

Praktikum
vom 4.09. bis 22.09.2006
im Institut für Evolution und Biodiversität
Münster

1. Einleitung

Kurz vor Beginn meines Studiums hatte ich die Möglichkeit, dieses dreiwöchige wissenschaftliche Praktikum im Institut für evolutionäre Pflanzenphysiologie zu machen – im Fachbereich „Genetik der Pflanzen“ in der Arbeitsgruppe unter Professor Thorsten Reusch.

Diese Gruppe existiert in Münster seit 2006 und erforscht generell den Zusammenhang zwischen der genetischen Variabilität der Pflanzen und der daraus resultierenden Fitness, insbesondere in Bezug auf Selektionsfaktoren wie Klimaänderungen oder Parasiten. Auch die Koevolution zwischen Parasiten und Wirt aufgrund der genetischen Variabilität wird in diesem Zusammenhang untersucht. Einige Mitglieder der Forschungsgruppe führten Versuche dieser Art vorher am Max-Planck-Institut für Limnologie in Plön an Dreistacheligen Stacheln durch (Immunregion MHC). Jetzt sollen Experimente mit Wasserlinsen (insbes. *Lemna minor*) erfolgen, die ihre genetisch bedingte Widerstandsfähigkeit gegenüber Krankheitserregern untersuchen.

2. Grundlagen

2.1. Forschung an *zostera marina*

Schon lange wird erforscht, warum es überhaupt eine geschlechtliche Fortpflanzung gibt, denn immer noch halten viele Forscher deren Vorteile bei Selektion nicht für ausreichend gegenüber der ungeschlechtlichen Vermehrung, die eine weitaus schnellere Verbreitung gewährt und darüber hinaus erlaubt, das Erbgut eines Individuums mit hoher genetischer Fitness unverändert zu bewahren und zu vervielfältigen. Unangefochten spielt jedoch die genetische Vielfalt im Prozess der Evolution die tragende Rolle, die es einer Art erlaubt, auch bei Änderung der Umweltbedingungen zu überdauern. Ist eine Art genetisch verarmt, wird die Gefahr des Aussterbens größer.

Auch für Ökosysteme gilt, dass die Artenvielfalt die Stabilität des Ökosystems beeinflusst. *Zostera marina* – das gemeine Seegras – ist eine euryöke Pflanze, die an allen Küsten der nördlichen Hemisphäre zu finden ist. Dort bildet sie natürliche Monokulturen – die Seegraswiesen, welche die Grundlage für vielfältige Lebensgemeinschaften bilden (Bild rechts).

Nach ökologischen Standpunkten sind Monokulturen anfälliger für Störungen als artenreiche Gemeinschaften. Besonders der inzwischen in immer stärkerem Maße spürbare Klimawandel setzt diese Ökosysteme starkem Stress aus. Die Erhöhung der Wassertemperatur geht schneller



Oben: Seegraswiesen als natürliche Monokulturen sind Grundlage für artenreiche Ökosysteme

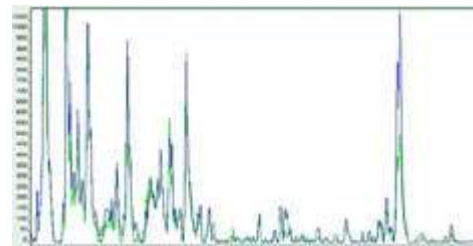
vonstatten als die Mikroevolution, die Arten mit einem Temperaturtoleranzbereich in Richtung höhere Temperaturen begünstigen würde.

Zwei Punkte sind entscheidend: Erstens bilden einzelne Individuen Ausläufer, sodass oft viele Quadratmeter von einem Individuum bewachsen sind. Zweitens ist zu vermuten, dass die Gene, welche die Temperaturtoleranz betreffen, in verschiedenen Verbreitungsgebieten sehr unterschiedlich sind.

Fragmentanalyse

An Punkt eins setzt die Grundlagenforschung an. Individuen sind vom Phänotyp nicht voneinander abzugrenzen. Diese Unterscheidung wird genetisch vorgenommen: In verschiedenen geografischen Gebieten werden Teilflächen zunächst vermessen und in ein geometrisches Raster eingeteilt. Aus jedem dieser Ausschnitte, die jeweils 1m² umfassen, werden Proben entnommen. Nach der DNA- Extraktion und der Amplifikation mittels PCR erfolgt eine Fragmentanalyse durch Mikrosatelliten. Mikrosatelliten sind nichtkodierende, repetitive Regionen der DNA. Man unterscheidet anonyme Mikrosatelliten – d.h. in der Nähe des Satelliten befinden sich keine für die Untersuchung relevanten Gene – und gengebundenen Mikrosatelliten, die sich in unmittelbarer Nähe eines forschungsrelevanten Gens befinden. In diesem Fall ging es zunächst um die Unterscheidung der Individuen, weshalb dies zunächst noch keine Rolle spielte. Man versieht die

Lösung mit Puffer und Primern, die an die Mikrosatellitenregionen binden sollen, und gibt anschließend die DNA- Proben hinzu. Das Fragmentanalysengerät lässt, ähnlich wie bei der Gelelektrophorese, die Fragmente durch Anlegen einer Spannung (hier ca. 12 000V) in Abhängigkeit ihrer Größe in einem Gel laufen – allerdings in Kapillaren sehr geringen Durchmessers (50µm). Am Ende jeder Kapillare sendet ein Laser Fluoreszenzsignale aus und macht am Vorwärtsstrang die Fragmente sichtbar. Die Software übersetzt die Signale mithilfe des Größenstandards (ROX 350), dessen Fragmentlängen bekannt sind. Er ist in den Rohdaten als rote Linie sichtbar. Die Rohdaten wertet man aus, indem man die verschiedenen Peaks – also die Maxima des Graphen – untersucht. Diese müssen eine bestimmte Höhe aufweisen, ansonsten sind sie auf Verunreinigungen zurückzuführen, die durch die PCR mitvervielfältigt wurden. Die Satelliten befinden sich in schon vorher bekannten Größenbereichen, wobei gleichfarbig markierte Bereiche nicht überlappen, so dass man verschiedene Mikrosatelliten gut voneinander unterscheiden kann. Erscheinen im Graphen zwei deutliche Peaks, so ist dieses Individuum in Bezug auf diesen Genlocus heterozygot, sieht man einen Peak, so ist es homozygot. Außerdem ist auch die Position des Peaks innerhalb des für diesen Satelliten typischen Bereichs unterschiedlich. Führt man die Fragmentanalyse mit vielen verschiedenen Mikrosatelliten durch und



Oben: Rohmaterial bei der Auswertung durch Fragmentanalyse; deutlich zu sehen sind die Peaks, also die Loci mit der höchsten Konzentration an bestimmten Fragmenten

wertet die Positionen und Anzahl der Peaks statistisch aus, kann man Aussagen darüber treffen, welches Individuum mit welchem identisch ist oder wie nah verwandt sie miteinander sind.

Dabei erhielt man das Ergebnis, dass räumlich nahegelegene Seegrassbüschel entweder identisch oder nah verwandt sind und die genetische Vielfalt und die Größe der Unterschiede mit der Entfernung zunehmen. Erstaunlich dabei ist, dass dabei die Genbezogenheit offenbar keine Rolle spielt, sondern dass die Variabilität ebenso auf Gendrift zurückgeführt werden kann.

Aktuell wird auch daran gearbeitet, nun die Genregionen, die für die Temperaturtoleranz verantwortlich sind, zu identifizieren und Proben aus verschiedenen geografischen Gebieten ausschließlich daraufhin zu untersuchen.

An Punkt zwei wird aktuell allerdings vor allem ökologisch geforscht. Pflanzen aus verschiedenen geografischen Gebieten werden temperaturbedingtem Stress ausgesetzt, indem die Temperatur für eine bestimmte Zeit um bestimmte Differenzen erhöht wird. Die negativen Auswirkungen sind, wie zu erwarten, für die Pflanzen, die an niedrigere Durchschnittstemperaturen angepasst sind, stärker; diese Populationen erholten sich nicht so schnell. Man wies auch nach, dass genetisch variable Gemeinschaften sich schneller erholten als genetisch arme. Dies zieht auch den praktischen Aspekt nach sich: Man spricht von „Genetic Rescuing“, was bedeutet, dass Seegrasswiesen in Zukunft durch künstliche Erhöhung der genetischen Vielfalt und Ansiedlung temperaturresistenter Arten gerettet werden könnten – und damit auch die von ihnen abhängigen Lebensgemeinschaften.

2.2. Forschungen an *Lemna minor*

Ein wichtiger Aspekt der genetischen Variabilität ist die Resistenz gegen Krankheitserreger und Parasiten. Wirt und Parasiten üben gegenseitig Selektionsdruck aus – der Wirt durch eine stärkere genetisch bedingte Resistenz auf den Parasiten und dieser durch genetische Veränderungen (mit Einfluss auf die Pathogenität) auf den Wirt. Die dabei stattfindende Evolution ist eine Koevolution – die insbesondere dann stattfindet, wenn sich der Parasit auf eine Art spezialisiert.

Für die Forschung relevant ist die Frage, welche Genregionen für die Parasitenabwehr verantwortlich sind und inwiefern hier die Variabilität und die Anzahl von Allelen dabei eine Rolle spielen. Die Forschungen an *Lemna minor* – der Gemeinen Wasserlinse – laufen in diesem Institut erst an. Zunächst muss man herausfinden, welche Arten von Bakterien, Pilzen etc. überhaupt pathogen für die Pflanze sind. Außerdem muss man die Versuchsbedingungen so wählen, dass nicht diese später für unterschiedliches Wachstum verantwortlich sind und damit eventuell Fehlinterpretationen hervorrufen könnten. Die wichtigsten Fragen waren hierbei: Wie wird der Pflanze – abgesehen von der gewollten Infektion mit pathogenen Erregern – ein optimales Nährstoffangebot zur Verfügung gestellt;



und wie kann man ausschließen, dass Wachstumshemmung vielleicht durch andere Parasiten hervorgerufen wird als den beabsichtigten, sprich, die Pflanzen müssen steril gehalten werden, ohne selbst durch die Sterilität beeinträchtigt zu werden.

Sind diese Bedingungen einmal vorhanden und die Erreger identifiziert, wird man beginnen können, die Individuen auf ihre Resistenz hin untersuchen und unterscheiden zu können, wobei man langfristig natürlich auf die entscheidenden Genregionen und die Eigenschaften der Allele abzielt.

Die Gründe, warum man für diese Versuche gerade *Lemna minor* auswählt, sind vielfältig. Erstens gehören die Wasserlinsen zu den kleinsten Blütenpflanzen und sind deshalb für Wissenschaftler interessant, zumal Wasserlinsen sich meistens ungeschlechtlich fortpflanzen und nur in Ausnahmefällen blühen. Deshalb wurde bisher schon oft mit ihnen experimentiert, was Vergleichsmöglichkeiten schafft. Außerdem sind Wasserpflanzen leicht zu züchten und benötigen nicht viel Platz. Darüber hinaus weiß man, dass Mutter- und Tochterblättchen, die sich noch nicht separiert haben, genetisch identisch sind. Da sie unter günstigen Bedingungen weiterwachsen, sich separieren und ihrerseits Tochterblätter ausbilden, ist es möglich, mit wenig Aufwand viele Klone zu erhalten, die genetische Forschung stark vereinfachen und eine ausreichende Datenmenge garantieren. Nicht zuletzt erhält man durch die Blattanzahl ein Maß dafür, ob die Pflanze in ihrem Wachstum beeinträchtigt wird oder nicht.

Die Versuche sind folgendermaßen aufgebaut: Man benutzt Platten mit jeweils 24 zylindrischen Vertiefungen, 6 Spalten und 4 Zeilen. Die erste und vierte Spalte enthalten immer die Negativreihe in Bezug auf das jeweilige Experiment, und mindestens zwei Schalen werden mit denselben Bedingungen versehen, um größere Datenmengen für die statistische Erhebung zu erhalten. Außerdem wurden Proben aus drei verschiedenen geografischen Gebieten vermischt, sodass sie als repräsentativ für die Wasserlinsenflora des Raums Münster gelten kann.

3. Meine Tätigkeit

3.1. Genetisches Arbeiten mit *zostera marina*

Meine erste Aufgabe war es, mich mit den wichtigsten für die Forschungen relevanten Techniken vertraut zu machen, sprich DNA-Extraktion, Gelelektrophorese, PCR und Fragmentanalyse sowie die Auswertung der Rohdaten am Computer.

Da es für das Institut wichtig ist, mit minimalem materiellem Aufwand möglichst viele Proben zu erhalten, werden immer wieder neue Methoden der DNA-Extraktion getestet. Ein Professor, der kürzlich zu Gast im Institut war, schlug eine neue Methode vor, die allerdings bis zum 4.09.2006 noch nicht ausprobiert worden war. Diese Methode sollte ich am ersten Praktikumstag testen – unter Betreuung von Hildegard Schwitte (Labortechnikerin im Institut) und unter Verwendung von konservierten Seegrassproben, deren DNA bereits vorher extrahiert und

analysiert worden war, sodass Vergleichsmöglichkeiten bestanden. Als Vergleichsmöglichkeit diente eine Methode, die bisher häufig erfolgreich angewandt worden war. Wesentliche Unterschiede waren: Bei der alten Methode wurde die Zerkleinerung mit Flüssigstickstoff, Mörser und Stößel durchgenommen, für jeden Waschvorgang wurde außerdem die komplette Menge genommen, der eigentliche Vorgang fand in einzelnen Eppendorfgefäßen statt. Die verwendeten Puffer unterscheiden sich leicht, ihre Funktion ist jedoch dieselbe, ebenso die Reihenfolge, auch die Wasch- und Zentrifugationszeiten unterscheiden sich nicht wesentlich. Die neue Methode zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass dafür nicht einzelne Eppendorfgefäße verwendet werden, sondern 96er-Platten, was eine Arbeit in großem Maßstab vereinfachen würde. Die Zerkleinerung findet in einer dafür vorgesehenen Mühle statt. Nach dem Verdauungsvorgang werden bei dieser Methode nur 10% der Flüssigkeit entnommen, da die einzelnen Vertiefungen der 96er-Filterplatten keine großen Volumina aufnehmen können.

Aufgrund dessen, dass Filterplatten recht teuer sind und nur einmal verwendet werden können, wurden von den 12 Achterspalten nur jeweils die zwei ersten verwendet. Dennoch mussten wir dies mit zwei Filterplatten durchführen, da zu den Schritten wiederholtes Zentrifugieren gehörte, wobei das Gewicht in der Zentrifuge möglichst symmetrisch verteilt sein sollte.

Als ersten Auswertungsschritt wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei waren bei Proben aus der älteren Extraktionsmethode zwar schwache, aber eindeutige Banden erkennbar, womit wir für den weiteren Verlauf der Experimente sichergehen konnten, dass wirklich DNA-Material in den Proben vorhanden war.

Die Ausbeute aus DNA-Extraktionen ist erfahrungsgemäß zu gering, um bei der Fragmentanalyse schon messbare Ergebnisse zu liefern. Deshalb bedient man sich hier der Polymerasekettenreaktion. Diese durchzuführen war meine nächste Aufgabe. Man entnimmt dafür sehr kleine Volumina der Lösung mit der extrahierten DNA und fügt diesen festgelegte Mengen an Nucleotiden, Puffer, Magnesiumchlorid und Primer hinzu. Dann werden die Platten (96er, neue Methode) oder die Eppendorf-Gefäße (alte Methode) in einen programmierten Thermomixer gegeben. Das Temperaturprogramm ist in Anhang A zu finden. Die Arbeit für den Laboranten besteht nur in der Vorbereitung, die eigentliche PCR findet ohne weiteres Zutun im Thermomixer statt.

Außer dem Testen der neuen Extraktionsmethode sollte ich auch lernen, mit der Software des neuen Fragmentanalysegerätes umzugehen. Da die Auswertung der Seegrassproben noch mit dem alten Gert erfolgte, benötigten wir also Vergleichsparameter. Dafür benutzten wir DNA-Proben von denselben Seegrasindividuen wie auch bei der DNA-Extraktion, nur dass diese bereits amplifiziert worden waren und es war bekannt, dass die Ausbeute bei ihnen recht hoch war. Diese bereiteten wir – wie auch die anderen Proben – für die Fragmentanalyse vor. Das Vorgehen dafür habe ich in Anhang B beigefügt.

3.2. Vorbereitende Experimente mit *Lemna minor*

Zu Beginn meines Praktikums war ein Experiment zu den Nährstoffansprüchen von *Lemna minor* bereits seit sechs Wochen am Laufen. Meine Aufgabe war es zunächst, durch Auszählen der Linsen die Wertetabelle zu vervollständigen. Es waren folgende Bedingungen getestet worden: Anzucht auf Leitungswasser, Anzucht, auf Hoaglandmedium (Anhang C) – einmal um 50% verdünnt und einmal unverdünnt, und hierbei wurde noch mal zwischen Wechsel des Mediums alle 3-4 Tage, alle 7 Tage und gar keinem Wechsel unterschieden. Beim Zählen waren alle Blätter gleich zu werten – unabhängig von ihrer Größe. Abgestorbene Blättchen wurden in Klammern vermerkt. Nach diesen sechs Wochen war das Experiment abgeschlossen und wurde ausgewertet. Zu den Ergebnissen werde ich in Punkt 4 kommen.

Um die Parasit- Wirt- Beziehung zu untersuchen, musste zunächst herausgefunden werden, welche Pathogene *Lemna minor* überhaupt befallen. Zu diesem Zweck hatten Gisep Rauch – Wissenschaftler im Institut – und Ilka Dankert (Laborassistentin) Bakterienstämme aus den Pflanzen isoliert. Da manche Bakterien auch symbiontisch mit den Pflanzen leben oder sie zumindest nicht beeinträchtigen, sollte nun die Pathogenität getestet werden. Dabei wurde zur ersten und dritten Zeile der schon mit Hoaglandmedium und *Lemna minor* versehenen Platten (außer in der ersten und vierten Spalte) ein geringes Volumen an Bakterienkultur gegeben (5µl), in die zweite und vierte Zeile ein großes Volumen (200µl). Diese Prozedur wurde mit allen Bakterienstämmen wiederholt (es waren ursprünglich 12, von denen aber nur 11 im Flüssigmedium angewachsen waren).

Hier sollte nach den Ergebnissen der Nährstoffexperimente regelmäßig das Hoaglandmedium ausgetauscht und wöchentlich die Anzahl der Blätter festgestellt werden.

Zwar werden die 24er- Platten für die Wasserlinsen autoklaviert und das Hoaglandmedium durch einen Filter gepresst, bevor die Wasserlinsen hinzugegeben werden, aber bisher wurden diese noch nicht gereinigt, sodass sich Bakterienkulturen auf der Oberfläche befinden konnten, die zur Verfälschung der Pathogenitätsversuche führen würden. Deshalb starteten wir eine weitere Versuchsreihe, indem wir zwei verschiedene Konzentrationen an Chloridbädern herstellten. Diese wurden in autoklavierte 96er- Platten pipettiert und jedes Doppelblatt so eingetaucht, dass es kurz von allen Seiten vom Chloridbad bedeckt war, dann wurden die Blättchen ins Nährmedium überführt. Als Negativprobe dienten Blättchen ohne Chloridbad (1. und 4. Spalte Negativproben, erste und dritte Zeile: niedrige Cl⁻ - Konzentration, 2. und 4. Zeile: hohe Cl⁻ - Konzentration).

4. Ergebnisse

4.1. DNA- Extraktionmethode

Die neue DNA- Extraktionsmethode erwies sich als weniger effizient als die bereits etablierte, was auf einen hohen Verdünnungsfaktor zurückzuführen war. Bei dieser Methode ließen sich deshalb laut Analysengerät auch keine Aussagen über die Eigenschaften der

Genregionen machen. Die wenigen Peaks waren zu niedrig und wahrscheinlich auf Verunreinigungen zurückzuführen. Die Proben der anderen Extraktionsmethode bestätigten dagegen die schon einmal erhaltenen Analyseergebnisse: Die Proben von Individuen, die nah beieinander standen, ähnelten sich in Bezug auf das Fragmentanalysenbild – sie wiesen Übereinstimmungen in Peak- Position und –höhe auf, während diese Laufbilder sich stärker unterschieden, wenn die Wuchsorte weiter auseinander lagen.

4.2. Experimente mit *Lemna minor*

Die Wachstumsexperimente bei Wasserlinsen ergaben, dass diese Pflanzen – wie zu erwarten - auf Nährmedium besser wachsen als auf Leitungswasser, außerdem wirkt sich das Auswechseln des Mediums positiv aus. Der Zeitraum zwischen diesen Wechseln sowie der Verdünnungsgrad des Mediums spielen dabei keine signifikante Rolle; wenn man den Kosten- Nutzenaufwand betrachtet, ist es also günstiger, 50% gelöstes Medium alle 7 Tage zu wechseln. Nachteilig am Nährmedium ist allerdings der starke Parasitenbefall, der in Zukunft durch kurze Chloridbäder der Wasserlinsen reduziert werden soll.

Über die pathogene Wirkung der Bakterien ließ sich noch keine Aussage machen. Dennoch waren schon nach kurzer Zeit leichte Unterschiede sichtbar, die jedoch weiter verfolgt werden müssen. Interessant war, dass immer beim selben Bakterienstamm dichte Pilzrasen auftraten. Es ist möglich, dass diese in Symbiose mit diesen Bakterien leben oder letztere Überträger der Pilzsporen sind.

Über die Folgen der Chloridbäder sowie der Infektion mit den Bakterienstämmen können bis jetzt noch keine eindeutigen Aussagen gemacht werden, da dies einen Zeitraum von sechs bis sieben Wochen erfordert. Es ließ sich jedoch der Trend erkennen, dass einige Bakterienstämme pathogen sind, der Großteil jedoch nicht pathogen wirkt. Das Chloridbad schadete den Wasserlinsen scheinbar nicht. Da dies ein einmaliger Vorgang war und sich in den darauf folgenden Tagen keine negativen Folgen zeigten, ist anzunehmen, dass es sie in ihrem Wachstum nicht wesentlich einschränkt.

5. Bilanz

Die Erwartungen, die ich an das Praktikum stellte, wurden auf jeden Fall erfüllt, wenn nicht sogar übertroffen, da ich zum Beispiel nicht angenommen hatte, an den empfindlichen Geräten des S1- Genlabors selbstständig arbeiten zu dürfen. Außerdem waren die Tätigkeiten sehr abwechslungsreich, obwohl die Arbeitsgruppe noch nicht lange existiert und dementsprechend klein ist. Auch wurde mir sehr viel zu jedem Thema erklärt, und für Fragen waren nicht nur meine Betreuer, sondern alle Mitglieder der Arbeitsgruppe immer offen.

Was ich sehr positiv fand, war, dass die Tätigkeit dieses Instituts nahezu perfekt meinen Berufswünschen entsprach. Besonders die Relevanz genetisch- evolutionärer Forschung in Bezug auf zukünftige

Klimaveränderungen interessierte mich, weil ich selber eine Tätigkeit in der Klimaforschung in Bezug auf ökologische Gemeinschaften anstrebe.

Das Praktikum hat mir zum einen ermöglicht, einen Einblick in die Arbeitsatmosphäre eines Instituts zu bekommen. Zum anderen hat mir in der Praxis bisher eine gewisse Routine gefehlt, was mir besonders während der Biologieolympiade Probleme machte. Inzwischen habe ich durch das häufige und intensive Arbeiten Praxiserfahrung gewonnen, die mir in Zukunft – also in Studium und Job, Praktika und Experimente sicherlich erleichtern wird.

Anhänge

Anhang A

PCR- Temperaturprogramm

- | | | | |
|----|------------------------------------|---------------|------|
| 1. | 3 min. | denaturieren | 94°C |
| 2. | Zyklen: 26 mal folgendes Programm: | | |
| | 1 min | denaturieren | 94°C |
| | 1 min | annealing | 56°C |
| | 1 min | DNA- Synthese | 72°C |
| 3. | 30 min | DNA- Synthese | 72°C |
| 4. | | Pause | 4°C |

Anhang B

Vorbereitung der Fragmentanalyse;

1. Lösung vorbereiten: 98Vol.- % HiDi- Formamid
2 Vol.- % Größenstandard ROX350
2. von dieser Lösung 9µl in jede Vertiefung der Platten pipettieren und 1µl Probe hinzufügen
3. Zentrifugieren, um Luftblasen zu entfernen
4. bei 90°C 2 min denaturieren, danach 5 min in Kühlschrank

Anhang C

Hoaglandsches Medium: zur Herstellung von 1L:

2M KNO ₃	2.5
2 M Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	2.5
Eisen (Chelat)	1.5
2M MgSO ₄ x 7H ₂ O	1
1M NH ₄ NO ₃	1
Spurenelemente	1
(H ₃ BO ₃ , MnCl ₂ x 4H ₂ O, ZnSO ₄ x 7H ₂ O, CuSO ₄ , H ₃ MoO ₄ x H ₂ O, Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O)	
1M KH ₂ PO ₄	0.5

mit aqua dest bis 1 L auffüllen und pH- Wert auf 4 einstellen; autoklavieren und erst anschließend Chelat hinzugeben:

Eisen (Chelat)	1.5
----------------	-----

Quellen:

Prof. Thorsten Reusch,
Gisep Rauch
Hildegard Schwitte,
Ilka Dankert
Plakate und Papers im Institut

Bildnachweis:

http://innovations-report.de/html/berichte/umwelt_naturschutz/bericht-40375.html

<http://spacebio.uni-bonn.de/Projekte/Images/DiffDispl.jpg>

http://de.wikipedia.org/wiki/Lemna_minor