o.) As(III) muss sofort sequestriert bzw. komplexiert werden (Ghosh et al. 1999), wobei dies wiederum durch Glutathion selbst oder mittels Phytochelatin (PC) geschehen kann. Ersteres geschieht durch Komplexierung des As(III) durch 3 Moleküle Glutathion (Gl.4, Carter 1995):



Phytochelatine hingegen sind aus Glutathion synthetisierte Polypeptide, reich an Thiol- bzw. SH-gruppen und dienen der Komplexierung von Metallen und Halbmetallen. Sie werden von vielen Elementen induziert wie Ag, Cd, Cu, Zn, Hg, Pb und ihre Produktion als Antwort auf As wurde in mehreren Pflanzenarten gezeigt (Hartley-Whitaker et al. 2001, Raab et al. 2004, Schmöger et al. 2000, Sneller et al. 1999). Erstellt werden sie durch eine Phytochelatin-Synthase (Grill 1987, Schmöger et al. 2000), welche die Glutathion-Moleküle verknüpft. Die Struktur der Phytochelatine ist $(\gamma\text{-Glutamin-Cystein})_n\text{Glycin}$ mit $n = 2-11$. Allerdings sind $(\gamma\text{-Glutamin-Cystein})_2\text{Glycin}$ und $(\gamma\text{-Glutamin-Cystein})_3\text{Glycin}$ bzw. Phytochelatin₂ und Phytochelatin₃ die am häufigsten anzutreffenden Formen (Cobbett & Goldsbrough 2002, Raab et al. 2007).

Bei der Detoxifizierung von As durch Glutathion oder Phytochelatine komplexieren immer drei Thiolgruppen der Cysteine aus Glutathion bzw. Phytochelatinen ein As(III)-Molekül (Pickering et al. 2000, Schmöger et al. 2000).

As(V) induziert zwar auch die Phytochelatin-Synthese, hat allerdings keine Affinität zu den Thiolgruppen und wird nicht komplexiert (Schmöger et al. 2000). Es muss erst zu As(III) reduziert werden.

Es gibt Ansätze, eine As-Toxizität durch die Syntheserate von PCs sowie durch das Verhältnis von gebundenen zu ungebundenen Phytochelatinen zu charakterisieren. So konnten Untersuchungen an *Helianthus annuus* mit As(V)-Applikation (Raab et al. 2007) zeigen, dass bereits geringste Konzentrationen As die PC-Synthese induzieren und mit steigender, aber nicht-toxischer Konzentration des As-Angebotes zunächst alles As komplexiert wird. Hierbei weist das Verhältnis von freiem zu PC-gebundenem As den Verlauf einer Optimumskurve auf, deren Höhepunkt noch vor der Konzentration liegt, ab der das Wurzellängewachstum beeinträchtigt ist. Somit kann möglicherweise auch bei Reis durch Bestimmung der As- und PC-Fractionen ein Eingriff von As in den Zellhaushalt entdeckt werden.

Da As-Thiol-Komplexe nur bei niedrigem pH stabil sind (Schmöger et al. 2000, Sneller et al. 2000), werden sie möglicherweise in der Vakuole gespeichert. So kann der Transporter *ycf1p* in *Saccharomyces cerevisiae* As-Thiol-Komplexe aktiv in die Vakuole transportieren (Ghosh et al. 1999, Rosen 1999) und es wird angenommen, dass höhere Pflanzen dies auch können (Tong et al. 2004).

2.3.4 Wirkung der As(V)-Reduktion

Hartley-Whitaker et al. (2001) nehmen an, dass bei der Reduktion von As(V) (Gl.1) entstehende reaktive Sauerstoffverbindungen (u.a. $O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} , LOO^{\cdot} , LO^{\cdot} , H_2O_2 , $LOOH$, O_3 , OCI^{\cdot} , und angeregte [Singulett-] Sauerstoffmoleküle 1O_2) zur Lipidoxidation und somit zu Membranschäden führen. Als Reaktion auf anorganisches As und Zeichen von oxidativem Stress werden Antioxidationsmittel und Radikalfänger („Scavenger“) produziert (Hartley-Whitaker et al. 2001, Liu et al. 2001). Sie können enzymatisch oder nicht-enzymatisch sein. So haben Mylona et al. (1998) an *Zea mays* gezeigt, dass As(V) und As(III) zu höheren Gehalten an Katalase, Glutathion-S-Transferase und Superoxiddismutase führen. Meharg et al. (2006) konnten auch bei Reis mit P-Mangel und As(V)-Applikation eine erhöhte Produktion der Guaiacol Peroxidase, Superoxiddismutase und Katalase feststellen. Nicht-enzymatische Antioxidationsmittel im Reis sind Glutathion und Ascorbat (Hartley-Whitaker et al. 2001, Meharg & Hartley-Whitaker 2002).

2.3.5 Glutathion als Toleranzindikator?

Obwohl Glutathion eine überragende Rolle bei der Detoxifizierung von As in der Zelle zu haben scheint, ist es kein guter Indikator für die Sensitivität oder Toleranz eines Genotypen. Für eine hohe As-Toleranz muss die Pflanze zwar das As reduzieren und komplexieren, aber gleichzeitig auch auf oxidativen Stress reagieren (s.o.). Glutathion wird für jeden dieser Schritte benötigt, ist aber gleichzeitig der Baustein der Phytochelatine. Bildet die Pflanze vermehrt Phytochelatine, kann es zu einem Mangel an Glutathion kommen. Ein geringer Glutathion-Gehalt kann also auf geringer Glutathion-Synthese oder erhöhter Phytochelatin-Synthese beruhen. As-sensitive Genotypen können z.B. vermehrt oxidativen Stress aufweisen, da eine hohe Produktion von Phytochelatinen zu einem Glutathion-Mangel bei der Bekämpfung von reaktiven Sauerstoffverbindungen führt (Sneller et al. 1999, Hartley-Whitaker 2001). So wiesen sensitive Reis-Genotypen hohe H_2O_2 -Konzentrationen (Meharg et al. 2006) und sensitive Genotypen von *Holcus lanatus* erhöhten Ionenaustritt (Exosmosis) von K, P und As auf (Hartley-Whitaker et al. 2001). Letzteres deutet auf beeinträchtigte Membranfunktionen hin. Andererseits zeigten As(V)-tolerante Genotypen von *Holcus lanatus* weniger Lipidoxidation (Hartley-Whitaker et al. 2001). So können sensitive Genotypen auch eine hohe Konzentration an Guaiacol Peroxidase, Superoxiddismutase, Ascorbat-Peroxidase und Katalase sowie Glutathion und Ascorbat zeigen (Hartley-Whitaker et al. 2001). Toleranz oder Sensitivität scheinen also auf verschiedenen Ursachen im Stoffwechsel und einem Zusammenspiel aus Glutathion- und Phytochelatin-Synthese zu beruhen.

2.4 As-Aufnahme

Reis nimmt Arsen als anorganisches As(V) und As(III) oder organisches MMAA, DMAA (Marin et al. 1992, 1993) auf.

As(V) wird aktiv durch das Phosphat Kotransport-System aufgenommen (Ullrich-Eberius et al. 1989, Meharg & Macnair 1992). Es verhält sich wie im Boden und im Zytoplasma (s.o.) auch bei der Aufnahme analog Phosphat und beide konkurrieren um die gleichen Absorptionsstellen im Apoplasten und den gleichen Carrier in der Wurzelmembran (Meharg & Macnair 1992, 1994, Abedin et al. 2002, 2002 b, Wang et al. 2002). So kann Phosphat in der Lösung die As(V)-Aufnahme senken (Tsutsumi 1980).

Die As(III)-Aufnahme von Reis hingegen ist weniger erforscht. So gibt es nur wenige Veröffentlichungen, die eine Aufnahme von As(III) durch Reis direkt behandeln (Abedin et al. 2002c, Meharg & Jardine 2003, Chen et al. 2005). In Kurzzeitversuchen (<30 min.) wurde mit abgeschnittenen Wurzeln eine Aufnahmekinetik erstellt. Hierbei schien die As(III)-Aufnahme:

a) nicht durch einen Phosphattransporter zu erfolgen, da As(III) und Phosphat in ihren chemischen Eigenschaften deutlich verschieden sind (Rengel & Quaghebeur 2004) und Phosphat selbst bei hohen Konzentrationen die As(III)-Aufnahme nicht beeinflusste (Abedin et al. 2002c).

b) im niedermolaren Bereich (0 - 0,0532 mM As) einer Michaelis-Menten-Funktion zu folgen, wobei sich verschiedene Sorten in der maximalen Aufnahmerate (I_{max}), nicht aber in der Affinität des Aufnahmesystems (K_m) unterschieden (Abedin et al. 2002c).

c) bei höheren Konzentrationen (>0,0532 mM As) linear abhängig von der angebotenen Konzentration zu sein (Abedin et al. 2002c).

d) durch Glycerol und Sb kompetitiv hemmbar zu sein (Meharg & Jardine 2003).

Die Autoren schließen daraus, dass Reis As(III) aktiv bzw. gegen den Konzentrationsgradienten durch einen Kanal aus der Familie der Aquaglyceroporine aufnimmt. Hierbei stützen sie sich darauf, dass Aquaglyceroporine Wasser und teilweise gelöste ungeladene Stoffe transportieren (s.u.), in allen Bakterien, Pilzen, Tieren und Pflanzen vertreten sind (Maurel 1997) und in hoher Konzentration in der Reiswurzel exprimiert werden (Li et al. 2000). Tatsächlich wurden in Hefe und Säugetieren bereits einige Aquaglyceroporine entdeckt, die As(III) transportieren (*Saccharomyces cerevisiae*: Fps1pm, Wysocki et al. 2001; Säugetiere: AQP9, Rosen et al. 2002b). Zudem konnte Lsi1, ein Siliziumtransporter in Reis (Ma et al. 2006) der als nodulin 26-like intrinsic membrane protein (NIP) zu der Familie der Aquaporine gehört, als As(III)-transportierendes Aquaglyceroporin identifiziert werden (Ma et al. 2008). Die Aufnahme von As(III) durch Aquaglyceroporine bei Reis ist also möglich. Im Folgenden wird daher näher auf die Eigenschaften von Aqua(glycero)porinen eingegangen.

2.5 Struktur, Funktionsweise, Selektivität und Regulierung der Aqua(glycero)porine

Aquaporine sind Wassertransportproteine und gehören zur Familie der Major Intrinsic Proteins (MIPs) der transmembranen Kanäle (Maurel 1997). Sie kommen in der Plasmamembran (PIP) als auch im Tonoplasten vor (TIP), sind 26 – 30 kDa groß und bestehen aus 6 membrandurchspannenden α Helices, wobei N- und C-termini beide auf der zytosolischen Seite lokalisiert sind (Maurel 1999). Angeordnet sind Aquaporine als Tetramere, wobei jedes Monomer als Kanal fungiert, nicht aber der Raum in der Mitte der vier Monomere. 2 kleinere Schleifen falten sich aus entgegengesetzten Richtungen kommend symmetrisch zur Aquaporinmitte hin und geben dem Kanal die typische „Sanduhr“-Form (Abb. 2.4). Durch das Aufeinandertreffen dieser beiden Schleifen entsteht das so genannte NPA-Motiv, das aus einer hochgradig konservierten Asparagin-Prolin-Alanin-Sequenz in jeder der beiden Schleifen besteht. Asparagin 68 und Asparagin 203 sind nebeneinander so angeordnet, dass ihre Amidgruppe jeweils mit dem positiv geladenen Wasserstoffatom in den Kanal hineinragt (Tajkhorshid et al. 2001). Diese Stelle bestimmt zusammen mit der engsten Stelle des Kanals die Selektivität des Aquaporins. Letztere ist der so genannte Selektivitätsfilter (SF) und hat im Aquaglyceroporin GlpF (*E.Coli*) einen Durchmesser von ≤ 35 nm (Fu et al. 2000, Nollert et al. 2001).

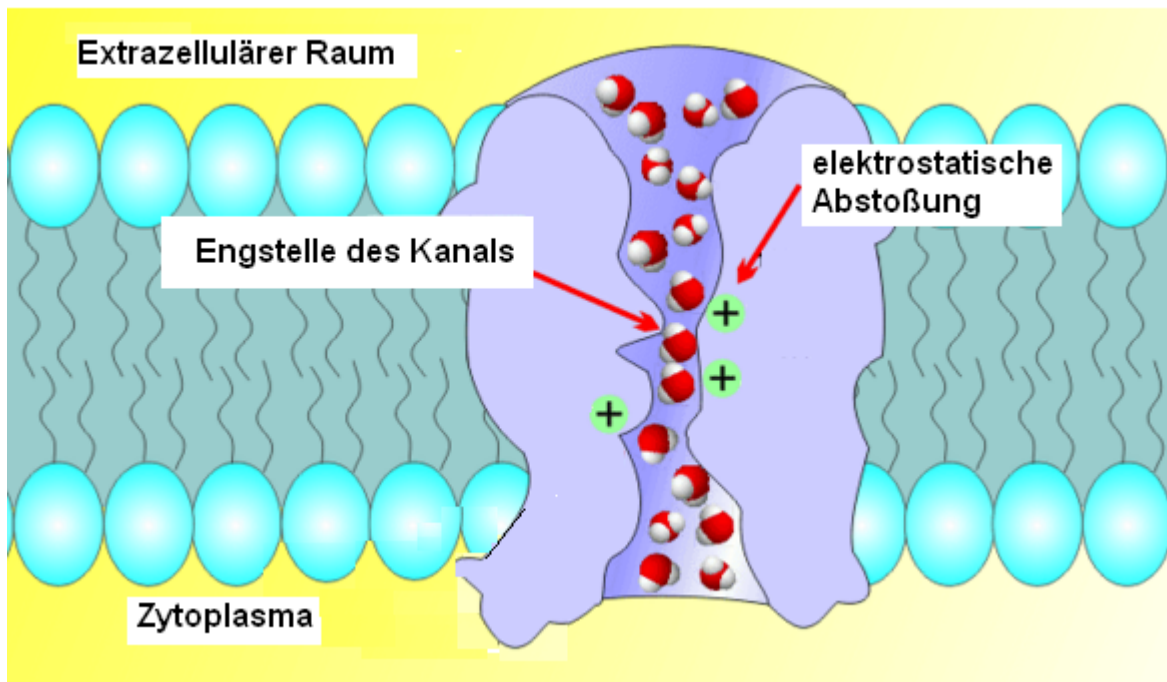


Abb. 2.4: Schematische Darstellung eines Aquaporinkanals.

[<http://de.wikipedia.org/wiki/Aquaporin>]

Die Selektivität des Aquaporins beruht auf folgenden Substrat- bzw. Moleküleigenschaften: Durchmesser, sterische Anordnung, Ladung, die Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen und möglicherweise die Affinität zu –SH-Gruppen.

Aquaporine sind mit nur wenigen Ausnahmen hochselektiv gegenüber Ionen, insbesondere H^+ . Diese werden aufgrund der positiv geladenen Amidgruppen am Asparagin 68 und 203 zurückgehalten (de Groot et al. 2003). Außerdem wird an dieser Stelle wahrscheinlich der Grothuss-Mechanismus, das Weiterreichen der H^+ von Wassermolekül zu Wassermolekül, unterbrochen (s.u.).

Der Weg eines ungeladenen Moleküls von der periplasmatischen zur zytosolischen Seite der Membran wird am Beispiel des Glycerol durch GlpF, einem bakteriellen Aquaglyceroporin, beschrieben:

Durch den Kanaldurchmesser und Wasserstoffbrückenbindungen bedingt, können Moleküle ab einer bestimmten Stelle im Kanal nur einzeln hintereinander wandern (Fu et al. 2000). Der aliphatische / hydrophobe „Rücken“ des Glycerol ist apolaren Aminosäuren auf der einen Kanalinnenseite zugewandt, während die OH-Gruppen des Glycerol Wasserstoffbrückenbindungen mit polaren Gruppen (Carbonylgruppen

C=O) von Aminosäuren auf der gegenüberliegenden Kanalinnenseite sowie mit Wassermolekülen eingehen (Fu et al. 2000). Das Molekül wird nun über die Wasserstoffbrückenbindungen von Aminosäure zu Aminosäure weitergereicht, wobei es als H-Atom-Spender fungiert. Die engste Stelle des Kanals ändert nichts an der Transportweise und kann aufgrund des Moleküldurchmessers passiert werden. Das Glycerol liegt hier aufgrund seiner Struktur so, dass es die Transportbedingung der Wasserstoffbrückenbindungen erfüllt und diese Stelle gleichzeitig mit seinem kleinsten Durchmesser passiert. Auf halbem Weg zum Zytosol wird das Molekül durch die positiv geladenen Wasserstoffatome der Amidgruppen von Asparagin 68 und 203 gezwungen, Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen, wobei es nun zweimal das H-Atom vom Asparagin erhält (Tajkhorshid et al. 2001) und zu einer Rotation gezwungen wird (Tajkhorshid et al. 2002). Hierdurch wird vermutlich auch der Grotthuss-Mechanismus (s.o.) unterbrochen (Tajkhorshid et al. 2002).

Die Polarität der Aminosäuren entlang der Kanalinnenwand bestimmt neben dem Kanalinnendurchmesser also die Selektivität (Tajkhorshid et al. 2001) und damit, ob es sich um ein reines Aquaporin oder ein Aquaglyceroporin handelt. So haben Aquaporine, die nur Wasser durchlassen, mehr Stellen mit hydrophilen Gruppen (statt Tryptophan 48 und Phenylalanin 200 nämlich Phenylalanin und Histidin). Diese würden ungünstig mit dem aliphatischen Teil des Glycerol reagieren (Tajkhorshid et al. 2001). Der Kanaldurchmesser von AqpZ, einem reinen Aquaporin, ist mit 24 nm deutlich kleiner als im Fall des Aquaglyceroporins GlpF (≤ 35 nm) (Tajkhorshid et al. 2005). Je Aminosäure und Kanalinnendurchmesser gibt es Aqua(glycero)porine, die nur für Wasser (Maurel et al. 1993), für Wasser und ungeladene Teilchen wie Harnstoff (AQP3, Echevarria et al. 1994, Ishibashi et al. 1997) oder sogar für Ionen durchlässig sind (AQP6, Agre et al. 2002). In Pflanzen transportieren Aquaporine u.a. Ammoniak und Ammonium (Jahn et al. 2004), Bor (Dordas et al. 2000) und Wasserstoffperoxid (Henzler & Steudle 2000). Diese Stoffe und Wasser können im Kanal in beide Richtungen fließen – allerdings passiv, entlang des osmotischen oder hydraulischen Gradienten (Maurel 1997). Z.B. ist die Geschwindigkeit, mit der Teilchen den Kanal passieren, bei Aquaglyceroporin in beide Richtungen gleich (Tajkhorshid et al. 2002b). Auch deuteten Simulationen mit unterschiedlichem hydrostatischem Druck eine lineare Abhängigkeit des Wassereinstroms von diesem an (Tajkhorshid et al. 2002c, 2004).

Reguliert werden Proteine und damit Aqua(glycero)porine auf zwei verschiedenen Ebenen. Erstens durch Kontrolle der Expression und damit der Häufigkeit des Proteins und zweitens über eine Kontrolle der Aktivität des einzelnen Proteins (Maurel & Chrispeels 2001). Der Kanal selbst kann geöffnet und geschlossen werden und unter Umständen auch kollabieren, wobei jegliche Regulierung auf der zytosolischen Seite der Membran erfolgt. Eine Phosphorylierung von Serin versetzt den Kanal in einen geöffneten Zustand, und er wird durch Dephosphorylierung, z.B. bei Trockenheit, geschlossen (SoPIP2 in Spinat, Johansson et al. 1998). Ebenso kann bei einem Absinken des zytosolischen pH von 7 auf 6 eine Protonierung von Histidin, z.B. unter anoxischen Bedingungen, den Kanal schließen (Tournaire-Roux et al. 2003). Auch freie Ca^{2+} -Ionen verursachen ein Schließen des Kanals (Németh-Cahalan & Hall 2000). „Geschlossen“ wird der Kanal, indem sich eine Schleife (loop D) des Proteins, welche ins Zytosol ragt, über die Kanalöffnung legt, eine hydrophobe Barriere an dieser Stelle bildet und den Kanal z.B. bei Spinat (SoPIP2) von >40 nm auf 8 nm verengt (die engste Stelle in SoPIP2 ist sonst 21 nm) (Tajkhorshid et al. 2006). Des Weiteren vermutet man, dass Öffnen und Schließen von dem osmotischen Druck bzw. der Osmolarität (Ye et al. 2004) und der Heteromerisation des Aqua(glycero)porins (Fetter et al. 2004) abhängig sind. Außerdem können die Verteilungswege vom Synthesort zur Membran („membrane trafficking“) über den Golgi-Apparat (Chaumont et al. 2005) und durch die Anzahl der Kanäle je Membran reguliert werden.

Bestimmte Stoffe können Aqua(glycero)porine blockieren. So können Quecksilber-Verbindungen an SH-Gruppen binden oder Cystein-Reste im Eingangsbereich des Kanals oxidieren. Letzteres kann durch SH-reduzierende Stoffe wie 2-Mercaptoethanol rückgängig gemacht werden. Allerdings gibt es hierbei deutliche Ausnahmen mit Hg-insensitiven Aquaporinen. So wirken verschiedene Hg-Verbindungen unterschiedlich je nach Temperatur und pH (Naccache & Sha'afi 1974). In Versuchen mit intakten Pflanzen ist Hg problematisch, da einige Hg-Formen auch starke Stoffwechselgifte sind (Maurel 1999). Spezifische Hemmstoffe oder Blocker für Aquaporine sind derzeit nicht bekannt.

2.6 As(III)-Aufnahme

2.6.1 Transporter

Damit ein Transport von As(III) durch Aquaglyceroporine stattfinden kann, müssen deren Eigenschaften kompatibel mit denen des As(III) sein. Dies ist der Fall, denn As(III) liegt bei leicht reduzierenden Bedingungen bei neutralem bis saurem pH als ungeladenes H_3AsO_3 vor (s.o.). Da es keine Ladung besitzt, würde es durch positiv geladene Amidgruppen (s.o.) nicht zurückgestoßen werden. Das Molekül ist symmetrisch in Form einer Pyramide, mit einem Durchmesser von 411 pm (Abb. 2.5; Ma et al. 2008). Somit ist es kleiner als Kieselsäure (438 pm), welche u.a. durch NIPs transportiert wird (Ma et al. 2008). Mit seiner Größe würde H_3AsO_3 durch kein reines Aquaporin, aber durch ein Aquaglyceroporin mit ähnlichem Durchmesser wie GlpF passen. Die drei OH-Gruppen könnten die Wasserstoffbrücken eingehen und hierbei H-Atome spenden oder empfangen. Tatsächlich wurde bestätigt, dass die NIPs und Siliziumtransporter Lsi1 und Lsi6 (Ma et al. 2008) H_3AsO_3 transportieren. Zudem konnte der Siliziumtransporter Lsi2 als ein möglicher $\text{H}_3\text{AsO}_3\text{-H}^+$ -Antiport identifiziert werden. Hierbei kommt Lsi6 überwiegend im Spross vor, wird aber auch in geringen Mengen in Wurzel exprimiert. Lsi1 und Lsi2 kommen beide in der Wurzel vor, allerdings sind Lsi1 jeweils an der distalen und Lsi2 jeweils an der proximalen Seite von Exodermis und Endodermis situiert. Dementsprechend ermöglicht Lsi1 den Influx und Lsi2 den Efflux von Stoffen ins bzw. aus dem Zytosol.

2.6.2 Aufnahme

Aquaglyceroporine fungieren als passive Transporter (s.o.). Die Aufnahmefunktion eines einzelnen Kanals wie Lsi1 (s.o.) müsste eine lineare Korrelation zwischen Substratkonzentration und Aufnahme über einen bestimmten Konzentrationsbereich zeigen. Eine lineare Funktion kann allerdings bei Absättigung des Kanals in einem Plateau münden („linear response model“). Betrachtet man eine bestimmte Fläche der Membran, so bestimmt dort die vertretene Anzahl an Aquaglyceroporinen die maximal aufnehmbare As(III)-Menge pro Zeiteinheit bzw. die Plateauhöhe. Hingegen ist die Wirkungsweise eines Transporters wie Lsi2 als $\text{H}_3\text{AsO}_3\text{-H}^+$ -Antiport vom H^+ -Gradienten abhängig, welcher durch H^+ -Transporter unter Verbrauch von Energie aufrecht gehalten wird. Da Lsi2 ein Effluxtransporter ist, würde ein Anstieg des externen pH-Wertes bzw. ein Absinken des pH im Zytosol den Transport verringern.

Mit steigender Konzentration ist zudem nicht auszuschließen, dass As(III) selbst die Funktion der Kanäle beeinträchtigt. So wurde bei der Bestimmung der Aufnahme­rate an intakten Pflanzen bei höheren Konzentrationen eine toxische Wirkung des As(III) beobachtet (Hoffmann 2007). Es könnte das Schließen von Aquaglyceroporinen durch Stoffwechselwege im Zellinneren und durch Binden an SH-Gruppen verursachen. Eine Oxidation von Cystein im Eingangsbereich der Aqua(glycero)porin­poren auf der apoplastischen Seite könnte zu einem Kollabieren der Kanäle führen, aber auch eine Inhibition von Aquaporin- als auch Aquaglyceroporin-regulierende Proteinkinasen oder Aktivierung von entsprechenden Phosphatasen im Zytosol ist möglich. Ebenso könnte Lsi2 direkt o. indirekt durch As(III) betroffen sein. Eine Beeinträchtigung der H⁺-Transporter o. Veränderung des pH würde die Aufnahmefunktion ebenfalls beeinflussen (s.o.).

Da Lsi1 und Lsi6 Siliziumtransporter sind, Si bekannt für seinen Einfluss auf den Wasserhaushalt ist, dieser Aquaglyceroporine wie Lsi1 und Lsi2 sowie andere möglicherweise As(III)-transportierende NIPs beeinflusst, werden die Eigenschaften des Si im folgenden besprochen.

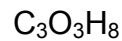
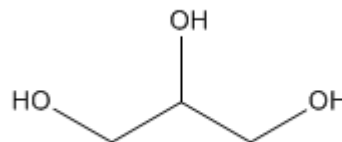
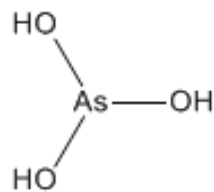
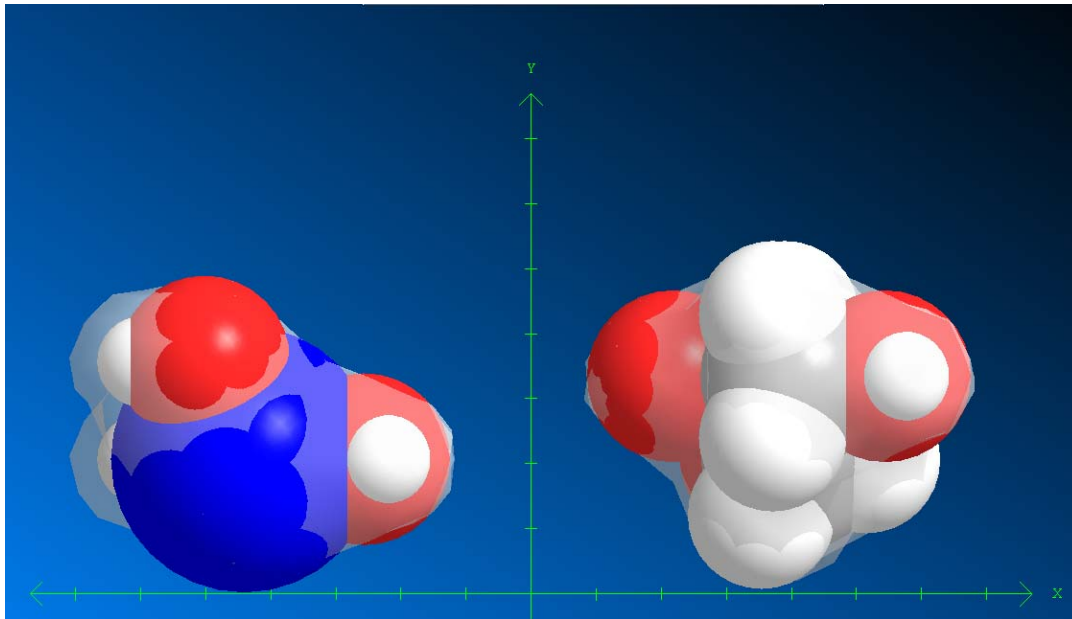


Abb. 2.5) Van der Waals Radii und Solvent excluded surface (Connolly-Oberflächenmodell) von As(III) und Glycerol, gezeichnet mit Chem3D Ultra. Relative Darstellung mit Frontalsicht des geringsten Durchmessers. Atome: Rot = O, Weiß = H, Blau = As, Grau = C.

2.7 Silizium

2.7.1 Eigenschaften

Silizium (Si) ist in Bezug auf die Masse als auch Anzahl der Atome das zweithäufigste Element der Erdkruste. Hierdurch kommt es je Ausgangsgestein auch in hohen Konzentrationen in der Bodenlösung vor. In Form von Kieselsäure findet es sich hier im Bereich von 0,12 bis 1,42 mM (Marschner 1995) bzw. 0,1 bis 0,6 mM (Epstein E. 1994) wieder. Diese Konzentrationen liegen noch über denen, die für andere anorganische Makronährstoffe (K⁺, Ca²⁺, SO₄²⁻...) als gängig betrachtet werden (Barber 1984).

Pflanzen nehmen Si auf, obwohl es nicht zu den Nährstoffen zählt. Sie enthalten Si in Konzentrationen von 0,1 bis 10% in der TM. Damit kann Si in Konzentrationen in der Pflanze vorkommen, die noch über denen der Makronährstoffe liegen. Takahashi & Miyake (1977) untersuchten 175 auf gleichem Boden gewachsene Pflanzenarten hinsichtlich ihrer Zusammensetzung. Von neun untersuchten Elementen wies Si die höchste Variabilität auf, was dazu führte, Pflanzen mit mehr als 1% Si in der Blatt-TM als Si-Akkumulatoren zu definieren. Reis zählt mit bis zu 10% Si in der TM ebenfalls zu den Si-Akkumulatoren (Takahashi et al. 1990).

Si wird im Xylem verlagert und ein Einfluss der Transpiration auf die Verlagerung ist anzunehmen (Fauteaux et al. 2005, Mitani & Ma 2005, Ma & Yamaji 2006). Es hat die Eigenschaft bei höherer Konzentration zu polymerisieren und liegt dann hauptsächlich in Form von amorphem $\text{SiO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$ vor (Epstein 1994). Hierbei kommt Si in allen Pflanzenteilen vor, wobei es in Zellwänden akkumuliert. Da die Pflanze dabei im Vergleich zu Lignin oder Kohlenhydraten nur 3,7 bzw. 6,7 % der Energie aufbringen muss um Si in Zellwände zu inkorporieren, stellt dieses somit einen energetisch wesentlich günstigeren Baustein dar (Raven 1983). Zudem wirkt Si selbst in hohen Konzentrationen in der Pflanze nicht toxisch. Durch eine hohe Si-Akkumulation kann es allerdings zu einem veränderten Phänotypen kommen. Eine kontinuierlich hohe Si-Ernährung führt bei Reis zu einer steileren Blattwinkelstellung, wobei die Blätter rau und scharfkantig sind.

Auf das Wachstum von Reis hat Si einen positiven Einfluss und im Reisanbau wird eine Si-Düngung vorgenommen um Höchsterträge zu erzielen, aber auch auf nährstoffarmen Böden wie z.B. Ultisolen kann so der Ertrag gesteigert werden (Yamauchi & Winslow 1989). Ohne Si hingegen sind Spross- und Korn-TM reduziert (Ma et al. 1989).

Die physiologischen Zusammenhänge der positiven Wirkung von Si auf das Wachstum von Reis sind nicht gänzlich bekannt, jedoch konnte folgendes beobachtet werden:

- 1.) Si kann die Transpirationsrate und stomatäre Leitfähigkeit senken und so einem exzessiven Wasserverlust bei Trockenheit vorbeugen (Agarie et al. 1998).
- 2.) Aber auch in Nährlösung kann Si in Form von Kieselsäure zu erhöhtem Wachstum führen (Guo et al. 2005).

3.) In Nährlösung kann Si die Resistenz gegenüber Salzstress erhöhen (Natoh et al. 1986)

4.) Mn-Toxizität kann in Nährlösung durch Si vermindert werden (Horiguchi 1988).

5.) Si-Ernährung führt zu vermindertem Pilzbefall (Jones & Hendreck 1967, Fauteaux et al. 2005).

Zudem wurde von verminderter As-Aufnahme und -toxizität bei ausreichender Si-Ernährung berichtet. Der Einfluss von Si auf die As-Aufnahme und -toxizität wird im Folgenden besprochen.

2.7.2 Einfluss von Si auf die As-Aufnahme

Si kann die As(III)-Aufnahme und -toxizität möglicherweise lindern. Guo et al. (2005) berichten von deutlich verminderten As-Konzentrationen in Spross- und Wurzel-TM durch Kieselsäureapplikation (0,5 mM) bei einem As(V)-Angebot von 6,7 und 13,3 μM in Nährlösung. Gleichzeitig führte die As(V)-Applikation zu einer geringeren Akkumulation von Si in der Wurzel-TM. Hierbei ist aber unklar, wie Si die As(V)-Aufnahme beeinflusst. Möglicherweise lag ein Teil des As als As(III) vor, denn es ist bekannt, dass ein kontinuierliches Angebot von Si die Expression der Si-Transporter Lsi1 und Lsi2 (s.o.) auf $\frac{1}{4}$ reduziert (Ma et al. 2006, Ma et al. 2007). Durch Senken der Anzahl der Transporter könnte Si somit die As(III)-Aufnahme über Lsi1 und Translokation mittels Lsi2 verringern (Ma et al. 2008). Da As(III) u.a. durch Aquaglyceroporine aufgenommen und zudem im Xylem verlagert wird, kann möglicherweise auch eine durch Si herabgesetzte Transpiration einen Einfluss auf Aufnahme und Verlagerung haben. In ihren Versuchen fanden Ma et al. (2008) nach 7 Tagen Behandlung mit 2 μM As(III) und 0,5 mM Kieselsäure eine signifikante Abnahme der As-Konzentration im Xylem-Saft wie auch im Spross.

2.8 Hypothesen

Aus den besprochenen Eigenschaften von As(III) und Si sowie der möglichen Wege von Aufnahme und Verlagerung lässt sich auf einen Einfluss von As(III) und Si auf den Wasserhaushalt der Pflanze schließen. Hieraus leiten sich folgende Hypothesen ab:

- 1.) Die As(III)-Aufnahmerate intakter Reispflanzen erfolgt passiv und zeigt unter nicht toxischen Konzentrationen einen linearen Verlauf in Abhängigkeit der Konzentration.
- 2.) As(III) beeinflusst den Wasserhaushalt und die Transpirationsrate von Reis.
- 3.) Si führt zu einer verminderten Aufnahme von As(III) sowie Translokation von As, wodurch die schädigende Wirkung von As(III) auf das Wachstum von Reis vermindert wird.

Aufgrund dieser Literaturübersicht und der daraus abgeleiteten Hypothesen werden im Folgenden Kapitel 3 Versuche zur Auffindung eines Parameters zur As(III)-Toxizität besprochen, mit deren Hilfe anschließend die Wirkung von As(III) auf das Wachstum von Reis in Abhängigkeit der Si-Ernährung genauer untersucht wurde (Kapitel 4). Daher wird der gegenwärtige Wissensstand dort getrennt und scharf fokussiert sowie die angewendeten Methoden vorangestellt.

3. Methodenentwicklung

3.1 Ziel der Methodik

Ziel der Verfahren war, die toxische Wirkung von Arsenit auf das Wachstum intakter Pflanzen und die Arsenitaufnahme zu untersuchen. Da eine Aufnahmekinetik lediglich im nicht-toxischen Bereich sinnvoll ist, musste zunächst untersucht werden, ab welchen Konzentrationen Arsen das Wachstum beeinflusst. Hierfür bedurfte es eines quantifizierbaren Parameters, der auch bei Pflanzen ohne äußere Symptome *in vivo* und im Versuchszeitraum Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Pflanzen aufzeigen kann. An drei Wochen alten Pflanzen in Nährlösung wurden daher folgende Parameter untersucht:

- die Transpirationsrate und Photosyntheserate im Verlauf eines Tages sowie im Verlauf von 10 Tagen.
- die Frischmasseentwicklung über 11 (Vorversuch) sowie über 7 Tage.

3.2 Pflanzenmaterial und Kulturverfahren

3.2.1 Kultur

Samen der Reissorte 'Selenio' wurden 4-6 Tage bei Raumtemperatur in Leitungswasser zum Keimen gebracht. Die Keimlinge wurden anschließend in Filterpapier gerollt und die Rollen hochkant für 6 Tage in Leitungswasser gestellt. Sämlinge gleicher Spross- und Wurzellänge wurden anschließend in schwarze 5L Kunststoff-Töpfe mit unbelüfteter Nährlösung überführt. Hierzu wurden die Pflanzen auf Höhe des Samens in Schaumstoff geklemmt und so auf Kunststoffplatten gelegt, dass die Wurzel vollständig in Nährlösung getaucht war. Anzucht und Differenzbehandlung erfolgten in einer Klimakammer (Vötsch Industrietechnik GmbH) bei 25 / 20 °C Tag- / Nachtlufttemperatur (je 12 Stunden), 70 % rF und 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR in Bestandeshöhe.

3.2.2 Nährlösung

Die Pflanzen wurden in unbelüfteter Nährlösung ohne bzw. mit Si in Form von 0,89 mM K_2SiO_3 kultiviert, die jeden zweiten Tag gewechselt wurde und folgende Zusammensetzung hatte (in mM): 1 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$; 0,097 KH_2PO_4 ; 0,723 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,1 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,428 NH_4NO_3 ; und in μM : 0,079 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 17,9 Fe (als Chelat, Sequestren); 2,00 H_3BO_3 ; 1,82 $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,071 $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$; 0,765 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Ein K-Ausgleich der Kontrolle fand mit 0,89 mM K_2SO_4 statt. Die Lösung wurde während der Anzucht alle 2 Tage, während der Differenzbehandlung täglich gewechselt und mit KOH auf pH 6 eingestellt.

3.2.3 Ernte

Die Pflanzen wurden mit destilliertem Wasser gespült und Spross- und Wurzel getrennt hinsichtlich ihrer Frisch- und Trockenmasse sowie Gesamtarsengehalte untersucht.

3.3 Differenzbehandlung

Während der Differenzbehandlung wurden die Pflanzen in der Nährlösung mit As(III) in den Konzentrationen 0; 1,335; 5,339; 10,678; 16,017; 21,356 und 26,695 μM versorgt. Die Konzentrationen wurden aus 2 Stammlösungen hergestellt (1,335 und 5,339 μM aus 1,602 mM; $>5,339 \mu M$ aus 12,280 mM). Für die Stammlösungen wurde $NaAsO_2$ in destilliertem Wasser aufgelöst und verrührt. Sie wurden alle 4 Tagen neu angesetzt und kühl in gläsernen Erlenmeyerkolben gelagert. Der Gasraum im Kolben wurde nach jeder Verwendung mit N_2 gespült.

3.4 Analytische Verfahren

3.4.1 Transpiration und Photosynthese

Transpiration und Photosynthese wurden mit dem Li-Cor 6400 (LI-COR Biosciences, Inc.) an der breitesten Stelle des jüngsten voll entwickelten Blattes gemessen (Abb. 3.1), wobei der Messapparat täglich kalibriert wurde. Um die betroffene Blattfläche zu berechnen wurde die Blattbreite an den Enden der Küvette auf einen Millimeter genau ausgemessen und der Mittelwert der Breiten mit der Länge der Küvette (innen) multipliziert. Im Verlauf mehrerer Tage wurde immer an der gleichen Stelle gemessen und die Blattfläche stets neu vermessen. Die Messungen erfolgten hierbei immer in der gleichen Reihenfolge gegen Ende der Belichtungszeit, täglich zum gleichen Zeitpunkt.

3. Methodenentwicklung

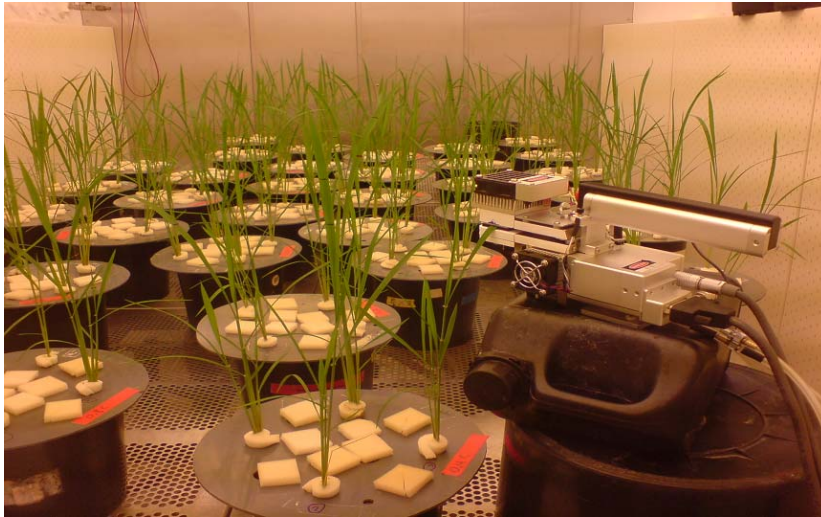


Abb.3.1: Messung der Transpirations- und Photosyntheserate an Reis.

3.4.2 Wiegen der Frischmasse

Einzelne Pflanzen wurden der Nährlösung entnommen und zum Abtropfen an einen Galgen gehängt. Nach 60 s wurde jede Pflanze an einem weiteren Galgen auf einer Analysenwaage gewogen (Abb.3.2) und wieder in die Nährlösung gesetzt. Die Messungen erfolgten immer in der gleichen Reihenfolge gegen Ende der Belichtungszeit und täglich zum gleichen Zeitpunkt.



Abb.3.2: Ermittlung der Frischmasse in vivo an jungen Pflanzen.

3.4.3 Arsen im Pflanzenmaterial

Ca. 10 mg (genaue Einwaage verrechnet) getrocknetes und zerkleinertes Pflanzenmaterial wurden mit 1,5 mL (Spross) bzw. 1 mL (Wurzel) reinsten 65%-HNO₃ über Nacht bei Raumtemperatur und 30 min. bei 60 °C aufgeschlossen. Nach 1:8-Verdünnung und Filtern durch Blaubandfilter (Machery-Nagel, MN 640d – Ø 90 mm) wurde der Arsengehalt per ICP-MS gemessen.

3.4.4 Arsen in Nährlösungen

Mindestens 20 mL Nährlösung und Stammlösung wurden in Falcongefäßen mit 400 µL 80%-H₃PO₄ unter ständiger N₂-Durchspülung des gasgefüllten Raumes aufgefangen und die Gefäße anschließend verschlossen. Die Proben wurden innerhalb eines Tages am Umweltforschungszentrum in Leipzig an einer ELAN 5000 ICP-MS (Perkin Elmer) nach Londesborough et al. (1998) auf ihre As-Form und Konzentration untersucht.

Die Gesamt-As-Konzentration wurde zusätzlich per ICP-MS gemessen. Hierzu wurden Proben 1:10 verdünnt und durch Blaubandfilter filtriert, ggf. bei 4 °C bis zur Messung gelagert.

3.4.5 pH

Der pH-Wert wurde mit einem Potentiometer (Microprocessor pH-Meter, WTW pH 196) überprüft.

3.5 Statistische Verfahren

Pflanzen für die Versuche zur Transpiration, Photosynthese und Frischmasseentwicklung über 7 Tage stammten aus einer Anzucht, wobei für jeden der Versuche andere Pflanzen verwendet wurden. Die Pflanzen zu der Messung der Frischmasseentwicklung über 11 Tage (Vorversuch) stammten aus einer anderen Anzucht.

Darstellungen wurden mit SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc.) und statistische Tests mit R 2.2.1 angefertigt.

3.5.1 Transpiration und Photosynthese

Arsenit wurde jeweils 4 Pflanzen in einem Topf angeboten (1 Topf = 1 Wiederholung) und je Behandlungsstufe 3 Wiederholungen voll randomisiert

3.5.2 Frischmasse

Für die Messungen über 11 Tage (Vorversuch) wurde Arsenit in den 7 Behandlungsstufen jeweils 10 Pflanzen in einem Topf angeboten. Die Messungen über 7 Tage erfolgten mit jeweils 4 Pflanzen je Topf und 4 randomisierten Wiederholungen.

Für die Versuche wurden gesunde Pflanzen aus der Anzucht nach Zufall ausgesucht und zu Versuchsbeginn auf die Behandlungsstufen verteilt. Für die Messungen über 7 Tage, nicht jedoch für den Vorversuch, wurden diese Pflanzen gezielt nach ihrem Gewicht auf die Behandlungsstufen verteilt, um eine geringe Variabilität innerhalb wie auch zwischen den Behandlungsstufen zu erreichen.

3.6 Überprüfung der Versuchsbedingungen

Um ein As-Angebot in Form von As(III) zu gewährleisten wurde die As-Form in Nährlösung mit Pflanzen überprüft. As(III) war in den Lösungen stabil, denn selbst nach 72 h wurde weniger als 5% des applizierten As(III) als nicht-As(III)-Form wiedergefunden (Abb. 3.3). Eine Oxidation zu As(V) ist demnach zu vernachlässigen. Fe-Applikation in chelatisierter Form (Sequestren) bis 35,8 μM Fe förderte die Oxidation nicht, so dass ein Angebot von As(III) in unbelüfteter, aber nicht sauerstofffreier Nährlösung mit Fe als Chelat über einen Zeitraum von 24 h möglich ist.

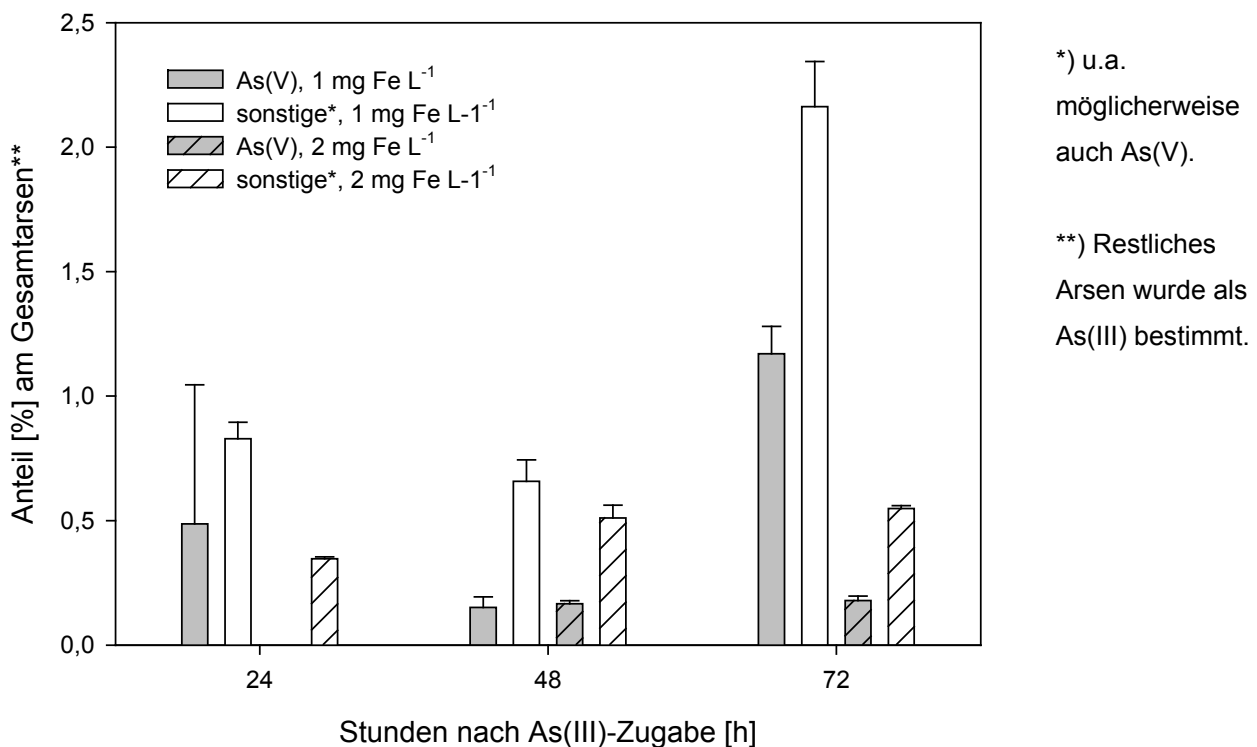


Abb.3.3: As-Spezies in der Nährlösung nach Zugabe von 0,6 mg NaAsO₂ L⁻¹ und Fe (Sequestren).

3.7 Einfluss von As(III) auf Transpirations- und Photosyntheserate

Eine Behandlung mit As(III) kann junge Reispflanzen erheblich in ihrer Transpiration und Photosynthese beeinträchtigen (Abb. 3.4). Bereits 1 Tag nach Applikation von As(III) waren Transpirations- und Photosyntheserate durch Konzentrationen $\geq 16,017 \mu\text{M}$ As(III) signifikant vermindert. Im weiteren Verlauf veränderte sich die Wirkung nicht. In einem zweiten Versuch konnte die rasche Reaktion der Pflanze bestätigt

3. Methodenentwicklung

werden (Abb.3.5). Bereits 3 h nach der As(III)-Zugabe führten Konzentrationen $\geq 10,678 \mu\text{M}$ As(III) zu einer verminderten Transpirations- und Photosyntheserate. Nach 6 h war die As(III)-Wirkung deutlich größer.

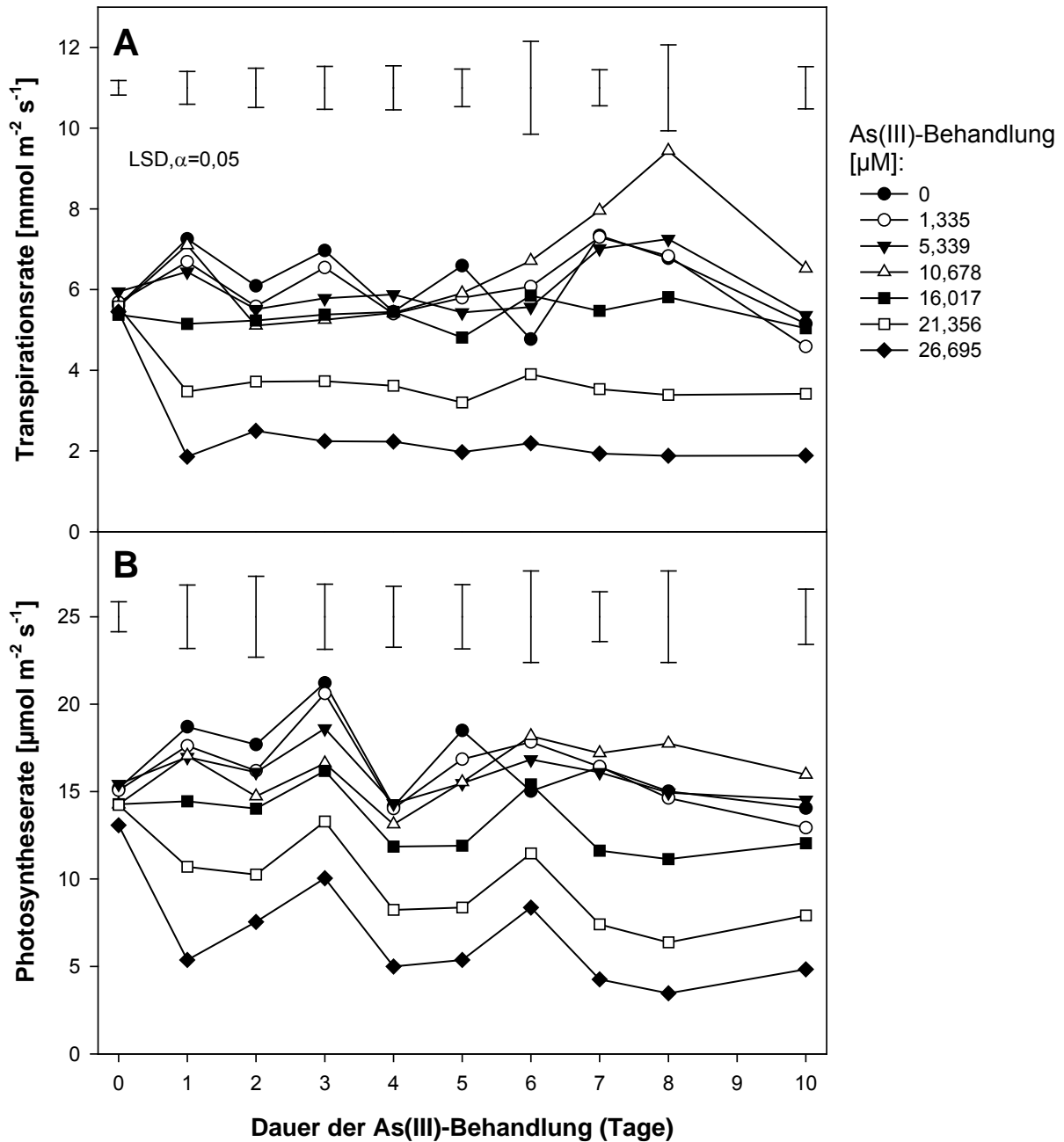


Abb.3.4: Einfluss der As(III)-Konzentration auf die Transpirationsrate (A) und Photosyntheserate (B) im Verlauf einer 10-tägigen Behandlung .

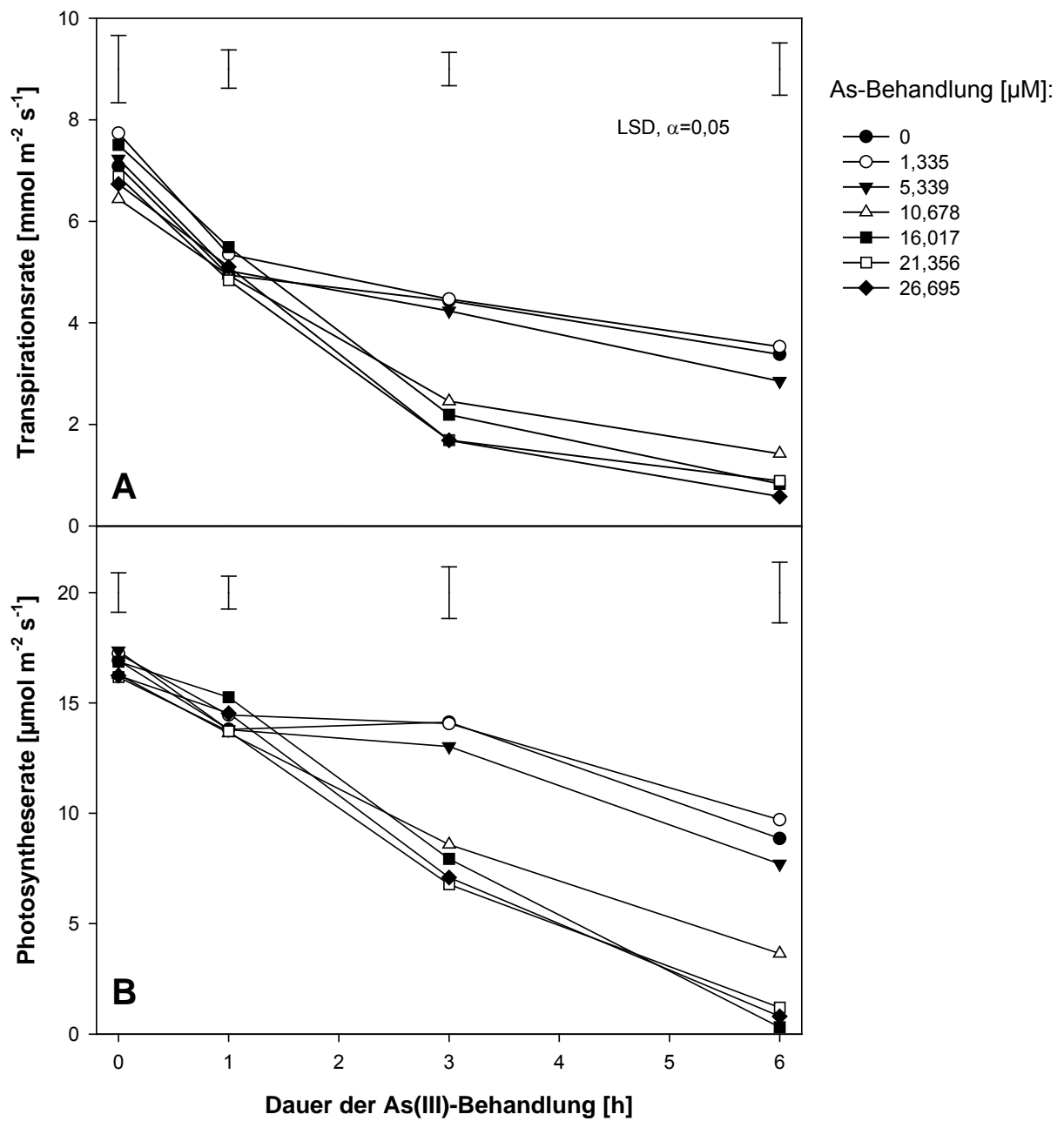


Abb.3.5: Einfluss der As(III)-Konzentration auf die Transpirationsrate (A) und Photosyntheserate (B) im Verlauf einer 1-tägigen Behandlung.

3.8 Einfluss von As(III) auf die Frischmasse

As(III) beeinflusst die Bildung der Frischmasse deutlich messbar. Während Kontrollpflanzen ihre Frischmasse von ~200 auf mehr als 600 mg Pflanze⁻¹ in dem Messzeitraum verdreifachten, verminderte 10,7 µM As(III) (Vorversuch, Abb.3.6 A) bzw. 5,3 µM As(III) (Abb.3.6 B) den Ertragszuwachs signifikant. Zudem führten die beiden höchsten Konzentrationen jeweils zu Behandlungsbeginn zu einer Abnahme der Frischmasse. Die signifikante Wirkung des Frischmassezuwachses trat bereits einen Tag nach Behandlungsbeginn ein und verstärkte sich im Versuchsverlauf. So traten Unterschiede zur Kontrolle einerseits in Abhängigkeit der As(III)-Konzentration, andererseits in Abhängigkeit der Behandlungsdauer auf. Abb. 3.6 B zeigt, dass mit $\geq 10,7$ µM As(III) behandelte Pflanzen bereits nach 1-2 Tagen, aber mit 5,3 µM As(III) behandelte Pflanzen erst nach 5 Tagen einen signifikant verminderten Frischmassezuwachs aufweisen.

Im Vorversuch über 11 Tage zeigten mit 1,3 µM As(III) behandelte Pflanzen zudem ein erhöhtes Wachstum (Abb.3.6 A). Die Pflanzen in diesem Vorversuch wiesen allerdings eine höhere natürliche Variabilität auf, denn die Varianten 1,3 und 5,3 µM As(III) hatten zu Versuchsbeginn eine im Vergleich zum Mittel aller Pflanzen (209 mg Pflanze⁻¹) höhere Frischmasse, 234 und 217 mg Pflanze⁻¹ respektiv. Durch das bei exponentielle Wachstum der Pflanzen führte hier eine geringfügig höhere Masse bei Versuchsbeginn zu größeren Unterschieden gegen Versuchsende. Dies könnte auch der Grund sein, weshalb hier bei 5,3 µM As(III) noch keine Wachstumseinbußen zu verzeichnen waren (Abb.3.6 A). Denn betrachtet man das relative Wachstum, so erreichen die Pflanzen mit 0 bzw. 1,3 µM As(III) in den 11 Tagen das 4- bzw. 4,5-fache ihres Ausgangsgewichtes, während mit 5,3 µM As(III) behandelte Pflanzen nur um das 3,6-fache wuchsen (Abb.3.7). In Anbetracht beider Versuche können demzufolge As(III)-Konzentrationen $\geq 5,3$ µM als toxisch bewertet werden.

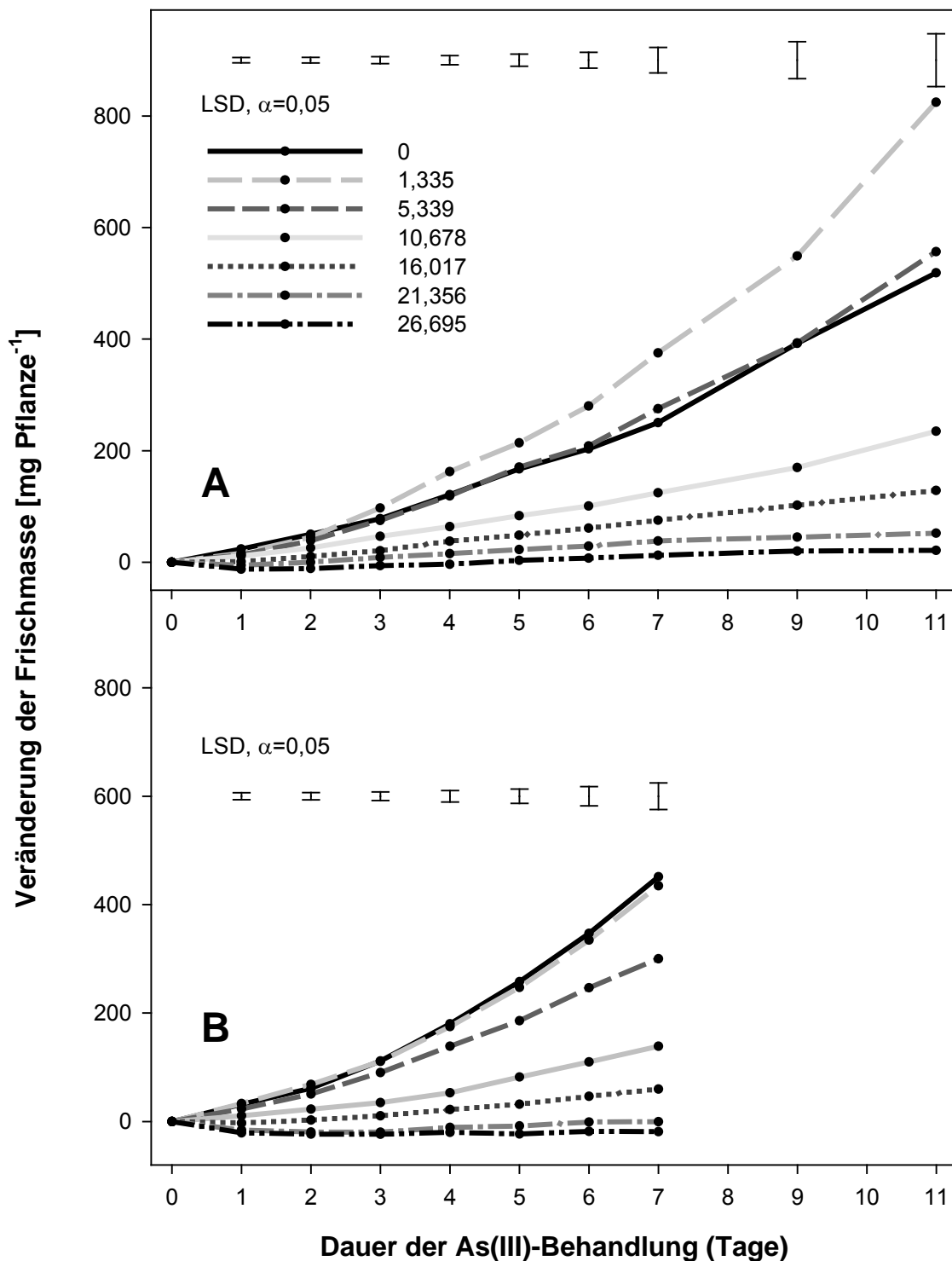


Abb. 3.6: Frischmasse im Verlauf einer 11- tägigen (A) u. 7-tägigen (B) As(III)-Behandlung. Zu Behandlungsbeginn betrug die Frischmasse im Mittel 209 \pm 42 (A) und 206 \pm 21 mg Pflanze⁻¹(B).

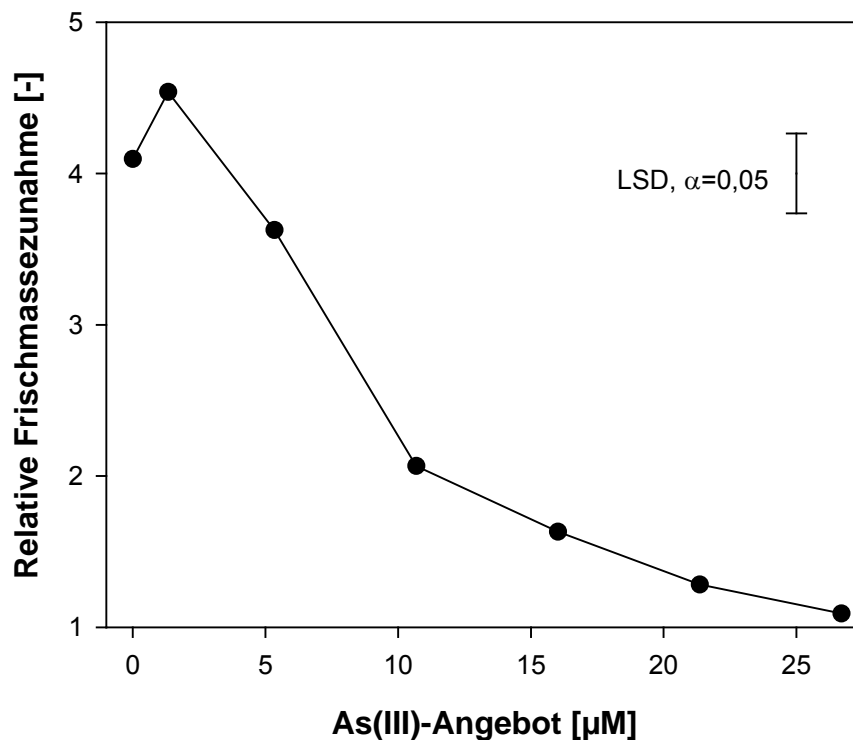


Abb.3.7: Einfluss der As(III)-Konzentration auf den Frischmassezuwachs nach 11-tägiger Behandlung.

3.9 Bewertung der Parameter zur Bestimmung der As(III)-Toxizität

Alle untersuchten Parameter zeigten eine As(III)-Wirkung innerhalb der ersten 24 h nach Applikation. Hierbei wurde diese bei unterschiedlichen Konzentrationen erfasst. Transpirations- und Photosyntheserate waren beide bei mehrtägiger Behandlung durch 16,0 μM und im Verlauf eines Tages beide durch 10,7 μM As(III) vermindert - der Frischmassezuwachs hingegen bereits bei 5,3 μM As(III). Letzterer reagierte somit sensibler und ist zur Erfassung des As(III)-Toxizitätsgrenzwertes als direkt etragsbildende Komponente der Transpirations- und Photosyntheserate vorzuziehen. Insbesondere kann hierdurch eine Toxizität aufgezeigt werden, die sich erst nach längerer As(III)-Einwirkung äußert.

Messungen von Transpirations- und Photosyntheserate hingegen eignen sich besonders, die rasche Wirkung von As(III) aufzuzeigen. So konnte diese bereits nach 3 h festgestellt werden (Abb.3.5). Allerdings sank in diesem Versuch über 6 h mit der Zeit auch die Transpirations- und Photosyntheserate der Kontrollpflanzen. Dies

3. Methodenentwicklung

könnte auf den Tagesrhythmus der Pflanzen zurückzuführen sein, obwohl die Pflanzen während der Photoperiode konstanter Temperatur und Strahlung ausgesetzt waren. Es ist dabei nicht auszuschließen, dass die Messung selbst Stress erzeugte, da die Blätter wiederholt in die Küvette eingeklemmt wurden. Messungen über mehrere Tage wiesen zudem unterschiedlich hohe Werte zwischen den einzelnen Tagen auf, so dass diese nur in Relation zu der jeweiligen Kontrolle zu betrachten sind (Abb.3.4). Zudem reagierten die Pflanzen hier bei Konzentrationen $\geq 16,0 \mu\text{M As(III)}$, im Tagesverlauf aber bei $\geq 10,7 \mu\text{M As(III)}$. Dies könnte auf Anpassungsmechanismen der Pflanze zurückzuführen sein. Durch das Wiegen der Frischmasse konnten diese Probleme umgangen werden. Da der Zuwachs der Frischmasse einen deutlichen Zusammenhang zum As(III)-Angebot zeigte und zeitlich nah ermittelt werden konnte, ist das Wiegen der Frischmasse *in vivo* eine geeignete Methode, As(III)-Toxizität an lebenden Pflanzen störungsfrei zu erfassen.

4. Einfluss von Si auf Toxizität und Aufnahme*rate in vivo* von Arsenit bei Reis

4.1 Einleitung

Reis ist ein Grund- und für die Hälfte der Weltbevölkerung ein Hauptnahrungsmittel, wobei 80% des Ertrages im Nassanbau (Paddy-Reis) erzeugt wird (IRRI 2001). Die Aufnahme von Arsen durch Paddy-Reis stellt daher ein zunehmend ernst zu nehmendes Problem dar, denn einerseits können bei dieser Anbauform für Menschen gesundheitlich bedenkliche Mengen im Korn erreicht werden (Meharg & Rahman 2003), andererseits Ertragseinbußen auftreten. Hierbei ist nicht restlos geklärt, wie und unter welchen Bedingungen die verschiedenen Arsenspezies aufgenommen werden. Beim Anbau von Nassreis kann es aber als Folge der Bewässerung mit belastetem Grundwasser zu einer verstärkten As-Aufnahme durch Reis kommen (Abedin et al. 2002b, Meharg & Rahman 2003). Standorte mit hohem As-Gehalt können dabei natürlichen (Deposition, Vulkanismus) und menschlichen Ursprungs sein (Bewässerung, Pestizide, Bergbau, Textilindustrie). Unter den reduzierenden Bedingungen im Nassanbau liegt vor allem Arsenit (As(III)) in der Bodenlösung vor, während unter oxidierenden Bedingungen As(V) dominiert (Abedin et al. 2002, Marin et al. 1993). Hierbei gilt As(III) als die mobilere, phytotoxischere anorganische As-Form (Abedin & Meharg 2002). Die As(III)-Aufnahme von Reis ist dabei kaum erforscht. So gibt es nur wenige Veröffentlichungen, die eine Aufnahme von As(III) durch Reis direkt behandeln (Abedin et al. 2002c, Meharg & Jardine 2003, Chen et al. 2005). Diese basieren auf Kurzzeitversuchen (<30 min.), in denen mithilfe abgeschnittener Wurzeln Aufnahmekinetiken erstellt wurden. Hierbei schien die As(III)-Aufnahme bei niedrigen Konzentrationen (0 - 0,0532 mM As) einer Michaelis-Menten-Funktion zu folgen, wobei sich verschiedene Sorten in der maximalen Aufnahme*rate* (I_{max}), nicht aber in der Affinität des Aufnahmesystems (K_m) unterschieden (Abedin et al. 2002c). Bei höheren Konzentrationen (>0,0532 mM As) hingegen war die Aufnahme stets linear abhängig von der angebotenen Konzentration (Abedin et al. 2002c). Die Autoren schlugen vor, dass Reis As(III) aktiv durch Aquaglyceroporine aufnimmt, welche in hoher Konzentration in der Reisswurzel exprimiert werden (Li et al. 2000). Aquaglyceroporine sind nodulin 26-like intrinsic membrane proteins (NIPs) und

4. Einfluss von Si auf Toxizität und Aufnahme rate in vivo von Arsenit bei Reis

gehören zu den Aquaporinen, welche wiederum zur Familie der Major Intrinsic Proteins (MIPs) der transmembranen Kanäle gehören (Maurel 1997, Tyerman et al. 1999). Tatsächlich konnten Ma et al. (2008) sowie Bienert et al. (2008) bestätigen, dass die NIPs Lsi1 (OsNIP2;1) und Lsi6 (OsNIP2;2) sowie weitere NIPs As(III) transportieren. Eine Aufnahme mittels NIPs steht hierbei im Einklang mit deren Eigenschaften und jenen des As(III). Ihre Selektivität beruht auf Durchmesser, sterischer Anordnung, Ladung, der Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen sowie möglicherweise der Affinität zu –SH-Gruppen des Substrates. Das bei leicht reduzierenden Bedingungen bei neutralem bis saurem pH als H_3AsO_3 vorliegende As(III) ist symmetrisch (in Form einer Pyramide) mit einem O-O-Abstand von ca. 30 nm. Damit könnten Aquaglyceroporine wie GlpF mit einem größeren Kanaldurchmesser (≤ 35 nm) als reine Aquaporine wie AqpZ (≤ 24 nm) H_3AsO_3 transportieren (Wang et al. 2005). Untersuchungen an E.Coli zeigten zudem, dass der Glycerolkanal GlpF As(III) transportiert (Jensen et al. 2002). Zudem transportieren Aqua(glycero)porine mit nur wenigen Ausnahmen lediglich ungeladene Moleküle, so wie H_3AsO_3 . Weiter müssen passierende Moleküle die Fähigkeit besitzen, Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen. Die drei OH-Gruppen von H_3AsO_3 könnten hierbei die Wasserstoffbrücken eingehen und H-Atome spenden oder empfangen. Je Aminosäurezusammensetzung und Kanalinnendurchmesser gibt es Aquaglyceroporine, die nur für Wasser (Maurel et al. 1993), für Wasser und ungeladene Teilchen wie Harnstoff (AQP3, Echevarria et al. 1994, Ishibashi et al. 1997) oder sogar für Ionen durchlässig sind (AQP6, Agre et al. 2002). In Pflanzen transportieren Aquaporine u.a. Ammoniak und Ammonium (Jahn et al. 2004), Bor (Dordas et al. 2000) und Wasserstoffperoxid (Henzler & Steudle 2000). Diese Stoffe und Wasser können passiv, entlang des osmotischen oder hydraulischen Gradienten im Kanal in beide Richtungen fließen (Maurel 1997, Jensen et al. 2002). Simulationen deuteten dabei eine lineare Abhängigkeit des Wassereinstroms vom hydrostatischen Druck an (Zhu et al. 2002, 2004). Kompatible Stoffe folgen also, vorausgesetzt der Kanal ist geöffnet, dem Transpirationsstrom. Letzterer bestimmt dann zusammen mit der Substratkonzentration die Aufnahme rate. Betrachtet man eine bestimmte Fläche der Membran, so bestimmt dort zudem die vertretene Anzahl Aquaglyceroporine die maximale Aufnahme rate.

Ein weiterer Siliziumtransporter Lsi2 (Yamaji et al. 2008), welcher vermutlich ähnlich ArsB in E.Coli (Meng 2004) als $As(OH)_3-H^+$ -Antiport funktioniert, konnte zudem als

4. Einfluss von Si auf Toxizität und Aufnahme rate in vivo von Arsenit bei Reis

As(III)-Transporter identifiziert werden (Ma et al. 2008). Lsi2 hat hierbei einen größeren Einfluss auf die Si-Verlagerung in den Spross als Lsi1 (s.o.), da Mutationen an Lsi2 die Verlagerung stärker beeinflussten (Ma et al. 2008).

Die Eigenschaften der Si-Transporter würden eine Aufnahme und Verlagerung von As(III) bestimmen. Dabei ist Reis ein Si-Akkumulator mit bis zu 10% Si in der Spross-TM. Silizium kommt in der Bodenlösung in Konzentrationen von 0,1-0,6 mM vor (Epstein 1994) und der K_m -Wert für die Aufnahme von Si aus der Lösung in die Cortex-Zellen (Lsi1) liegt bei 0,15 mM (Ma et al. 2004) und für die Gesamtaufnahme bei 0,32 mM (Tamai & Ma 2003) bzw. 0.35 ± 0.05 mM (Nikolic et al. 2007). Letztere bestimmten für die Gesamtaufnahme V_{max} mit 0.31 ± 0.03 mmol Si g^{-1} Wurzel-TM h^{-1} während Tamai & Ma (2003) $6,2$ mg Si $g^{-1} h^{-1}$ entsprechend $0,22$ mmol Si $g^{-1} h^{-1}$ angeben, wobei V_{max} bei ca. 1,5-1,6 mM externer Si-Konzentration erreicht wird (Mitani & Ma 2005, Nikolic et al. 2007, Tamai & Ma 2003). Si ist hierbei für seine positiven Einfluss auf das Wachstum von Reis sowie die As-Aufnahme bekannt. Guo et al. (2005) stellten z.B. eine höhere Spross-Trockenmasse und reduzierte As-Aufnahme sowie –Verlagerung nach Applikation von Kieselsäure und Arsenat [As(V)] in Nährlösung fest. Hingegen kann die As(III)-Aufnahme über Lsi1 und Translokation mittels Lsi2 durch ein konstantes Silizium-Angebot verringert sein (Ma et al. 2008), da dieses zu einer reduzierten Expression von Lsi1 und Lsi2 (Ma et al. 2006, Ma et al. 2007) führt. Zudem kann Silizium die Transpiration von Reis mindern (Agarie et al. 1998).

Im Gegensatz zu Si ist As(III) toxisch und reagiert mit Thiolgruppen von Proteinen und verursacht dadurch Funktionsstörungen von Enzymen und Gewebeproteinen (Delnomdedieu et al. 1993, Ullrich-Eberius et al. 1989). So können u.a. Nitrat- und Nitritreduktase als auch Glutaminsynthetase beeinträchtigt sein (Jha & Dubey 2004). Dementsprechend kann As(III) die Aufnahme durch Binden an den Transporter direkt oder über einen Eingriff in den Zellstoffwechsel (Toxizität) indirekt beeinflussen. Eine Aufnahme rate von As(III) muss demzufolge unter nicht toxischen Konzentrationen bestimmt werden. Allerdings variieren Angaben der Literatur für einsetzende As(III)-Toxizität bei Reis von 6,7 (Abedin & Meharg 2002; Shaibur et al. 2006) bis 25 μ M (Jha & Dubey 2004). Die Ursache für die Variation in diesen Versuchen kann darin liegen, dass die As-Form nicht immer gewährleistet bzw. eine Oxidation von As(III) nicht ausgeschlossen werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurde daher unter Kontrolle der As-Form zunächst die Konzentration bestimmt, ab der As(III) toxisch

wirkt, um dann die Aufnahme in vivo unter nicht-toxischen Bedingungen zu ermitteln. As(III)-Toxizitätsgrenzwert und –Aufnahme wurden in Abhängigkeit von der Silizium-Ernährung an mehrtägig behandelten intakten Pflanzen untersucht.

4.2 Material und Methoden

In drei Versuchen wurde die toxische Wirkung von As(III) auf das Wachstum von Pflanzen und die As(III)-Aufnahme in vivo, sowie jeweils ein möglicher Einfluss von Silizium untersucht. Um eine Aufnahme des As(III) zu untersuchen, musste zunächst bestimmt werden, ab welcher Konzentration dieses toxisch wirkt. Diese wurde durch Wiegen der Frischmasse junger Pflanzen ermittelt. Die Wirkung von Si auf die Aufnahme und Toxizität von As(III) bei älteren Pflanzen wurde in einem zweiten Versuch, ebenfalls durch Wiegen der Frischmasse, untersucht. Für einen weiteren Versuch wurde ein Durchflusssystem konzipiert, in welchem dann die As(III)-Aufnahme unter nicht-toxischem As(III)-Angebot untersucht werden konnte.

4.2.1 Pflanzenmaterial und Kulturbedingungen

Samen der Reissorte 'Selenio' wurden 4-6 Tage bei Raumtemperatur in Leitungswasser zum Keimen gebracht. Die Keimlinge wurden in Filterpapier gerollt und für 6 Tage in Leitungswasser gestellt. Hiernach wurden die Sämlinge in 5L Kunststoff-Töpfen in unbelüfteter Nährlösung ohne bzw. mit Si in Form von 0,89 mM K_2SiO_3 kultiviert, die jeden zweiten Tag gewechselt wurde und folgende Zusammensetzung hatte (in mM): 1 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$; 0,097 KH_2PO_4 ; 0,723 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,1 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,428 NH_4NO_3 ; und in μM : 0,079 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 17,9 Fe (als Chelat, Sequestren); 2 H_3BO_3 ; 1,82 $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,071 $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$; 0,765 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Ein K-Ausgleich der Kontrolle fand mit 0,89 mM K_2SO_4 statt. Der pH wurde mit HCl bzw. KOH auf pH 6 eingestellt. Die Pflanzenkultur erfolgte in Klimakammern bei 25 / 20 °C Tag- / Nachtlufttemperatur (je 12 Stunden), 70 % rF und 200 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ PAR.

4.2.2 Bestimmung der As(III)-Toxizität im Frischmassewiegeversuch

21 Tage nach Keimung wurde jeweils 4 Pflanzen in einem 5-L-Kunststoffgefäß As(III) in den Konzentrationen 0; 1,335; 5,339; 10,678; 16,017; 21,356 und 26,695 μM in Form von $NaAsO_2$ mit täglichem Wechsel der Nährlösung appliziert, um sicherzustellen, dass keine anderen As-Formen in nennenswertem Umfang

auftraten. Kontrollmessungen zeigten, dass nach einem Tag nur 1-2 % andere As-Formen vorlagen. Zur zerstörungsfreien Frischmassebestimmung wurden die Pflanzen einzeln der Nährlösung entnommen und 60 s zum Abtropfen an einen Galgen gehängt, anschließend an einem weiteren Galgen auf einer Analysenwaage gewogen und wieder in die Nährlösung gesetzt. Reihenfolge der Pflanzen und Zeitpunkt der täglichen Messung gegen Ende der Belichtungszeit waren immer gleich.

Der Versuch wurde mit 6 Wochen alten Pflanzen wiederholt, wobei jeweils 7 Pflanzen in einem 5-L-Kunststoffgefäß As(III) in den Konzentrationen 0; 1,335; 2,670; 5,339 und 16,017 μM angeboten wurde. Zur Bestimmung der Frischmasse wurden alle Pflanzen eines Gefäßes zusammen gewogen.

4.2.3 Bestimmung der Aufnahme­rate

Hierfür wurde ein Durchflusssystem verwendet (Abb. 1), das

- 1) die eingestellte Arsenitkonzentration an der Wurzeloberfläche gewährleistete und das Auftreten anderer As-Formen verhinderte.
- 2) den von der Wurzel abgegebenen Sauerstoff abführte, so dass
- 3) eine sauerstoffarme Nährlösung mit ca. 1 mg $\text{O}_2 \text{L}^{-1}$ angeboten werden konnte. Eine Kontrolle der Nährlösung vor und nach der Applikation bestätigte, dass während der Behandlung keine messbaren Änderungen auftraten.

Die Wurzel wurde in einem leicht geneigt aufrecht stehenden Plexiglasrohr (Innenvolumen = 50 cm^3) ständig mit sauerstoffarmer Lösung umspült. Diese staute sich am unteren Rohrende an, um dann über einen Überlauf das Rohr zu verlassen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Wurzel nicht in die sich anstauende Lösung ragte. Der Durchfluss wurde auf 4L d^{-1} eingestellt. Die Rohre wurden konstant mit N_2 gespült, welcher über den Schaumstoffstopfen entwich.

In dieses System wurden Pflanzen 14 Tage nach Keimung gesetzt, die zuvor mit destilliertem Wasser abgespült und auf Höhe des Samens mit Schaumstoff umrollt wurden. Die Pflanzen wurden 4 Tage mit As(III) in den Konzentrationen 0; 0,334; 0,667; 1,335 und 2,669 μM behandelt. Das Arsenit wurde in einer Nährlösung mit [mM]: 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 2 μM H_3BO_3 appliziert. Die Kieselsäure-Varianten enthielten zusätzlich 0,89 mM K_2SiO_3 und der K-Ausgleich in den Kontrollvarianten erfolgte mit 0,89 mM K_2SO_4 . Der pH wurde mit HCl bzw. KOH auf pH 6 eingestellt.

4. Einfluss von Si auf Toxizität und Aufnahme rate in vivo von Arsenit bei Reis

Die Arsenitfreie Nährlösung wurde durch Kochen sauerstoffarm gemacht, noch heiß in Kunststoff-Kanister gefüllt und mit einem Stopfen verschlossen. Die abgekühlte Lösung wies bis zu 2 Tage nach dem Einfüllen einen Sauerstoffgehalt um 0 ppm auf. Über einen Dreiwegehahn konnte dem Kanister nun konzentrierte As(III)-Lösung zugeführt o. gebrauchsfertige Lösung entnommen werden, ohne dass größere Mengen Sauerstoff in das System gelangten. Die Lösung im Kanister wurde auf einem Magnetrührer homogenisiert sowie täglich gewechselt.

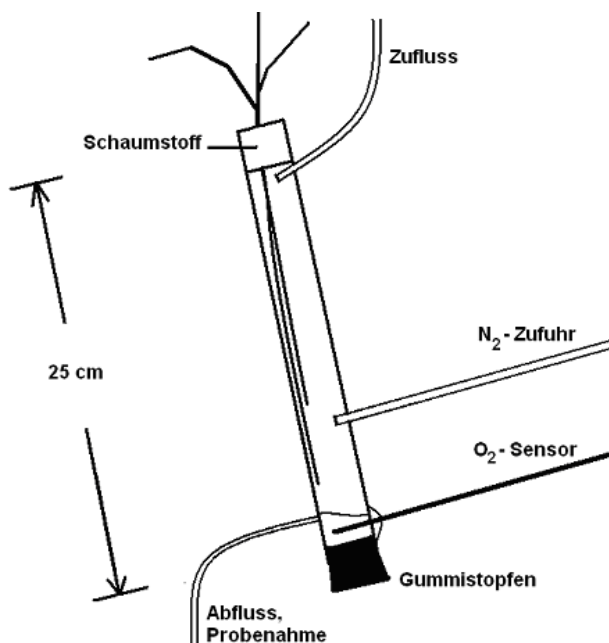


Abb.4.1: Versuchsaufbau zur Bestimmung der Aufnahme rate von As(III) durch Reis.

4.2.4 Ernte und analytische Verfahren

Die Wurzeln wurden mehrfach mit destilliertem Wasser gespült, anschließend in destilliertem Wasser gescannt (Expression 1600, EPSON) und per Bildanalyseverfahren (WhinRhizo, Régent Instruments Inc.) vermessen. Das Pflanzenmaterial wurde bei 60°C im Umluftofen getrocknet, grob zerkleinert und analysiert. Für die As-Messung wurde 10 mg Pflanzensubstanz in 1 mL (Wurzel) bzw. 1,5 mL (Spross) 65%er reiner HNO₃ 24 h bei Raumtemperatur und 30 min. bei 60 °C aufgeschlossen und die As-Konzentration per ICP-MS gemessen. Si in der Pflanzensubstanz wurde nach Novozamsky et al. (1984) mittels einer HF/HCl-Mischung aufgeschlossen und nach Färbung bei 811 nm am Photometer gemessen. Die As-Spezies wurden am Umweltforschungszentrum in Leipzig an einer ELAN 5000 ICP-MS (Perkin Elmer) nach Londesborough et al. (1998) bestimmt. Weiter

4. Einfluss von Si auf Toxizität und Aufnahme rate in vivo von Arsenit bei Reis

wurde der pH-Wert der Lösungen mit einem Potentiometer (Microprocessor pH-Meter, WTW pH 196) überprüft. Für die As(III)-Aufnahme wurde zusätzlich der O₂-Gehalt der Nährlösung in der sich im Rohr anstauenden Lösung über einen POF-Sensor (Polymer Optical Fiber) mit Fibox3 (Fiber-Optic Oxygen Meter) nach Huber und Krause (2004) mit dem Programm Oxyview PST3-V5.32 gemessen.

4.2.5 Ermittlung der As(III)-Aufnahmerate

Die Berechnung der Aufnahme rate erfolgte nach Williams (1946):

$$I_n = \frac{(U_2 - U_1)}{SA t}$$

mit I_n = As-Aufnahmerate [$\mu\text{mol cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$], $U_{1,2}$ = As-Gehalt [$\mu\text{mol Pflanze}^{-1}$] zu Versuchsbeginn (1) und -ende (2), SA = Wurzeloberfläche zu Versuchsende [$\text{cm}^2 \text{ Pflanze}^{-1}$], t = Zeit [h]. Die Wurzellänge nahm im Versuchszeitraum nicht messbar zu, so dass diese vereinfachte Gleichung verwendet werden konnte.

4.2.6 Statistische Verfahren

Versuche zur Frischmasse erfolgten mit jeweils 4 Wiederholungen. Die Bestimmung der Aufnahme rate erfolgte mit 6 Wiederholungen. Darstellungen und Regressionen wurden mit SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc.) angefertigt, statistische Analysen mit R 2.2.1.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 As(III)-Toxizität

4.3.1.a Wirkung von As(III) auf die Frischmasse

As(III) beeinflusst die Bildung der Frischmasse deutlich messbar. Während Kontrollpflanzen ihre Frischmasse von 230 auf mehr als 800 mg Pflanze⁻¹ in dem Messzeitraum nahezu vervierfachen, verminderte bereits 5,3 μM As(III), wie in Abb. 4.2 u. 4.3 dargestellt, den Ertragszuwachs signifikant. Die Verminderung des Frischmassezuwachses nahm mit steigender As(III)-Konzentration und Dauer der Behandlung zu. So traten signifikante Unterschiede zur Kontrolle durch 26,7 μM As(III) bereits nach einem Tag, 16,0 μM nach 2, 10,7 μM nach 3 und 5,3 μM As(III)

4. Einfluss von Si auf Toxizität und Aufnahme rate in vivo von Arsenit bei Reis

erst nach 4 (-Si) bzw. 7 (+Si) Tagen auf. Zudem führten die beiden höchsten Konzentrationen jeweils zu Behandelungsbeginn zu einer Abnahme der Frischmasse. Eine Applikation von Kieselsäure beeinflusste die As(III)-Wirkung nicht, wie es Abb. 4.3 verdeutlicht. Eine Reduktion des Frischmassezuwachses um 10% (EC_{10}) trat unabhängig von der Si-Ernährung zwischen 2,3 und 2,8 μM As(III) auf.

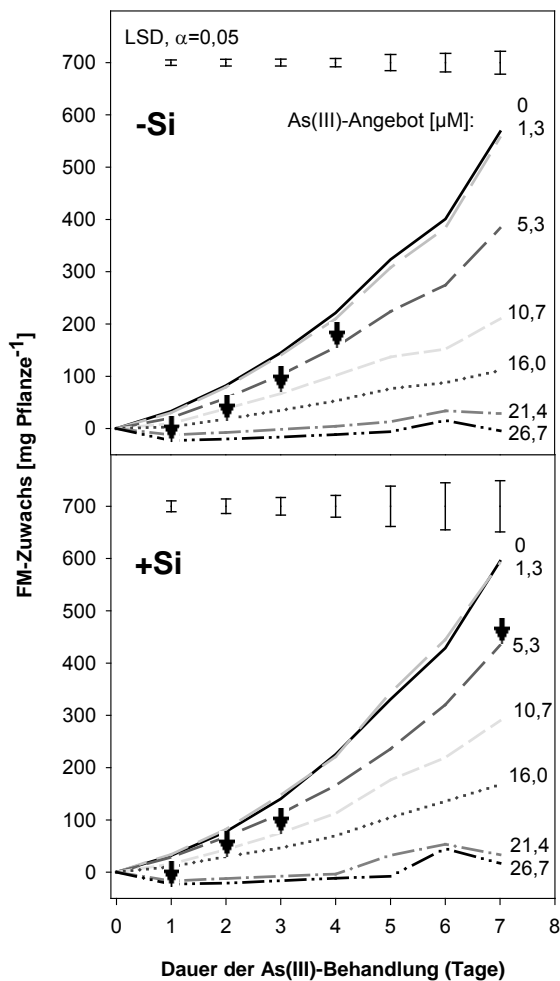


Abb.4.2: Einfluss von As und Kieselsäure auf die Entwicklung der Frischmasse junger Reispflanzen. Zu Behandlungsbeginn betrug die Frischmasse im Mittel $230 \pm 13 \text{ mg FM Pflanze}^{-1}$. Pfeile markieren den Zeitpunkt einer signifikanten Verminderung des Frischmassezuwachses.

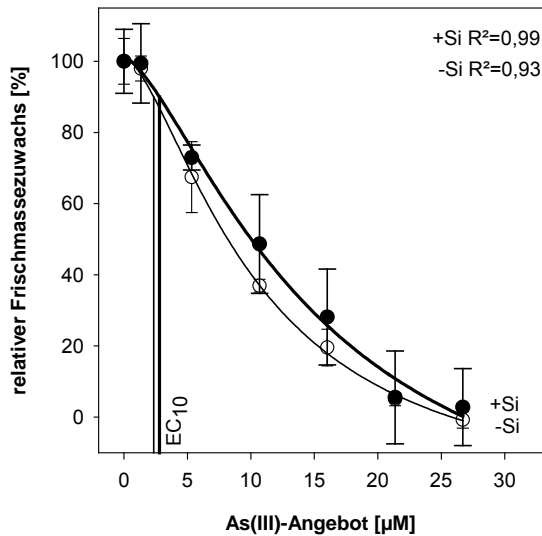


Abb.4.3: Einfluss einer 7-tägigen Behandlung mit As(III) bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot auf den Frischmassezuwachs von Reissämlingen. Regression mit logistischer Funktion $[y = \min + (\max - \min) / (1 + \text{abs}(x/a)^b)]$ und folgenden Parameterterm: -Si, $\min = -24,279$; $\max = 101,137$; $a = 10,380$; $b = 1,566$ und +Si, $\min = -43,697$; $\max = 101,172$; $a = 15,143$; $b = 1,469$.

4.3.1.b Aufnahme und Verlagerung von As und Si

Der As-Gehalt in der Wurzel folgte der As(III)-Konzentration in Form einer Optimumskurve (Abb. 4.4). Der höchste Gehalt in der Wurzel wurde hierbei unabhängig vom Si-Angebot bei 10,7 µM As(III) beobachtet. Die Applikation von Kieselsäure verminderte im Trend in allen As(III)-Stufen den As-Gehalt der Wurzel. Im Spross folgte der As-Gehalt dem As(III)-Angebot in ähnlicher Weise wie in der Wurzel. Allerdings trat ohne Si-Applikation der höchste As-Gehalt bereits bei 5,3 µM As(III) ein. Anders als in der Wurzel reduzierte das Si-Angebot den As-Gehalt hier signifikant. Die As-Konzentrationen in der Wurzel waren 20 bis 100 mal höher als im Spross.

Insgesamt nahmen die Pflanzen bis zu 15,2 bzw. 12,4 µg As Pflanze⁻¹ auf, wobei die aufgenommene Menge As Pflanze⁻¹ wiederum einer Optimumskurve mit einem Maximum bei 10,7 µM As (III)-Applikation folgte (Abb.4.5). Der in den Spross verlagerte Anteil [%] As nahm hierbei mit steigender As(III)-Konzentration ab. Eine Behandlung mit Kieselsäure reduzierte die Translokation zusätzlich. Mit zunehmender As(III)-Konzentration glichen sich die Anteile des translozierten As zunehmend.

4. Einfluss von Si auf Toxizität und Aufnahme rate in vivo von Arsenit bei Reis

Die Si-Konzentration in der Spross-TM wurde durch die Si-Applikation deutlich erhöht (Abb. 4.6). As(III)-Konzentrationen $>5,3 \mu\text{M}$ verminderten die Si-Konzentration in der Spross-TM in beiden Si-Stufen zunächst, während die höchste As(III)-Konzentration zu einem erneuten Anstieg führte.

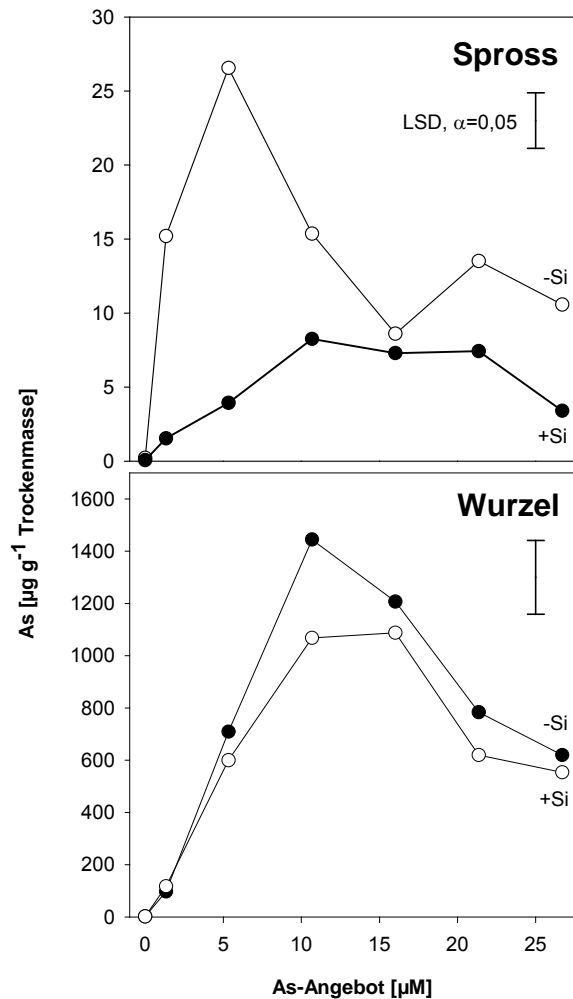


Abb.4.4: As-Konzentration in Spross- und Wurzel-TM in Abhängigkeit von der Arsenit-Konzentration in der Nährlösung nach 7-tägiger Behandlung bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot.

4. Einfluss von Si auf Toxizität und Aufnahme rate in vivo von Arsenit bei Reis

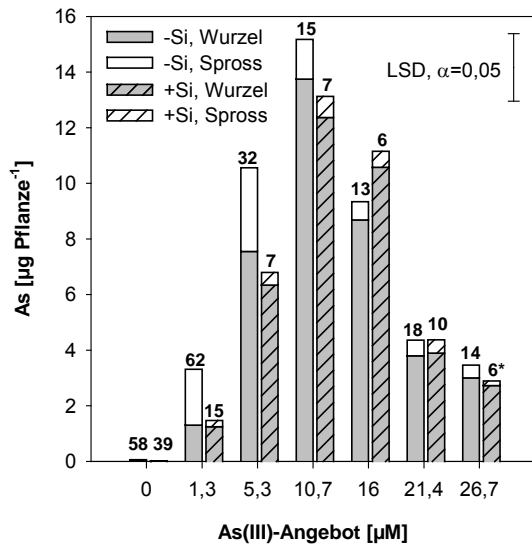


Abb.4.5: Einfluss einer 7-tägigen Behandlung mit As(III) bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot auf As-Gehalt und -Translokation von Reissämlingen.

*) Anteil [%] des As im Spross am Gesamtarsen in der Pflanze.

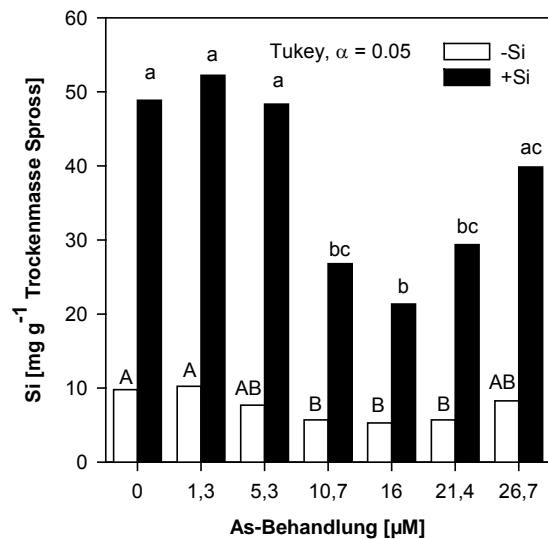


Abb.4.6: Einfluss einer 7-tägigen Behandlung mit As(III) bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot auf die Si-Konzentration im Spross von Reissämlingen.

4.3.1.c Wirkung von As(III) auf Wachstum, Aufnahme und Verlagerung von As und Si von 6 Wochen alten Reispflanzen

Im Versuchszeitraum nahm die Frischmasse der Kontrollpflanzen um ca. 40 % zu (Abb. 4.7) und Behandlungen $\leq 5,3 \mu\text{M As(III)}$ verminderten den Zuwachs nicht. Hingegen führte eine Applikation von $16 \mu\text{M As(III)}$ zu einem signifikant geringeren FM-Zuwachs. Eine Applikation von Kieselsäure beeinflusste die As(III)-Wirkung nicht. Der As-Gehalt in der Wurzel folgte der As(III)-Konzentration in linearer Form (Abb.4.8)

und eine Applikation von Kieselsäure verminderte diesen nicht. Im Spross folgte der As-Gehalt dem As(III)-Angebot bis zu $5,3 \mu\text{M As(III)}$ -Angebot ebenfalls linear. Eine Applikation von $16 \mu\text{M As(III)}$ führte allerdings zu keinem weiteren Anstieg. Hingegen stieg As-Konzentration in der Spross-Trockenmasse bei Applikation von Kieselsäure konstant an. Letztere reduzierte hier, anders als in der Wurzel, den As-Gehalt signifikant. Die As-Konzentrationen in der Wurzel waren 10 bis 100 mal höher als im Spross.

Die insgesamt aufgenommene Menge As in $\mu\text{g As Pflanze}^{-1}$ stieg mit zunehmender As(III)-Konzentration in der Nährlösung an (Abb.4.9). Die Translokation von As in den Spross nahm hierbei mit steigender As(III)-Konzentration ab. Eine Behandlung mit Kieselsäure reduzierte die Translokation zusätzlich.

Die Si-Konzentration in Spross- und Wurzel-TM wurde durch die Si-Applikation deutlich erhöht (Abb. 4.10). Eine Behandlung mit $16 \mu\text{M As(III)}$ verminderte die Si-Konzentration in der Spross-TM der in Kieselsäure kultivierten Pflanzen signifikant. In der Wurzel-TM verminderten As(III)-Konzentrationen $\geq 1,3 \mu\text{M}$ die Si-Konzentration zunächst, während die höchste As(III)-Konzentration zu einem erneuten Anstieg führte. Ohne Kieselsäure kultivierte Pflanzen akkumulierten Si in Spross- und Wurzel-TM unabhängig von der As(III)-Konzentration der Nährlösung.

4. Einfluss von Si auf Toxizität und Aufnahme rate in vivo von Arsenit bei Reis

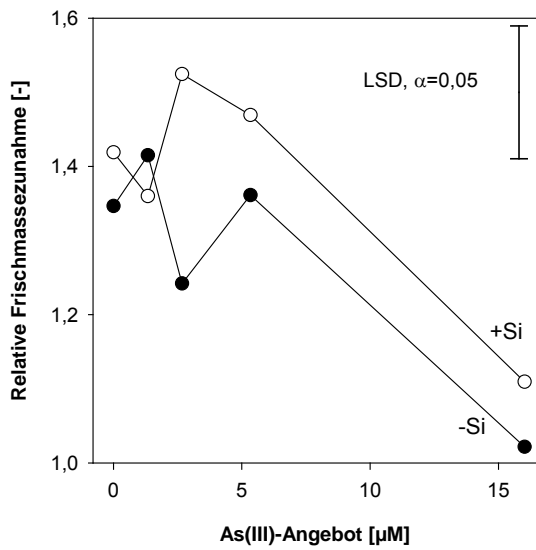


Abb.4.7: Einfluss einer 7-tägigen Behandlung mit As(III) bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot auf den Frischmassezuwachs von 6 Wochen alten Reispflanzen.

Zu Behandlungsbeginn betrug die Frischmasse im Mittel $9,7 \pm 1,3$ g FM Pflanze⁻¹.

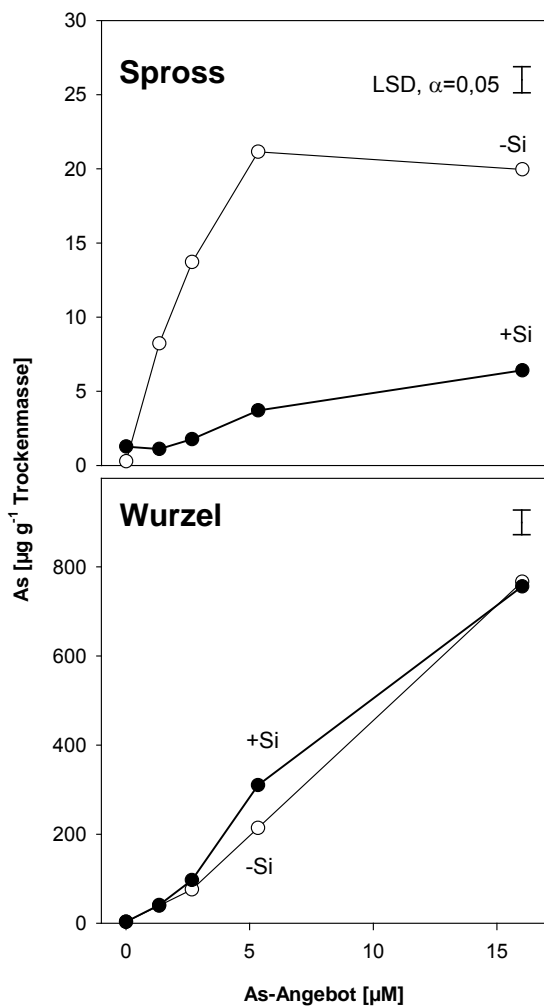


Abb.4.8: As-Konzentration in Spross- und Wurzel-TM in Abhängigkeit von der Arsenit-Konzentration in der Nährlösung nach 7-tägiger Behandlung bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot.

4. Einfluss von Si auf Toxizität und Aufnahme rate in vivo von Arsenit bei Reis

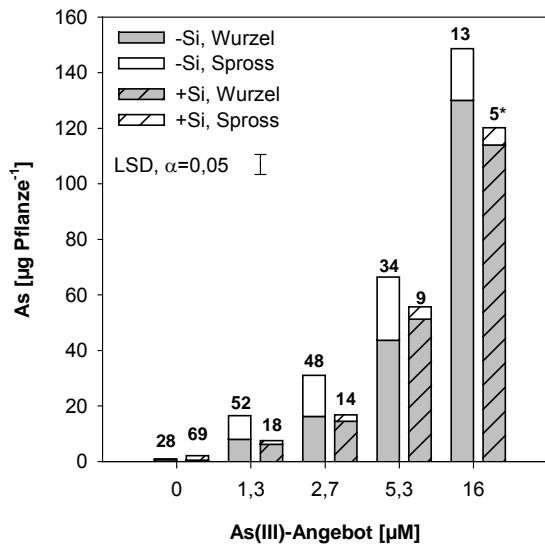


Abb.4.9: Einfluss einer 7-tägigen Behandlung mit As(III) bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot auf As-Gehalt und -Translokation von 6 Wochen alten Reispflanzen. *) Anteil [%] des As im Spross am Gesamtarsen in der Pflanze.

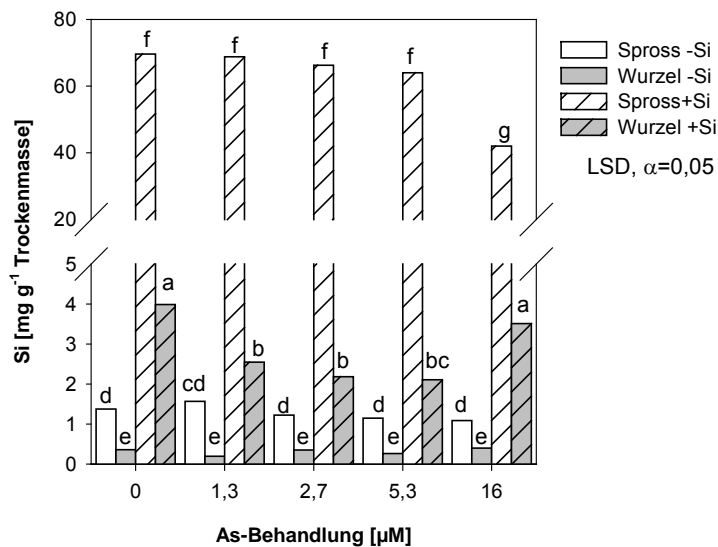


Abb.4.10: Einfluss einer 7-tägigen Behandlung mit As(III) bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot auf die Si-Konzentration in Spross und Wurzel von 6 Wochen alten Reispflanzen.

4.3.2 As(III)-Aufnahmerate

Zur Ermittlung der As(III)-Aufnahmerate wurde die As(III)-Konzentration bis zum EC₁₀-Toxizitätsgrenzwert von 2,6 μM gesteigert. Der As-Gehalt in der Trockensubstanz stieg hierbei linear mit dem As(III)-Angebot an (Abb. 4.11) und eine Applikation von Si verminderte die Gehalte in Spross und Wurzel deutlich. In der Wurzel war die As-Konzentration ca. 20-mal höher als im Spross. Hierbei war die As-Konzentration in der Wurzel-Frischmasse aller Behandlungsstufen ohne Kieselsäureapplikation um das 120-160fache, mit Kieselsäureapplikation lediglich um das 10-20fache gegenüber der Außenkonzentration erhöht (Abb. 4.12).

Die Aufnahmerate stieg linear mit dem As(III)-Angebot und unabhängig vom Kieselsäureangebot an. Allerdings war sie durch Kieselsäureapplikation um 90% vermindert (Abb. 4.13). Auch bezogen auf Wurzellänge oder Frischmasse folgte die Aufnahmerate einer linearen Beziehung, da die Morphologie der Wurzeln durch die Behandlungen nicht beeinflusst wurde.

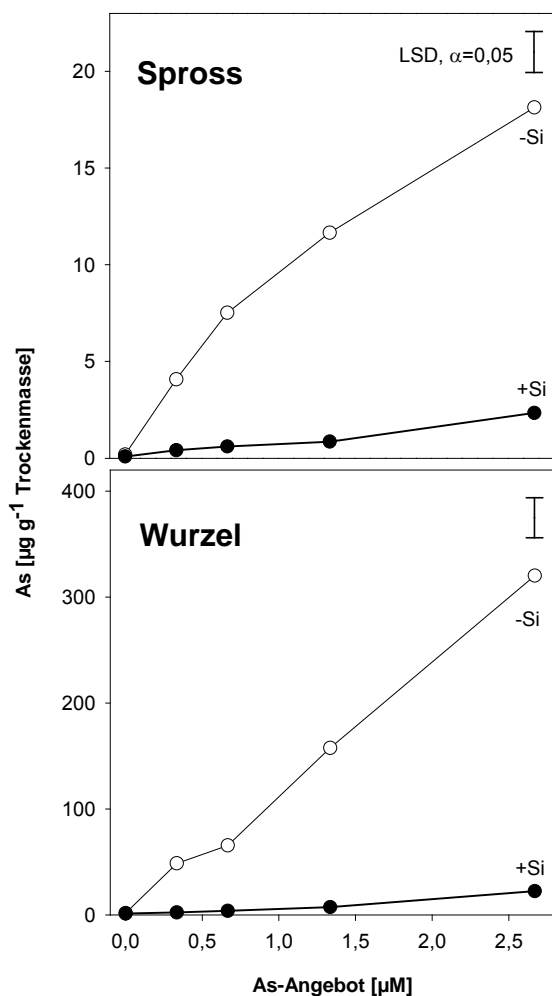


Abb.4.11: Einfluss von As(III)- und Kieselsäureangebot auf die Arsenkonzentration in Spross- und Wurzel-TM nach 4-tägiger Behandlung.

4. Einfluss von Si auf Toxizität und Aufnahme rate in vivo von Arsenit bei Reis

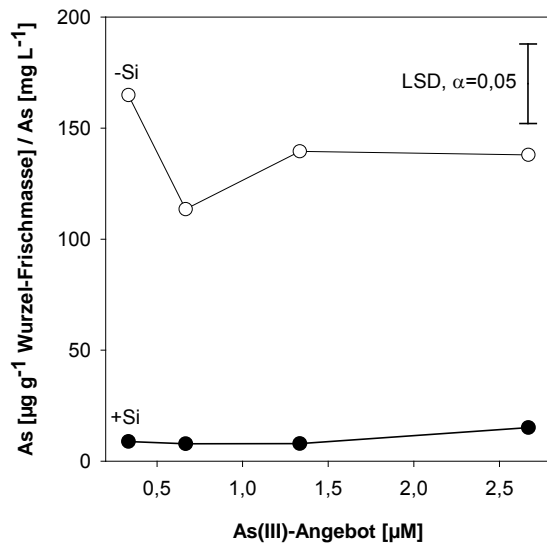


Abb.4.12: Anreicherung von As in der Wurzel-Frischmasse gegenüber der Außenkonzentration in Abhängigkeit der As(III)-Konzentration in der Nährlösung nach 4-tägiger Behandlung bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot.

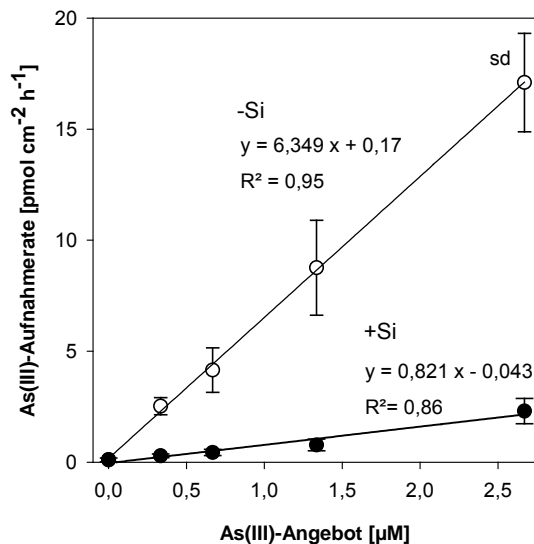


Abb.4.13: As(III)-Aufnahme in Abhängigkeit von der Arsenit-Konzentration in der Nährlösung nach 4-tägiger Behandlung bei unterschiedlichem Kieselsäureangebot.

4.4 Diskussion

4.4.1 As(III)-Toxizität

4.4.1.a Einfluss von As(III) auf den Frischmassezuwachs

Toxizität wurde durch einen verminderten Frischmassezuwachs der Pflanzen sichtbar. Sie äußerte sich unterschiedlich intensiv, da einerseits Behandlungen mit $\geq 21,4 \mu\text{M}$ As(III) akut wirkten und zu einer Abnahme der Frischmasse innerhalb der ersten 24 h nach Behandlungsbeginn führten, andererseits Behandlungen ab $\geq 5,3 \mu\text{M}$ As(III) nach 7 Tagen Behandlung chronisch in Form eines reduzierten Frischmassezuwachses wirkten. Dementsprechend finden sich auch in der Literatur unterschiedliche Angaben zur niedrigsten toxischen As(III)-Konzentration. Jha & Dubey (2004) konnten nach 5 Tagen As(III)-Applikation ein gehemmtes Wachstum ab $25 \mu\text{M}$ As(III) feststellen, dabei aber eine Oxidation von As(III) zu As(V) nicht ausschließen. Eine Oxidation zu As(V) kann aber die Aufnahme vermindern, da As(V) an der Wurzeloberfläche an Fe-Oxide sorbiert wird (Grafe et al. 2001, Goldberg 2002, Kinniburgh & Cooper 2004) und/oder mit diesen ausfällt (Pierce & Moore 1982, Takamatsu et al. 1985, Agget & Kriegman 1988). Tatsächlich war bei Jha & Dubey (2004) die As-Konzentration in der Pflanze deutlich niedriger als im vorliegenden Versuch. Marin et al. (1992) hingegen fanden in Nährlösung, die jeden zweiten Tag gewechselt wurde und auf As-Formen überprüft wurde, dass nach 4 Wochen Behandlung das Wachstum ab $10,7 \mu\text{M}$ As(III) deutlich beeinträchtigt war. Im vorliegenden Versuch hingegen war das Wachstum bei $10,7 \mu\text{M}$ As(III) bereits um $>50\%$ eingeschränkt. Allerdings haben Marin et al. (1992) zwischen $2,7$ und $10,7 \mu\text{M}$ As(III) keine weiteren Konzentrationen getestet, weshalb eine Toxizität in diesem Bereich nicht erkannt werden konnte. Hingegen fanden Shaibur et al. (2006) eine Toxizität bereits bei $6,7 \mu\text{M}$ As(III), allerdings erst nach einer 14-tägigen Behandlung, wobei die Nährlösung aber lediglich einmal pro Woche gewechselt wurde und somit eine Oxidation von As(III) wiederum nicht auszuschließen war. Da $6,7 \mu\text{M}$ As(III) zudem die niedrigste As(III)-Behandlung in ihren Versuchen war und diese zugleich die Spross- und Wurzel-TM, Wurzellänge und Sprosshöhe deutlich reduzierte (um 23, 15, 6 und 11 % respektiv), folgerten die Autoren, dass ein As(III)-Toxizitätsgrenzwert unter $6,7 \mu\text{M}$ As(III) liegen muss. Dies entspricht den vorliegenden Ergebnissen (s.o.). Hier war die Wurzel-TM durch $5,3 \mu\text{M}$ As(III) um 13 % verringert (Ergebnisse nicht aufgeführt). Aus dem relativen Frischmassezuwachs

4. Einfluss von Si auf Toxizität und Aufnahme rate in vivo von Arsenit bei Reis

ergibt sich hier zudem durch Anpassen einer logistischen Funktion mit 4 Parametern ein um 10% verminderter Frischmassezuwachs (EC_{10}) bei 2,3 bzw. 2,8 μM As(III) ohne bzw. mit Kieselsäureapplikation. Hiermit ähneln die Ergebnisse auch denen von Abedin & Meharg (2002), die zeigten, dass Pflanzen 8 verschiedener Sorten nach 7 Tagen Behandlung und insgesamt 12 Tage nach Keimung durch 6,7 μM As(III) um 17 % in ihrer Wurzellänge und 32% in ihrer Sprosshöhe reduziert wurden.

Weiter wurde in den Versuchen zur Ermittlung der Aufnahme rate bis 2,7 μM As(III) und somit unterhalb des errechneten EC_{10} -Wertes keine Toxizität beobachtet. Allerdings ist hier bereits mit einer Reaktion der Pflanze zu rechnen. So führten 3 μM As(III) bei *Arabidopsis* zu einem 100-fachen Anstieg der Phytochelatinkonzentration, während eine Reduktion des Wurzelwachstums erst bei 10 μM As(III) eintrat (Schmöger et al. 2000). Die Phytochelatinproduktion gilt hierbei als Indiz eintretenden As-Stresses. So stellten Raab et al. (2007) bei Untersuchungen von Phytochelatin-As-Komplexen an *Helianthus annuus* fest, dass das Verhältnis von freiem zu PC-gebundenem As bereits bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen abnimmt als das Wurzellängenwachstum.

Für eine toxische Wirkung des As(III) kommen mehrere Gründe infrage: Aufgenommenes As(III) reagiert mit Thiolgruppen von Proteinen und verursacht dadurch Funktionsstörungen von Enzymen und Gewebeproteinen (Delnomdedieu et al. 1993, Ullrich-Eberius et al. 1989, Jha & Dubey 2004). Während dies den Zellmetabolismus direkt beeinträchtigen kann, ist auch ein Eingriff in den Wasserhaushalt der Pflanze denkbar. Die rasche Reaktion des Frischmassezuwachses auf hohe As(III)-Konzentrationen lässt auf eine verminderte Wasserleitfähigkeit der Wurzel schließen. Versuche zur Transpiration (Kapitel 3) zeigten, dass die Transpirationsrate bei einer Applikation von 10,7 μM As(III) bereits nach 3 h signifikant vermindert war. Allerdings ist unklar, wie As(III) die Transpirationsrate senken kann. Einerseits könnte As(III) Cystein-Reste im Eingangsbereich von Aqua(glycero)porinen oxidieren und dadurch Wasserkanäle schließen. Mit steigender As(III)-Konzentration im Apoplasten könnte dadurch der Wassereinstrom in die Wurzel vermindert sein. Allerdings wird As(III) auch aufgenommen und es ist bekannt, dass verschiedene NIPs As(III) transportieren, u.a. die Siliziumtransporter Lsi1,2 und 6 (Ma et al. 2008, Bienert et al. 2008), wobei diese vermutlich nur geringfügig zum Wassertransport in die Pflanze beitragen. Bereits

aufgenommenes As(III) könnte aber im Zytosol reine Aquaporine schließen, wenn diese durch Phosphorylierung reguliert werden (Törnroth-Horsefield et al. 2006). Die dafür verantwortlichen Kinasen könnten durch aufgenommenes As(III) inaktiviert, bzw. entsprechende Phosphatasen aktiviert werden. Ein anhaltendes Wasserdefizit würde zudem wie bei Trockenstress und unabhängig von As(III) zu einem Schließen der Aquaporine durch Dephosphorylierung führen (Törnroth-Horsefield et al. 2006). Zudem wird die Expression von Lsi1 durch Trockenstress herabreguliert (Yamaji & Ma 2007). Eine verringerte Leitfähigkeit der Wurzel würde den Frischmassezuwachs direkt beeinträchtigen. Wie auch bei Trockenstress würde die Blattstreckungsrate empfindlich reagieren. Allerdings ist unbekannt, wie As(III) die Signalwege zwischen Spross und Wurzel in Bezug auf Wassertransport und Transpiration beeinflusst. Ein von der Wurzel ausgelöstes und vom Wasserstatus des Sprosses unabhängiges Signal, welches zu einem raschen Schließen der Stomata führt, ist denkbar. In der Literatur werden Abscisinsäure (ABA), pH und Ionenmilieu des Xylems als mögliche Signale beschrieben (Bahrun et al. 2002, Gollan et al. 1992, Schurr et al. 1992). Bei einer verminderten Transpiration wurde z.B. ein Anstieg des pH-Wertes im Xylem von Mais (Bahrun et al. 2002) und Tomate (Wilkinson et al. 1998) beobachtet. Dieser resultiert vermutlich aus dem gehemmten NO_3^- -Transport (Gollan et al. 1992, Schurr et al. 1992), welcher zusammen mit einem gehemmten Transport von weiteren Makronährstoffen beobachtet wurde (Bahrun et al. 2002).

Eine Applikation von Kieselsäure konnte die Toxizität nicht signifikant mindern. Auf die Wirkungsweise von Si auf die As(III)-Aufnahme wird im Zusammenhang mit den As- und Si-Gehalten eingegangen. Die wechselseitigen Einflüsse von As(III), Si und H_2O auf Aufnahme und Transport sind in Abb.4.14 dargestellt.

4.4.1.b As in der Trockenmasse

As kann bei Applikation von As(III) in Nährlösung in der Trockenmasse von Reis je Konzentration und Dauer der Applikation in Konzentrationen bis zu 1200 (Wurzel) bzw. 100 (Spross) $\mu\text{g As g}^{-1}$ TM vorkommen (Shaibur et al. 2006). Im Versuch zur As(III)-Toxizität wurden mit maximal 1444 $\mu\text{g As g}^{-1}$ TM vergleichbar hohe Konzentrationen in der Wurzel gefunden. Die Konzentration im Spross hingegen fiel mit maximal 27 $\mu\text{g As g}^{-1}$ TM niedriger aus. Auch Marin et al. (1992) fanden bis über 50 $\mu\text{g As g}^{-1}$ TM. In den Versuchen von Shaibur et al. (2006) und Marin et al. (1992) wurde allerdings As(III) länger appliziert, was möglicherweise zu einem höheren As-

4. Einfluss von Si auf Toxizität und Aufnahme rate in vivo von Arsenit bei Reis

Gehalt im Spross führte. Dass die gemessenen As-Gehalte im Spross dennoch im zu erwartenden Bereich liegen, zeigen Jha & Dubey (2004), die nach 5-tägiger As(III)-Applikation mit 25 μM As(III) nur 3,75 $\mu\text{g As g}^{-1}$ Spross-TM wiederfanden, sowie die Ergebnisse von Messungen von im Feld angebautem Paddyreis, der bei Ernte 20 $\mu\text{g As g}^{-1}$ TM Spross enthielt (Williams et al. 2007, Smith et al. 2009).

Weiter kam es durch toxische As(III)-Konzentrationen in der Nährlösung zu einer Abnahme der As-Konzentration in der TM. Das gleiche Ergebnis zeigte auch einer der vorangegangenen Versuche zur Ermittlung des FM-Zuwachses (Abb. 3.6 B und Anhang Abb. 7.1). Dabei zeigen Publikationen meist eine konstante Zunahme der As-Konzentration in der Pflanzenmasse mit der angebotenen As(III)-Konzentration (Jha & Dubey 2004, Marin et al. 1992, Shaibur et al. 2006). Lediglich Shaibur et al. (2006) fanden bei einer Steigerung der Applikation von 13,4 auf 26,8 μM As(III) keine Zunahme der As-Konzentration in der Wurzel-TM. Während aber Jha & Dubey (2004) sowie Shaibur et al. (2006) eine Oxidation zu As(V) nicht ausschließen konnten (s.o.), könnte bei Marin et al. (1992) eine weniger toxische Wirkung des As(III) bei 10,6 μM zu einer höheren Aufnahme über den längeren Zeitraum geführt haben. Zudem konnte in den genannten Fällen eine Abnahme der As-Konzentration mit steigendem As(III)-Angebot unter toxischen Konzentrationen aufgrund fehlender As(III)-Konzentrationen nicht erkannt werden. Marin et al. (1992) applizierten lediglich 0; 0,7; 2,7 und 10,7 μM As(III), Jha & Dubey (2004) 25 und 50 μM As(III), wodurch eine abnehmende Aufnahme bei Konzentrationen $>10,7$ bzw. eine höhere As-Konzentration im Spross bei 5,3 μM nicht erkannt werden konnte. Weiterhin fanden Shaibur et al. (2006) eine reduzierte Translokation von der Wurzel in den Spross bei Konzentrationen $\geq 13,4$ μM As(III) im Vergleich zu einem 6,7 μM As(III)-Angebot. Dies war auch im vorliegenden Versuch der Fall. Zudem wies auch die absolute As-Menge je Pflanze den Verlauf einer Optimumskurve in Abhängigkeit des As(III)-Angebotes auf. Hierbei akkumulierten mit 10,7 μM As(III) behandelte Pflanzen am meisten As. Dies zeigt, dass Pflanzen bei Konzentrationen bis 10,7 μM As(III) dieses relativ gut aufnehmen, aber zunehmend weniger verlagern. Über 10,7 μM As(III) hinaus kommt es zu einer verminderten As(III)-Aufnahme sowie deutlich verringertem Wachstum, woraus eine abnehmende Gesamtaufnahme resultiert. Letzteres ergibt sich auch aus der geringen Anreicherung von As in der Wurzel-FM gegenüber der Außenkonzentration bei 16,0 μM As(III) (Ergebnisse nicht aufgeführt).

Die Translokation von As in den Spross war zusammen mit dem Frischmassezuwachs bei niedrigeren As(III)-Applikationen vermindert. Einerseits könnte eine reduzierte Transpiration die As(III)-Verlagerung beeinflussen, denn die Siliziumtransporter Lsi1,2 und 6 transportieren As(III) (s.o.) und auch der Transport von Kieselsäure in der Pflanze wird u.a. durch Transpiration beeinflusst (Fauteux et al. 2005, Mitani & Ma 2005, Ma & Yamaji 2006). Andererseits wurde auch beschrieben, dass der Si-Gehalt des Sprosses stärker vom Transport durch Lsi2 als durch Lsi1 abhängt (Ma et al. 2008). Möglicherweise reagiert Lsi2 mit steigender As(III)-Konzentration zunehmend empfindlicher auf As(III) als Lsi 1. Es wird angenommen, dass Lsi2 ein $\text{H}_3\text{AsO}_3\text{-H}^+$ -Antiport ist, dessen Efflux direkt vom H^+ -Gradienten abhängt (Ma et al. 2007). Damit würde Lsi2 empfindlich auf Schäden der Zellmembran reagieren. Zudem könnte As(III) auch direkt bzw. indirekt über regulatorische Proteine auf Lsi2 toxisch wirken.

4.4.1.c Einfluss von Kieselsäure auf die As-Gehalte in der Trockenmasse

Eine Behandlung mit 0,89 mM Kieselsäure hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Frischmassezuwachs, führte aber zu verminderter As-Konzentration in Spross und Wurzel sowie einer niedrigeren Translokation von As. Hierbei nahm der Unterschied in der Translokation zwischen +Si und -Si-Behandlungen mit steigender Konzentration ab. Guo et al. (2005) stellten nach Applikation von Kieselsäure ebenfalls eine Abnahme der As-Konzentration in Wurzel und Spross fest. Allerdings wurde dort As(V) appliziert und es ist nicht bekannt, wie Si die As(V)-Aufnahme beeinflusst. Da dort die As-Spezies nicht überprüft wurden, lag möglicherweise ein Teil des Arsens als As(III) durch Reduktion in der Nährlösung vor. Zudem kann As(V) möglicherweise im Symplasten der Wurzel reduziert (Mukhopadhyay & Rosen 2002, Bleeker et al. 2006, Dhankher et al. 2006, Duan et al. 2007, Norton et al. 2008) und wieder in die Lösung exportiert werden (Bienert et al. 2008, Xu et al. 2007). Insbesondere die Ergebnisse von Xu et al. 2007 zeigen, dass Reis in Nährlösung As(V) innerhalb eines Tages reduzieren kann.

Da eine konstante Applikation von Silizium die Expression der Siliziumtransporter Lsi1 und 2 jeweils auf ein $\frac{1}{4}$ reduziert (Ma et al. 2006, Ma et al. 2007) und beide As(III) transportieren, kann Si durch Senken der Anzahl der Transporter die As(III)-Aufnahme und Translokation über Lsi1 und Lsi2 verringern (Ma et al. 2008). In ihren Versuchen fanden Ma et al. (2008) nach 7 Tagen Behandlung mit 2 μM As(III) eine

signifikante Abnahme der As-Konzentration im Xylem-Saft wie auch im Spross durch 0,5 mM Kieselsäure. Da bei dieser Konzentration As(III) nicht toxisch ist, könnten die verminderten As-Konzentrationen auf die genannten Gründe zurückzuführen sein. Guo et al. (2005) untersuchten ebenfalls die Translokation von As bei Reis, allerdings nach Applikation von As(V). Er fand keine signifikant reduzierte Translokation des As in den Spross durch Kieselsäure. In der vorliegenden Arbeit war die Translokation bei 1,3 μM As(III) am stärksten durch Kieselsäure vermindert und bis zu einer Überschreitung des EC_{10} -Toxizitätsgrenzwertes war keine signifikante Si-Wirkung zu beobachten. Weiter kann Silizium die Transpiration von Reis mindern und ist maßgeblich an der stomatären Leitfähigkeit beteiligt (Agarie et al. 1998). Ein verminderter Transpirationsstrom könnte somit den Transport von As zusammen mit einer geringeren Expression der Transporter reduzieren.

4.4.1.d Einfluss von As(III) auf den Si-Gehalt in der Trockenmasse

Der Si-Gehalt im Spross wurde durch As(III)-Konzentrationen von 10,7 bis 21,4 μM reduziert. Guo et al. (2005) fanden einen reduzierten Si-Gehalt in den Wurzeln durch Applikation von 13,3 μM As(V), aber nicht im Spross. Es ist unbekannt, wie As den Si-Gehalt im Spross reduziert. Zwei mögliche Wege sind denkbar: 1) As(III) beeinträchtigt die Wirkungsweise von Lsi1 und Lsi2 (s.o.), wodurch es zu einer verminderten Si-Aufnahme käme. 2) Verminderte Transpiration beeinträchtigt den apoplastischen Si-Transport und führt zu niedrigerer Verlagerung von Si in den Spross. Bei der höchsten Behandlungsstufe (26,7 μM) wurde kein verminderter Si-Gehalt festgestellt. Da diese Pflanzen allerdings nicht gewachsen sind, spiegelt die ermittelte Konzentration vermutlich die Si-Konzentration gegen Versuchsbeginn wider.

4.4.1.e Wirkung von As(III) auf Wachstum, Aufnahme und Verlagerung von As und Si von 6 Wochen alter Reispflanzen

Die Behandlung älterer Pflanzen mit As(III) führte zu ähnlichen Ergebnissen wie die Behandlung jüngerer Pflanzen. Auch hier verminderte As(III) den Frischmassezuwachs. Anders als bei jüngeren Pflanzen konnte allerdings keine toxische Wirkung durch 5,3 μM As(III) festgestellt werden. Die Ursache hierfür könnte eine geringere As(III)-Aufnahme der älteren Pflanzen sein. Tatsächlich war die As-Konzentration in der Wurzel-TM der älteren Pflanzen nach gleicher

4. Einfluss von Si auf Toxizität und Aufnahme rate in vivo von Arsenit bei Reis

Behandlungsdauer wesentlich geringer. Eine geringere Aufnahme von As(III) mit zunehmendem Alter der Pflanze könnte dabei an einer geringeren Anzahl an Transportern für As(III) liegen. Die Expression von Lsi1 und Lsi2 ist hierbei in jüngeren Wurzelsegmenten am stärksten und nimmt mit dem Alter der Wurzel ab (mündlich überliefert, T. Nyi 2009). Da mit zunehmendem Wurzellängenwachstum der Anteil junger Wurzelsegmente am Gesamtwurzelsystem abnimmt, könnte so eine geringere Anzahl an Transportern zu einer geringeren Aufnahme geführt haben. Dies würde zudem bedeuten, dass As(III) auch im Symplasten toxisch wirkt, denn ein externes Einwirken von As(III) auf Aquaporine und NIPs müsste bei jungen und alten Pflanzen ähnlich sein. Zudem würde eine relativ geringere Anzahl reiner Aquaporine am Wurzelsystem älterer Pflanzen zu keiner Minderung der Toxizität führen. Lediglich die geringere As-Konzentration in der TM kann hier die geringere Empfindlichkeit gegenüber 5,3 μM As(III) erklären.

Weiter minderte die Applikation von Kieselsäure - wie bei jüngeren Pflanzen - die Toxizität nicht. Auch der Verlauf der As-Konzentrationen in der Trockenmasse entspricht dem der jüngeren Pflanzen. Allerdings wurde letzteren As(III) auch in Konzentrationen zwischen 5,3 und 16 sowie >16 μM angeboten. Da diese Konzentrationen den älteren Pflanzen nicht angeboten wurden, konnte hier eine verstärkte Aufnahme zwischen 5,3 und 16 μM As(III) bzw. eine verminderte Aufnahme bei Konzentrationen >16 μM nicht erkannt werden konnte. Ebenso konnte eine Applikation von Kieselsäure die As-Konzentration in der Wurzel nicht signifikant mindern. Allerdings wurde im Spross eine Reduktion des As-Gehaltes durch Kieselsäure festgestellt. Ferner war die Translokation von As in den Spross bei alten und jungen Pflanzen in den gemessenen Konzentrationen nahezu identisch.

Wie bei jüngeren Pflanzen war auch bei älteren Pflanzen bei Applikation von Kieselsäure der Si-Gehalt im Spross erst durch Konzentrationen $>5,3$ μM As(III) vermindert. Ohne Kieselsäure-Applikation konnte diese Reduktion nicht festgestellt werden. Allerdings betrug hier die Si-Konzentration in der Spross-TM bei älteren Pflanzen nur 1/10 derjenigen jüngerer Pflanzen. Eine geringere Si-Aufnahme deckt sich hierbei mit der ebenfalls geringeren As-Aufnahme (s.o.). Die Gründe hierfür dürften die gleichen sein, die auch zu einer geringeren As-Aufnahme führten, da einige Si-Transporter auch As(III) transportieren (s.o.). In der Wurzel-TM führte die niedrigste As(III)-Konzentration von 1,3 μM bei +Si-Pflanzen bereits zu einem verminderten Si-Gehalt. Damit reagierte die Si-Aufnahme empfindlicher als die Si-

Verlagerung, wobei die Reaktion bereits unterhalb des EC_{10} -Toxizitätsgrenzwertes stattfand. Hingegen führte die höchste As(III)-Applikation von 16 μM As(III) nicht zu verminderten Si-Konzentrationen in der Wurzel-TM. As(III) könnte hier die Translokation vermindert haben, da die Si-Konzentration in der Spross-TM reduziert war.

4.4.2 As(III)-Aufnahmerate

Die Aufnahme rate wurde unterhalb des Toxizitätsgrenzwertes von 2,6 μM As(III) ermittelt. Hierbei konnte keine Toxizität beobachtet werden und die Pflanzen nahmen As(III) linear abhängig vom Angebot auf. As(III) wurde gegen den Konzentrationsgradienten aufgenommen, denn die Pflanzen akkumulierten As in der Frischmasse der Wurzeln um das 120-160-fache der Außenkonzentration. Es kommt zu einer As-Akkumulation in der Wurzel, da mehr As aufgenommen als verlagert wird. Eine niedrigere Verlagerung kann wiederum aus der Bindung des stark toxischen As(III) in der Wurzel an GSH und Phytochelatine resultieren (s.o.). Weiter scheint die Arsenaufnahme nicht geregelt zu sein, denn die Akkumulation gegenüber der Außenkonzentration blieb über alle angebotenen Konzentrationen und unabhängig vom Si-Angebot konstant. Dies würde den Transport über wassertransportierende Kanäle implizieren. Da bestimmte NIPs As(III) transportieren, As(III) u.a. über Siliziumtransporter aufgenommen und verlagert wird und Si und As im Xylem verlagert werden, scheint dies schlüssig. Zwar zeigen Untersuchungen der Si-Transporter Lsi1 und Lsi2 eine Michaelis-Menten-Kinetik, jedoch liegt der K_m -Wert dieser Transporter in einem Konzentrationsbereich, bei dem As(III) deutlich toxisch wirkt. Der K_m -Wert für die Aufnahme von Si aus der Lösung in die Cortex-Zellen (Lsi1) liegt bei 0,15 mM (Ma et al. 2004) und für die Gesamtaufnahme bei 0,32 mM (Tamai & Ma 2003) bzw. 0.35 ± 0.05 mM (Nikolic et al. 2007). Zudem wird V_{\max} bei ca. 1,5-1,6 mM externer Si-Konzentration erreicht (Mitani & Ma 2005, Nikolic et al. 2007, Tamai & Ma 2003). Für As(III) hingegen wurde aus den vorliegenden Ergebnissen ein EC_{10} -Wert von 2,7 μM berechnet. Damit liegt der nicht-toxische Konzentrationsbereich von As(III) für Reis im unteren Operationsbereich der Si-Transporter und somit im linearen Bereich der Michaelis-Menten-Funktion. Die ermittelte Aufnahme rate stieg hier linear um $6,349 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ je μM As(III)-Angebot.

Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Abedin et al. (2002), Meharg & Jardine (2003) und Chen et al. (2005). Diese fanden bei Aufnahmekinetiken für As(III) durch Reis an abgeschnittenen Wurzeln in Kurzzeitversuchen hohe Korrelationen der Aufnahme rate mit einer Michaelis-Menten-Funktion, allerdings mit unterschiedlichen K_m -Werten von 3,7; 15,5; 22,9 und 180 μM As(III). In diesen Versuchen wurde zudem As(III) in Konzentrationen von $\geq 6,7 \mu\text{M}$ bis teils 2,5 mM appliziert. Damit wurden diese Versuche ausschließlich in Konzentrationen durchgeführt, die in der vorliegenden Arbeit deutlich toxisch wirkten. Zudem konnte hier gezeigt werden, dass As(III) in toxischen Konzentrationen neben dem FM-Zuwachs auch die Aufnahme von As(III) sowie Verlagerung von As(III) und Si beeinträchtigt. Die aus der Literatur genannten Aufnahmekinetiken sind somit ein Artefakt.

Eine Applikation mit Kieselsäure verminderte ferner die As-Konzentration in der TS. Mögliche Gründe hierfür wurden bereits beschrieben (s.o.).

4.4.3 Wechselwirkung von Si, As(III) und Wassertransport bei Reis

Aufnahme von As(III) und Si erfolgt durch NIPs und Lsi2 (Bienert et al. 2008, Ma et al. 2008), während Wasser über Aquaporine aufgenommen wird.

As(III) könnte die Aufnahme von Wasser, aber auch As(III) und Si beeinträchtigen. Im Apoplasten würde eine Bindung von As(III) an Cystein-Gruppen die Funktionsweise von NIPs und Aquaporinen stören. Darüber hinaus könnte es im Apoplasten wie Symplasten an Thiol-Gruppen weiterer Proteine binden und deren Funktion stören (Delnomdedieu et al. 1993, Ullrich-Eberius et al. 1989). Zu diesen zählen möglicherweise auch im Symplasten lokalisierte regulatorische Proteine von NIPs und Aquaporinen.

Nur ein geringer Teil des aufgenommenen As(III) kann in den Spross transloziert werden, da dieses vermutlich größtenteils in Vakuolen der Wurzel sequestriert wird (Zhao et al. 2009). As(III) beeinträchtigt zudem die Verlagerung von As(III), Si und Wasser in den Spross. Vermutlich liegt dies daran, dass auch an deren Verlagerung NIPs und Aquaporine beteiligt sind (Bienert et al. 2008, Ma et al. 2008). Zudem ist möglicherweise der Transporter Lsi2 durch As(III) beeinträchtigt, welches die Translokation von As(III) und Si vermindert. As(III) reduziert die Transpirationsrate möglicherweise zusätzlich über Signalwege wie Abscisinsäure und pH des Xylems. Auch Si reduziert die Transpirationsrate, möglicherweise über eine reduzierte kutikuläre Transpiration sowie über die Regulation der Stomata (Agarie et al. 1998).

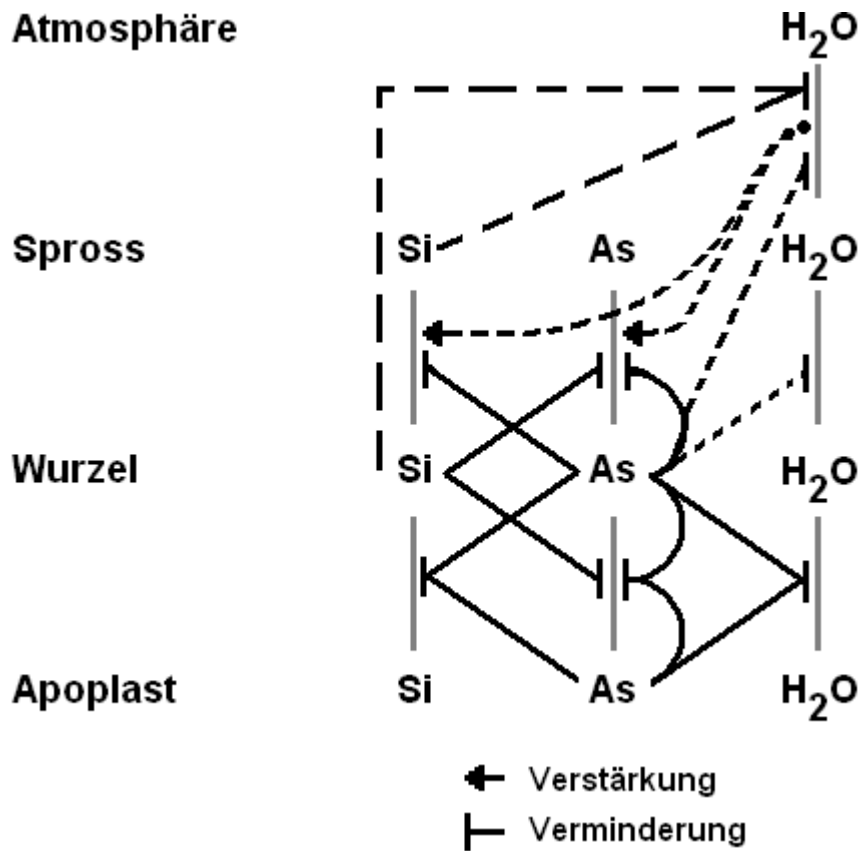


Abb.4.14: Wechselwirkung von Si, As(III) und Wassertransport bei Reis. Durchgezogene Linien stellen vermutete Beziehungen aufgrund der vorliegenden Ergebnisse und gestrichelte Linien weitere vermutete Beziehungen dar.

Die Transpiration könnte wiederum den Transport von As(III) und Si beeinflussen, da diese im Xylem verlagert werden. Ein kontinuierliches Angebot von Si führt zudem neben einer verminderten Transpiration zu einer geringeren Expression der Transporter Lsi1 und 2 (Ma et al. 2006, Ma et al. 2007), wodurch die As(III)-Aufnahme als auch Verlagerung in den Spross reduziert wird.

5. Abschließende Betrachtung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die toxische Wirkung von As(III) auf das Wachstum von Reis zu untersuchen. Hierzu bedurfte es zunächst eines zerstörungsfreien Parameters zur Erfassung der Toxizität. Untersuchungen verschiedener Parameter zeigten, dass As(III) einen Einfluss auf den Wasserhaushalt der Pflanze hat. Eine Behandlung mit $\geq 10,7 \mu\text{M}$ As(III) reduzierte innerhalb von 3 h die Transpirations- und Photosyntheserate. Auch eine Behandlung über mehrere Tage führte zu einer konstant niedrigen Transpirations- und Photosyntheserate, allerdings erst durch $\geq 16 \mu\text{M}$ As(III). Möglicherweise führten hier Anpassungsmechanismen der Pflanze zu einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber As(III). In mehreren Versuchen konnte zudem eine Abhängigkeit des Frischmassezuwachses von der As(III)-Konzentration in der Nährlösung gezeigt werden, wobei der Frischmassezuwachs empfindlicher reagierte als Transpirations- oder Photosyntheserate. Als Größe, die das Wachstum der Pflanzen direkt widerspiegelt, schien der FM-Zuwachs damit eine geeignete Größe zur Ermittlung der As(III)-Toxizität zu sein. Nach 4-5 Tagen Behandlung reduzierten Konzentrationen $\geq 5,3 \mu\text{M}$ As(III) den FM-Zuwachs signifikant. Dies wurde in einem weiteren Versuch bestätigt, wobei der ermittelte EC_{10} -Wert bei $2,4 \mu\text{M}$ As(III) lag. Behandlungsstufen $\geq 21,4 \mu\text{M}$ As(III) führten zudem zu einer Abnahme der Frischmasse innerhalb von 24 h nach Behandlungsbeginn. Die Ursache hierfür könnte die Beeinträchtigung von Aquaporinen durch As(III) sein. Weiter folgte in diesen Versuchen die As-Konzentration in der TM der angebotenen As(III)-Konzentration in Form einer Optimumskurve. Damit könnte As(III) durch die Beeinträchtigung der Funktion von NIPs seine eigene Aufnahme mit zunehmender Toxizität vermindern. Ebenso war die Translokation von As in den Spross mit steigender As(III)-Konzentration in der Nährlösung beeinträchtigt, wobei die höchsten As-Konzentrationen sowie absolute As-Mengen Pflanze⁻¹ nach Applikation von $10,7 \mu\text{M}$ (Wurzel) und $5,3 \mu\text{M}$ (Spross) As(III) auftraten.

Um eine Wirkung von Si auf die As(III)-Toxizität zu untersuchen wurden Pflanzen mit $0,89 \text{ mM}$ Kieselsäure kultiviert und in Nährlösung mit As(III) behandelt. Die Applikation von Kieselsäure konnte die Reduktion im FM-Zuwachs nicht signifikant mindern, führte aber zu einer niedrigeren As(III)-Aufnahme sowie Verlagerung von As in den Spross. As(III) führte seinerseits zu einer Reduktion der Si-Konzentration in der Spross-TM. Dies beruht möglicherweise wiederum auf einem gemeinsamen

Transporter von As(III) und Si, wobei einige dieser Transporter NIPs sind. Die Ergebnisse zeigen, dass Si zwar die As(III)-Aufnahme und –Verlagerung verringern kann. Dies kann eine As(III)-Toxizität aber nur bedingt beeinflussen, da eine toxische Wirkung zumindest teilweise von As(III) im Apoplasten durch Störung des Wasserhaushaltes beruht.

Mithilfe der Ergebnisse aus den Versuchen zur As(III)-Toxizität konnte die Aufnahmerate von As(III) ermittelt werden. Eine Steigerung der angebotenen As(III)-Konzentration unterhalb des ermittelten EC_{10} -Wertes ergab einen linearen Anstieg der Aufnahmerate, unabhängig vom Si-Angebot. Auch die bekannten As(III)-transportierenden Si-Transporter zeigen unter für As(III) physiologisch relevanten Konzentrationen eine lineare Aufnahme in Abhängigkeit der Konzentration. Die Pflanzen reicherten As(III) zudem über alle nicht-toxischen Konzentrationen gleichmäßig an, was eine nicht geregelte Aufnahme vermuten lässt.

6. Zusammenfassung

Arsenit [As(III)] kann zu Wachstumsdepressionen und Ertragsdefiziten bei Reis führen und über das Korn in die Nahrungskette gelangen. Silizium hingegen kann die As(III)-Aufnahme durch Reis mindern. In zwei Versuchen wurde untersucht, wie Si die As(III)-Toxizität und –Aufnahme intakter Pflanzen beeinflusst. Durch Wiegen gelang es, die Wirkung von 0 - 26,7 μM As(III) sowie 0,89 mM Si auf die Frischmasseentwicklung junger Reispflanzen in Nährlösung über 7 Tage zu beobachten. Die Aufnahme wurde unterhalb des ermittelten EC_{10} -Wertes bestimmt, um einen toxischen Einfluss von As(III) auf die Aufnahme auszuschließen. Hierzu wurde As(III) Wurzeln intakter Pflanzen in einem Durchflusssystem unter Sauerstoffausschluss und Gewährleistung der As-Form über 4 Tage angeboten. Der Frischmassezuwachs wurde durch 5,3 μM As(III) um 32,5 % bzw. 27 % vermindert, -Si und +Si respektiv ($\text{EC}_{10} = 2,4$ und 2,8 μM). Die As(III)-Aufnahme erfolgte linear abhängig vom Angebot und stieg um 6,349 ($R^2 = 0,95$) bzw. um 0,821 ($R^2 = 0,86$) $\text{pmol As(III) cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ je $\mu\text{M As(III)-Angebot}$, -Si und +Si respektiv. Dabei reicherten -Si-Pflanzen bei allen angebotenen Konzentrationen das 120-160fache der Außenkonzentration in der Frischmasse der Wurzeln an. +Si-Pflanzen reicherten im Mittel 15-mal weniger an. Si konnte die As-Konzentration in der Trockenmasse sowie die Translokation senken, führte aber nicht zu einer verminderten Toxizität.

7. Anhang

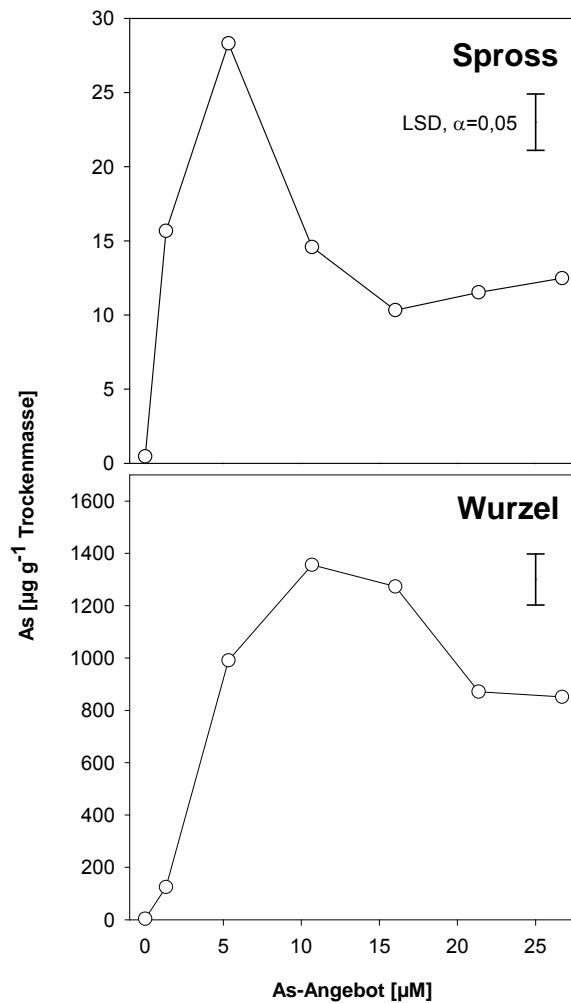


Abb.7.1: As-Konzentration in Spross- und Wurzel-TM in Abhängigkeit von der Arsenit-Konzentration in der Nährlösung nach 7-tägiger Behandlung. Die verwendeten Proben stammen aus dem Versuch zum FM-Zuwachs beschrieben in Kapitel 3 und dargestellt in Abb. 3.6 B.

8. Literatur

Abedin M. J., Meharg A. A. (2002): Relative toxicity of arsenite and arsenate on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*: 243, 57-66.

Abedin M. J., Cotter-Howells J., Meharg A. A. (2002): Arsenic uptake and accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) irrigated with contaminated water. *Plant and Soil*: 240, 311-319.

Abedin M. J., Cresser M. S., Meharg A. A., Feldmann J., Cotter-Howells (2002b): Arsenic accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science and Technology*: 36 (5), 962-968.

Abedin M. J., Feldmann J., Meharg A. A. (2002c): Uptake kinetics of arsenic species in rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Plant Physiology*: 128, 1120-1128.

Agarie S., Uchida H., Agata W., Kubota F., Kaufman P. B. (1998): Effects of Silicon on Transpiration and Leaf Conductance in Rice Plants (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science*: 1 (2), 89-95.

Agget J., Kriegman M. R. (1988): The extent of formation of arsenic (III) in sediment interstitial waters and its release to hypolimnetic waters in lake Ohakuri. *Water Research*: 22, 407-411.

Agre P., Hazama A., Kozono D., Guggino W. B., Yasui M. (2002): Ion permeation of AQP6 water channel protein. *The Journal of Biological Chemistry*: 277 (32), 29224-29230.

Ahmann D., Krumholz L. R., Hemond H. F., Lovly D. R., Morel F. M. M (1997): Microbial mobilization of arsenic from sediments of Aberjona Watershed. *Environmental Science and Technology*: 31, 2923-2930.

Bahrn A., Jensen C. R., Asch F., Mogensen V. O. (2002): Drought-induced changes in xylem pH, ionic composition, and ABA concentration act as early signals in field-grown maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*: 53 (367), 251-263.

Barber S. A. (1984): *Soil Nutrient Availability: A Mechanistic Approach* (Wiley, New York).

Bertolero F., Pozzi G., Sabbioni E., Saffiotti U. (1987): Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformation. *Carcinogenesis*: 8, 803-808.

Bienert G. P., Thorsen M., Schüssler M. D. (2008): A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of $\text{As}(\text{OH})_3$ and $\text{Sb}(\text{OH})_3$ across membranes. *BMC Biology*: 6, 26.

Bleeker P. M., Hakvoort H. W. J., Blik M., Souer E., Schat H. (2006): Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *The Plant Journal*: 45, 917-929.

BVL 2005:

http://www.bvl.bund.de/nn_781904/DE/01_Lebensmittel/03_UnerwStoffeUndOrganismen/05_Schwermetalle/schwermetalle_node.html_nnn=true, [31/8/2005].

Carter E. D. (1995): Oxidation – Reduction reactions of metal ions. *Environmental Health Perspectives*: 103 (1), 17-19.

Chaumont F., Moshelion M., Daniels M. J. (2005): Regulation of plant aquaporin activity. *Biology of the Cell*: 97(10), 749-764.

Chen Z., Zhu Y.-G., Liu W.-J., Meharg A. A. (2005): Direct evidence showing the effect of root surface iron plaque on arsenite and arsenate uptake into rice (*Oryza sativa*) roots. *New Phytologist*: 165, 91-97.

Cobbett C. S. (2000): Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology*: 3, 211.

Cobbett C. S. & Goldsbrough P. (2002): Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*: 53, 159-182.

De Groot B. L., Frigato T., Helms V., Grubmüller H. (2003): The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel. *Journal of Molecular Biology*: 333, 279-293.

Delnomdedieu M., Basti M. M., Otvos J. D., Thomas D. J. (1994): Transfer of arsenite from glutathione to dithiols: A model of interaction. *Chemical Research in Toxicology*: 6, 598-602.

Dhankher O. P., Rosen B. P., McKinney E. C., Meagher R. B. (2006): Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2). *PNAS*: 103 (14), 5413-5418.

Dordas C., Chrispeels M. J., Brown P. H. (2000): Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiology*: 124, 1349-1362.

Duan G.-L., Zhou Y., Tong Y.-P., Mukhopadhyay R., Rosen B. P., Zhu Y.-G. (2007): A CDC25 homologue from rice functions as an arsenate reductase. *New Phytologist*: 174, 311-321.

Echevarria M., Windhager E. E., Tate S. S., Frindt G. (1994): Cloning and expression of AQP3, A water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*: 91, 10997-11001.

Epstein E. (1994): The anomaly of silicon in plant biology. *PNAS*: 91, 11-17.

Epstein E. (1999): Silicon. Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology: 50, 641-664.

FAOSTAT 2005: (<http://faostat.fao.org/>).

Fauteaux F., Rémus-Borel W., Menzies J. G., Bélanger R. R. (2005): Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. FEMS Microbiology Letters: 249, 1-6.

Ferguson J. F., Gavis J. (1972): A review of the arsenic cycle in natural waters. Water Research: 6, 1259-1274.

Fetter K., Van Wilder V., Moshelion M., Chaumont F. (2004): Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. Plant Cell: 16, 215-228.

Fu D., Libson A., Miercke L. J. W., Weitzman C., Nollert P., Krucinski J., Stroud R. M. (2000): Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. Science: 290, 481-486.

Ghosh M., Shen J., Rosen B. P. (1999): Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Science: 96, 5001-5006.

Goldberg S. (2002): Competitive adsorption of arsenate and arsenite on oxides and clay minerals. Soil Science Society of America Journal: 66, 413-421.

Gollan T., Schurr U., Schulze E.-D. (1992): Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. I. The concentration of cations, anions, amino acids in, and pH of the xylem sap. Plant, Cell and Environment: 15, 551-559.

Grafe M., Eick M. J., Grossl P. R. (2001): Adsorption of arsenate (V) and arsenite (III) on goethite in the presence and absence of dissolved organic matter. *Soil Science Society of America Journal*:65, 1680-1687.

Grill E., Winnacker E-L, Zenk, M. H. (1987): Phytochelatins, a class of metal-binding peptides from plants, are functionally analogues to metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Science*: 84, 439-443.

Guo W., Huo Y.-L., Wang S.-G., Zhu Y.-G. (2005): Effect of silicate on the growth and arsenate uptake by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in solution culture. *Plant and Soil*: 272, 173-181.

Hammer U. T., Huang P. M., Oscarson D. W., Liaw W. K. (1982): Dynamics and mechanisms of arsenite oxidation by freshwater lake sediments. *Hydrobiologia*: 91, 315-322.

Hartley–Whitaker J., Ainsworth G., Meharg A. A. (2001): Copper- and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L., clones with differential sensitivity. *Plant Cell & Environment*: 24, 713-722.

Harvey C. F., Swartz C. H., Badruzzman A. B. M., Keon-Blute N., Yu W., Ali M. A. (2002): Arsenic mobility and groundwater extraction in Bangladesh. *Science* 298: 1602.

Henzler T., Steudle E. (2000): Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *Journal of Experimental Botany*: 51, 2053-2066.

Hingston F. J., Posner A. M., Quirk J. P. (1972): Competitive adsorption of negatively charged ligands on oxide surfaces. *Faraday Discussions of the Chemical Society*: 52, 334-342.

Hoffmann H. (2007): Faktoren der Arsenaufnahme bei Reis (*Oryza sativa*). Arbeit zur Erlangung des Abschlusses „Bachelor of Science in Gartenbauwissenschaften“. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Pflanzenernährung, Herrenhäuser Str. 2, D-30149 Hannover.

Horiguchi T. (1988): *Soil Science & Plant Nutrition*: 34, 65-73.

Hug S. J., Canonica L., Wegelin M., Gechter D., Gunten U. V. (2001): Solar oxidation and removal of arsenic at circumneutral pH in iron containing waters. *Environmental Science and Technology*: 35, 2114-2121.

IRRI 2001: (www.irri.org).

Ishibashi K., Kuwaharat M., Gu Y., Kageyama Y., Tohsaka A., Suzuki F., Marumo F., Sasaki S. (1997): Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol and urea. *Journal of Biological Chemistry*: 272, 20782-20786.

Jackson C. R., Dugas S. L. (2003): Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal *arsC* gene sequences suggests an ancient, common origin for arsenate reductase. *BMC Evolutionary Biology*: 3, 18-27.

Jahn TP, Moellert A. L., Zeuthen T., Holm L. M., Klaerke D. A., Mohsin B., Kühlbrandt W., Schjoerrig J. K. (2004): Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS letters*: 574, 31-36.

Jensen M., Park S., Tajkhorshid E., Schulten K. (2002): Energetics of glycerol conduction through aquaglyceroporin GlpF. *Proceedings of the National Academy of Science*: 99, 6731-6736.

Jha A. B., Dubey R. S. (2004): Arsenic exposure alters activity behaviour of key nitrogen assimilatory enzymes in growing rice plants. *Plant Growth Regulation*: 43, 259-268.

Jha A. B., Dubey R. S. (2004b): Carbohydrate metabolism in growing rice seedlings under arsenic toxicity. *Journal of Plant Physiology*: 161, 867-872.

Johansson I., Karlsson M., Shukla V. K., Chrispeels M. J., Larsson C., Kjellborn P. (1998): Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell*: 10, 451-459.

Jones L. H. P., Hendreck K. A. (1967): *Adv. Agronomy*: 19, 107-149.

Kenney L. J., Kaplan J. H. (1988): Arsenate substitutes for phosphate in the human red cell sodium pump and anion exchanger. *Journal of Biological Chemistry*: 15, 7954-7960.

Kinniburgh D. G., Cooper D. M. (2004): Predominance and stability diagrams revisited. *Environmental Science and Technology*: 38, 3641-3648.

Latscha H. P., Klein H. A. (2002): Periodensystem der Elemente in „Anorganische Chemie“, 8. Auflage, S. 39, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

LGL 2005: (http://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/arsen_in_algen.htm), [25/1/2006].

Li L. G., Li S. F., Tao Y., Kitagawa Y. (2000): Molecular cloning of a novel water channel from rice: Its products expression in *Xenopus* oocytes and involvement in chilling tolerance. *Plant Science*: 154, 43-51.

Liu S. X., Athar M., Lippai I., Waldren C., Hei T. K. (2001): Induction of oxyradicals by arsenic: Implication for mechanism of genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*: 98, 1643-1648.

Ma J. F., Nishimura K., Takahashi E. (1989): Effect of silicon on the growth of rice plants at different growth stages. *Soil Science Plant Nutrition*: 35, 347-356.

Ma J. F., Miyake Y., Takahashi E. (2001): Silicon as a beneficial element for crop plants. In: Datnoff L. E., Snyder G. H., Korndorfer G. H., eds., *Silicon in Agriculture*. Elsevier Science Publishing, Amsterdam, 17-39.

Ma J.F., Yamaji N., Mitani N., Nagao S., Konishi S., Tamai K., Iwashita T., Yano M (2004): Characterization of the silicon Uptake System and Molecular Mapping of the Silicon Transporter Gene in Rice. *Plant Physiology*: 136, 3284-3289.

Ma J.F., Tamai K., Yamaji N., Mitani N., Konishi S., Katsuhara M., Ishiguro M., Murata Y., Yano M. (2006): A silicon transporter in rice. *Nature*: 440, 688-691.

Ma J.F., Yamaji N. (2006): Silicon uptake and accumulation in higher plants. *TRENDS in Plant Science*: 11 (8), 392-397.

Ma J.F., Yamaji N., Mitani N., Tamai K., Konishi S., Fujiwara T., Katsuhara M., Yano M. (2007): An efflux transporter of silicon in rice. *Nature*: 448, 209-213.

Ma J.F., Yamaji N., Mitani N., Xu X.-Y., Su Y.-H., McGrath S.P., Zhao F.-J. (2008): Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *PNAS*: 105 (29), 9931-9935.

Macnair M. R., Cumbes Q. (1987): Evidence that arsenic tolerance in *H. lanatus* L. is caused by an altered phosphate uptake system. *New Phytologist*: 107, 387-394.

Marin A. R., Masscheleyn P. H., Patrick W. H. Jr. (1992): The influence of chemical form on a concentration of arsenic on rice growth and tissue arsenic concentration. *Plant and Soil*: 139, 175-183.

Marin A. R., Masscheleyn P. H., Patrick W. H. (1993): Soil redox-pH stability of arsenic species and its on arsenic uptake by rice. *Plant and Soil*: 152, 245-253.

Marschner H. (1995): Beneficial mineral elements. In: *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, San Diego, 405-435.

Masscheleyn P. H., DeLaune R. D., Patrick W. H. (1991): Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in contaminated soil. *Environmental Science and Technology*: 25, 1414-1419.

Matera V., Hecho I. L., Laboudigue A., Thomas P., Tellier S., Astruc M. (2003): A methodological approach for the identification of arsenic bearing phases in polluted soils. *Environmental Pollution*: 126, 51-64.

Maurel C. (1997): Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*: 48, 399-429.

Maurel C., Tyerman S. D., Bohnert H. J., Steudle E., Smith J. A. C. (1999): Plant aquaporins: Their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Journal of Experimental Botany*: 50, 1055-1071.

Maurel C., Chrispeels M. J. (2001): Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology*: 125, 135-138.

McCleskey R. B., Nordstrom D. K., Maest A. S. (2004): Preservation of water samples for arsenic (III/V) determinations: An evaluation of the literature and new analytical results. *Applied Geochemistry*: 19, 995-1009.

McDermott T. R., Kashyap D. R., Botero L. M., Franck W. L., Hassett D. J. (2006): Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*: 188 (3), 1081-1088.

Meharg A. A., Macnair R. M. (1992): Suppression of the high affinity phosphate uptake system: A mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *Journal of Experimental Botany*: 43 (249), 519-524.

Meharg A. A., Macnair R. M. (1994): Relationship between plant phosphorus status and the kinetics of arsenate influx in clones of *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. that differ in their tolerance to arsenate. *Plant and Soil*: 162 (1), 99-106.

Meharg A. A., Hartley-Whitaker J. (2002): Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist*: 154, 29-43.

Meharg A. A., Jardine L. (2003): Arsenite transport into paddy rice (*Oryza sativa*) roots. *New Phytologist*: 157, 39-44.

Meharg A. A., Rahman M. D. M. (2003): Arsenic contamination of Bangladeshy paddy field soils: implications for rice contribution to arsenic consumption. *Environmental Science and Technology*: 37, 229-234.

Meharg A. A., P. N. Williams, A. H. Price, A. Raab, S. A. Hossain, J. Feldman (2005): Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure. *Environmental Science and Technology*: 39, 5531-5540.

Meharg A. A., Raab A., Schat H., Feldmann J. (2005b): Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): Formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. *New Phytologist*: 168, 551-558.

Meharg A. A., Geng C. N., Zhu Y. G., Hu Y., Williams P. (2006): Arsenate causes differential acute toxicity to two P-deprived genotypes of rice seedlings (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*: 279, 297-306.

Meng, Y.-L., Liu Z., Rosen B. P. (2004): As(III) and Sb(III) Uptake by GlpF and Efflux by ArsB in *Escherichia Coli*. *The Journal of Biological Chemistry*: 279 (18), 18334-18341.

Mitani N., Ma J. F. (2005): Uptake system of silicon in different plant species. *Journal of Experimental Botany*: 56 (414), 1255–1261.

Mitani N., Yamaji N., Ma J. F. (2008): Characterization of substrate specificity of a rice silicon transporter, Lsi1.

Mylona P. V., Polidoros A. N., Scandalios J. G. (1998): Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize . *Free Radical Biology and Medicine*: 25, 576-585)

National Food Authority (1993): Australian Food Standard Code: March, 1993. Australian Govt. Pub. Service, Canberra.

Neal C. R., L'iu, G. J., Zhang X. R., Jain J., Talley J. W. (2006): Stability of inorganic arsenic species in simulated raw waters with the presence of NOM. *Water Science & Technology: Water Supply*: 6, 175-182

Németh-Cahalan K. L., Hall J. E. (2000): pH and Ca^{2+} regulate the water permeability of aquaporin 0. *Journal of Biological Chemistry*: 275, 6777-6782.

Nikolic M., Nikolic N., Liang Y. , Kirkby E. A., Römheld V. (2007): Germanium-68 as an Adequate Tracer for Silicon Transport in Plants. Characterization of Silicon Uptake in Different Crop Species. *Plant Physiology*: 143, 495-503.

Nollert P., Harries W. E. C., Fu D., Miercke L. J. W., Stroud R. M. (2001): Atomic structure of a glycerol channel and implications for substrate permeation in aqua(glycero)porins. *FEBS letters*: 504, 112-117.

Mukhopadhyay R., Rosen B. P. (2002): Arsenate Reductases in Prokaryotes and Eukaryotes. *Environmental Health Perspectives*: 110 (5), 745-748.

Naccache P., Sha'afi R. I. (1974): Effect of PCMBs on water transfer across biological membranes. *Journal of cellular Physiology*: 83, 449-456.

Natoh T., Kairusmee P., Takahashi E. (1989): *Soil Science & Plant Nutrition*: 32, 295-304.

Norton G. J., Lou-Hing D. E., Meharg A. A., Price A. H. (2008): Rice–arsenate interactions in hydroponics: whole genome transcriptional analysis. *Journal of Experimental Botany*: 59 (8), 2267–2276.

Oremland R. S., Stolz J. F. (2003): The ecology of arsenic. *Science*: 300, 939-944.

Oremland R. S., Hoelt R. S., Santini J. M., Bano N., Hollibaugh R. A., Hollibaugh J. T. (2002): Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative,

arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. *Applied and Environmental Microbiology*: 68, 4795-4802.

Pickering I. J., Prince R. C., George M. J., Smith R. D., George G. N., Salt D. E. (2000): Reduction and coordination of arsenic in indian mustard. *Plant Physiology*: 122, 1171-1177.

Pierce M. L., Moore C. B. (1982): Adsorption of arsenite and arsenate on amorphous iron hydroxide. *Water Research*: 16, 1247-1253.

Raab A., Feldman J., Meharg A. A. (2004): The Nature of Arsenic-Phytochelatin Complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. *Plant Physiology*: 134, 1113-1122.

Raab A., Ferreira K., Meharg A. A., Feldmann J. (2007): Can arsenic-phytochelatin complex formation be used as an indicator for toxicity in *Helianthus annuus*? *Journal of Experimental Botany*: 58 (6), 1333-1338.

Rahman M. A., Hasegawa H., Rahman M. M., Miah M. A., Tasmin A. (2008): Straighthead disease induced by arsenic toxicity. *Environmental and Experimental Botany*: 62, 54-59.

Raven J. A. (1983): *Biol. Rev.*: 58, 179-207.

Raven K. P., Jain A., Loeppert R. H. (1999). Arsenite and arsenate adsorption on ferrihydrite: Surface charge reduction and net OH⁻ release stoichiometry. *Environmental Science and Technology*: 33(8), 1179-1184.

Rengel Z. und Quaghebeur M. (2004): Arsenic uptake, translocation and speciation in *pho1* and *pho2* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*: 120, 280-286.

Rengel Z. und Quaghebeur M. (2005): Arsenic speciation governs arsenic uptake transport in terrestrial plants. *Microchimica Acta*: 151, 141-152.

Rhine E. D., Phelps C. D., Koung L. Y. (2006): Anaerobic arsenite oxidation by novel denitrifying isolates. *Environmental Microbiology*: 8, 899-908.

Rosen B. P. (1999): Families of arsenic transporters. *Trends in Microbiology*: 7, 207-212.

Rosen B. P. (2002): Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Letters*: 529, 86-92.

Rosen B. P., Liu Z., Shen J., Carbrey J. M., Mukhopadhyay R., Agre P. (2002b): Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proceedings of the National Academy of Science*: 99 (9), 6053-6058.

Rosen B. P., Liu Z., Styblo M. (2006): Methylarsonous acid transport by aquaglyceroporins. *Environmental Health Perspectives*: 114(4), 527-531.

Rutger J. N., Wengui Y., Dilday R. H., Tai T. H., Gibbons J. W., McNew R. W. (2005): Differential response of rice germplasm to straighthead induced by arsenic. *Crop Science*: 45, 1223-1228.

Samantha G., Chowdhury T. R., Mandal B. K., Biswas B. K., Chowdhury U. K., Basu G. K., Chanda C. R., Lodh D., Chakraborti D. (1999): Flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry for determination of arsenic in water and biological samples from arsenic-affected districts of West Bengal, India and Bangladesh. *Microchemical Journal*: 62, 174-191.

Samanta G., Clifford D. A. (2005): Preservation of inorganic arsenic species in groundwater. *Environmental Science and Technology*: 39, 8877-8882.

Santini J. M., Inskip W. P., Macur R. E., Hamamura N., Warelow T. P., Ward S. A. (2007): Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes. *Environmental Microbiology*: 9(4), 934-943.

Savant N.K., Snyder G.H., Datnoff L.E. (1997): Silicon management and sustainable rice production. *Adv. Agron.*: 58, 151-199.

Schmöger M. E. V., Oven M., Grill E. (2000): Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiology*: 122, 793-802.

Schurr U., Gollan T., Schulze E.-D. (1992): Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap . *Plant, Cell and Environment*: 15, 561-567.

Shaibur M.R., Kitajima N., Sugawara R., Kondo T., Huq S.M.I., Kawai S. (2006): Physiological and mineralogical properties of arsenic-induced chlorosis in rice seedlings grown hydroponically. *Soil Science and Plant Nutrition*: 52, 691-700.

Silver S., Phung L. T. (2005): Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology*: 71, 599-608.

Smedley P., Nicolli H. B., Macdonald D. M. J., Barros A. J., Tullio J. O. (2002): Hydrogeochemistry of arsenic and other inorganic constituents in groundwater from La Pampa, Argentina. *Applied Geochemistry*: 17, 259-284.

Smith E., Kempson I., Juhasz A. L., Weber J., Skinner W. M., Gräfe M. (2009): Localization and speciation of arsenic and trace elements in rice tissues. *Chemosphere* 76, 529-535.

Sneller F. E. C., Van H. L. M., Kraaijeveld-Smit F. J. L., Ten B. W. M., Koevoets P. L. M., Schat H., Verkleij J. A. C. (1999): Toxicity of arsenate in *Silene vulgaris*, accumulation and degradation of arsenate-induced phytochelatins. *New Phytologist*: 144, 223-232.

Spliethoff H. M., Mason R. P., Hemond H. F. (1995): Interannual variability in the speciation and mobility of arsenic in a dimictic lake. *Environmental Science and Technology*: 29, 2157-2161.

Stone R. (2008): Food Safety: Arsenic and Paddy Rice: A Neglected Cancer Risk? *Science*: 321 (5886), 184 – 185.

Subramanian V., Madhavan N., Naqvi S. A. S. (2002): Arsenic in our environment - A critical review. *Environmental hazards in South Asia*, edited by V. Subramanian. Capital Publishing Company, New Delhi (ISBN 81-85589-05-4). S.189-214.
([http://eprints.ictp.it/351/01/Arsenic in Our Environment.pdf](http://eprints.ictp.it/351/01/Arsenic_in_Our_Environment.pdf))

Tajkhorshid E., Jensen M., Schulten K. (2001): The mechanism of glycerol conduction in aquaglyceroporins. *Structure*: 9, 1083-1093.

Tajkhorshid E., Nollert P., Jensen M., Miercke L. J. W., O'Connell J., Stroud R. M., Schulten K. (2002): Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science*: 296, 525-530.

Tajkhorshid E., Jensen M., Park S., Schulten K. (2002b): Energetics of glycerol conduction through aquaglyceroporin GlpF. *Proceedings of the National Academy of Science*: 99, 6731-6736.

Tajkhorshid E., Zhu F., Schulten K. (2002c): Pressure-induced water transport in membrane channels studied by molecular dynamics. *Biophysical Journal*: 83, 154-160.

Tajkhorshid E., Zhu F., Schulten K. (2004): Theory and simulation of water permeation in aquaporin-1. *Biophysical Journal*: 86, 50-57.

Tajkhorshid E., Wang Y., Schulten K. (2005): What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF. *Structure*: 13, 1107-1118.

Tajkhorshid E., Törnroth-Horsefield S., Wang Y., Hedfalk K., Johanson U., Karlsson M., Neutze R., Kjellborn P. (2006): Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*: 439 (9), 688-694.

Takahashi E., Miyake Y. (1977): Proc. Int. Seminar Soil Environ. Fertil. Management Intensive Agric., 603-611.

Takahashi E., Ma J. F., Miyake Y. (1990): The possibility of silicon as an essential element for higher plants. Comments Agric. Food Chemistry: 2, 99-122.

Takamatsu T., Kawashima M., Koyama M. (1985): The role of Mn²⁺-rich hydrous manganese oxide in the accumulation of arsenic in lake sediments. Water Research:19, 1029-1032.

Tamai K, Ma J. F. (2003): Characterization of silicon uptake by rice roots. New Phytologist: 158, 431-436.

Tamaki S., Frankenberger W. T. (1992): Environmental biochemistry of arsenic. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: 124, 79-110.

Tong Y. P., Kneer R., Zhu Y. G. (2004): Vacuolar compartmentalization: A second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. Trends in Plant Science: 9, 7-9.

Törnroth-Horsefield S., Wang Y., Hedfalk K., Johanson U., Karlsson M., Tajkhorshid E., Neutze R., Kjellbom P (2006): Structural mechanism of plant aquaporin gating. Nature: 439 (9), 688- 694.

Tournaire-Roux C., Sutka M., Javot H., Gout E., Gerbeau P., Luu D-T, Bligny R., Maurel C. (2003): Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. Nature: 425, 393-397.

Tsutsumi M. (1980): Intensification of arsenic toxicity to paddy rice by hydrogen sulphide and ferrous iron I. Induction of bronzing and iron accumulation in rice by arsenic. Soil Science and Plant Nutrition: 26, 561-569.

Turpeinen R., Pansar-Kallio M., Haggblom M., Kairesalo T. (1999): Influence of microbes on the mobilization toxicity and biomethylation of arsenic in soil. *Science of the Total Environment*: 236, 173-180.

Tyerman S. D., Bohnert H. J., Maurel C., Steudle E., Smith J. A. C. (1999): Plant aquaporins: Their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Journal of Experimental Botany*: 50, 1055-1071.

Ullrich-Eberius C., Sanz A., Novacky A. J. (1989): Evaluation of arsenate- and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. *Journal of Experimental Botany*: 40, 119-128.

Van der Meer J. R., Baumann B. (2007): Analysis of Bioavailable Arsenic in Rice with Whole Cell Living Bioreporter Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 55, 2115-2120.

Wang J., Zhao F-J, Meharg A. A., Raab A., Feldman J., Mcgrath S. P. (2002): Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiology* 130: 1552-1561.

Wang Y., Schulten K., Tajkhorshid E. (2005): What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF. *Structure*: 13, 1107-1118.

WHO Guidelines for Drinking-Water Quality, 2nd ed.; Geneva 1993: (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs210/en/index.html>), (http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/arsenicun5.pdf).

Williams P. N., Villada A., Deacon C., Raab A., Figuerola J., Green A. J., Feldmann J., Meharg A. A. (2007): Greatly Enhanced Arsenic Shoot Assimilation in Rice Leads to Elevated Grain Levels Compared to Wheat and Barley. *Environmental Science and Technology*: 41, 6854-6859.

Wilkinson S., Corlett J. E., Oger L., Davies W. J. (1998): Effects of Xylem pH on Transpiration from Wild-Type and *flacca* Tomato Leaves. *Plant Physiology*: 117, 703-709.

Wood A. S., Tait C. D., Janecky D. R. (2002): A Raman spectroscopic study of arsenite and thioarsenite species in aqueous solution at 25 °C. *Geochemical Transactions*: 3(4) 31-39.

Wysocki R., Chery C. C., Wawrzycka D., Van Hulle M., Cornelis R., Thevelein J., Tamas M. J. (2001): The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*: 40, 1391-1401.

Xu X. Y. , McGrath S. P., Zhao F. J. (2007): Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. *New Phytologist*: 176, 590-599.

Yamaji N., Ma J.F. (2007): Spatial Distribution and Temporal Variation of the Rice Silicon Transporter Lsi1. *Plant Physiology*: 143, 1306-1313.

Yamaji N., Mitani N., Ma J.F. (2008): A Transporter Regulating Silicon Distribution in Rice Shoots. *The Plant Cell*: 20, 1381-1389.

Yamauchi M., Winslow M. D. (1989): *Plant Soil*: 113, 265-269.

Ye Q., Wiere B., Steudle E. (2004): A cohesion/tension mechanism explains the gating of water channels (aquaporins) in *Chara* internodes by high concentration. *Journal of Experimental Botany*: 55, 449-461.

Zhao F. J., Ma J. F., Meharg A. A., McGrath S. P. (2009): Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*: 181, 777-794.

Zhu F., Tajkhorshid E., Schulten K. (2002): Pressure-induced water transport in membrane channels studied by molecular dynamics. *Biophysical Journal*: 83, 154-160.

8. Literatur

Zhu F., Tajkhorshid E., Schulten K. (2004): Theory and simulation of water permeation in aquaporin-1. *Biophysical Journal*: 86, 50-57.

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hannover, September 2009