

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Biologisch-Pharmazeutische Fakultät

Max Planck Institut für chemische Ökologie

Chemische Ökologie von Antiherbivoren-Abwehrmechanismen der Pappel



seit 1558

Herbivor- induzierte Emission von Duftstoffen bei der Schwarzpappel
(*Populus nigra*) unter Freilandbedingungen

Bachelorarbeit

zur Erlangung des Grades eines

Bachelor of Science

vorgelegt von

Sandra Lackner

aus Jena

Jena, September 2012

Gutachter:

Dr. Sybille Unsicker

Prof. Dr. habil. Günter Köhler

Inhaltsverzeichnis:

I. Tabellenverzeichnis	4
II. Abbildungsverzeichnis	4
III. verwendete Abkürzungen	5
1. Einleitung	6
1.1. Pflanzliche flüchtige organische Verbindungen	6
1.2. Priming	8
1.3. Proteaseinhibitoren	8
1.4. Zielsetzung	9
2. Material und Methoden	10
2.1. Untersuchungsorganismen	10
2.1.1. <i>Populus nigra</i>	10
2.1.2. <i>Lymantria dispar</i>	10
2.2. <i>Populus nigra</i> Population – Oderinsel Küstrin-Kietz	10
2.3. Versuchsaufbau im Freiland	11
2.3.1. Duftsammlung	11
2.3.2. Blatternte	17
2.4. Bestimmung des Blattflächenverlustes	18
2.5. Analyse der Duftstoffe	19
2.6. Analyse der Proteaseinhibitoren	21
2.7. Analyse der Phytohormone	22
2.8. Statistische Auswertung	24
3. Ergebnisse	25
3.1. Duftsammlung	25
3.2. Schädigung der Blätter	35
3.3. Herbivorie	36
3.4. Spezifische Blattmasse	36
3.5. Aktivität der Proteaseinhibitoren	37
3.6. Phytohormone	39
4. Diskussion	46
4.1. Duftstoffanalyse	46
4.2. Aktivität der Proteaseinhibitoren	48
4.3. Phytohormone	48
4.4. Blockeffekt	49
5. Zusammenfassung	50
6. Literaturverzeichnis	51
7. Anhang	54
8. Selbständigkeitserklärung	60

I. Tabellenverzeichnis

1: zeitliche Aufteilung der Messungen der Receiver	15
2: Übersicht der Inhaltsstoffe	26
3: Ergebnisse lme Duftstoffe	33
4: ANOVA-Übersichtstabelle Duftstoffe	34
5: Ergebnisse lme Proteaseinhibitoren	38
6: ANOVA-Übersichtstabelle Proteaseinhibitoren	38
7: Übersicht Phytohormone	39
8: Ergebnisse lme Phytohormone	44
9: ANOVA-Übersichtstabelle Phytohormone	45

II. Abbildungsverzeichnis

1: ausgewählte flüchtige Verbindungen	7
2: Versuchsindividuum	11
3: Fixierung der Zweige im Feld	12
4: Behandlungen	12
5: Behandlung der Emitteräste	14
6: Pumpenkiste	16
7: Versuchsaufbau im Feld	17
8: Fotoanalyse der Blätter	19
9: GC-MS Chromatogramm	20
10: Model – Befehle in R	24
11: Übersicht der Inhaltsstoffe	27
12: Emissionen in Block 1	28
13: Emissionen in Block 2	29
14: Emission von Trans- β -Ocimen	30
15: Emission von β -Caryophyllen	30
16: Gesamtemission Homoterpene	31
17: Gesamtemission Sesquiterpene	32
18: Schädigung der Blätter	35
19: Korrelation Herbivorie-Duftstoffemission	36
20: spezifische Inhibition	37
21: Übersicht Phytohormone	39
22: aktive Formen JA	40
23: inaktive Formen JA	40
24: Blockeffekt für Jasmonsäure	41
25: Korrelation Herbivorie und Jasmonsäure	41
26: Korrelation Herbivorie und Jasmonsäure für Receiver	42
27: Korrelation Herbivorie und Jasmonsäure für Emitter	43

III. Verwendete Abkürzungen

E-DMNT = (*E*)-4,8-dimethyl1,3,7-nonatrien

CC = Emitter → Kontrolle; Receiver → Kontrolle

CH = Emitter → Kontrolle; Receiver → Herbivor

HC = Emitter → Herbivor; Receiver → Kontrolle

HH = Emitter → Herbivor; Receiver → Herbivor

GC = Gaschromatograph

MS = Massenspektrometer

FID = Flammenionisationsdetektor

ECN = effective carbon number

BSA = Bovines Serum Albumin

IS = Interner Standard

SE = Standardfehler

HPLC = Hochleistungsflüssigkeitschromatograph

SA = Salicylsäure

JA = Jasmonsäure

Ile = Isoleucin

Lme = Linear mixed model

D4-SA = D₄-Salizylsäure

D6-ABA = D₆-Abscisinsäure

D2-JA = 9,10-D₂-9,10-dihydrojasmonsäure

¹³C-JA-Ile = ¹³C₆-Jasmonsäure-Isoleucin-Konjugat

1. Einleitung

1.1. Pflanzliche flüchtige organische Verbindungen

Pflanzen produzieren eine große Menge Verbindungen mit kleinen molaren Massen, die keinen offensichtlichen Einfluss auf die Entwicklung, das Wachstum oder die Reproduktion der Pflanzen haben. Diese Stoffe werden allgemein als sekundäre Metaboliten bezeichnet. Viele dieser Stoffe haben eine wichtige Funktion für die Interaktion der Pflanze mit ihrer biotischen und abiotischen Umwelt, unter anderem auch für die indirekten Verteidigungsmechanismen einer Pflanze. Da Pflanzen sessile Organismen sind und vor potenziellen Angreifern nicht davonlaufen können, haben sie eine breite Palette an chemischen Verteidigungsstrategien entwickelt, die entweder immer präsent sind oder im Falle einer Attacke aktiviert werden können. Hierbei unterscheidet man zwischen direkter Verteidigung, die den Stoffwechsel des Herbivoren direkt beeinflusst [1] und indirekter Verteidigung, die Fressfeinde der Herbivoren anlocken [2]. Zu den Mitteln der indirekten Verteidigung zählen die herbivor induzierte Produktion und Ausschüttung von extrafloralen Nektarien und flüchtigen Verbindungen [3]. Im Rahmen dieser Arbeit stehen flüchtige Verbindungen der Pflanze im Mittelpunkt.

Es ist davon auszugehen, dass diese Form der Verteidigung bereits sehr früh im Verlauf der Evolution aufgetreten ist, da nach van Poecke [4] und Loivamäki [5] auch Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* durch diese Art auf Herbivorie reagieren und sogar Ginkgo Bäume eine ähnliche Form der Induktion zeigen [6]. Die häufigsten Komponenten der emittierten Duftstoffe sind Terpene (C_{10} Monoterpene, C_{15} Sesquiterpene und das C_{11} Homoterpene (*E*)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatrien [*E*-DMNT]) und grüne Blattduftstoffe (C_6 Aldehyde, Alkohole und Ester abgeleitet aus der Spaltung von Fettsäuren durch Lipoxygenase, die den typischen Geruch von geschädigten Blättern verkörpern) [7+8] (siehe Abbildung 1).

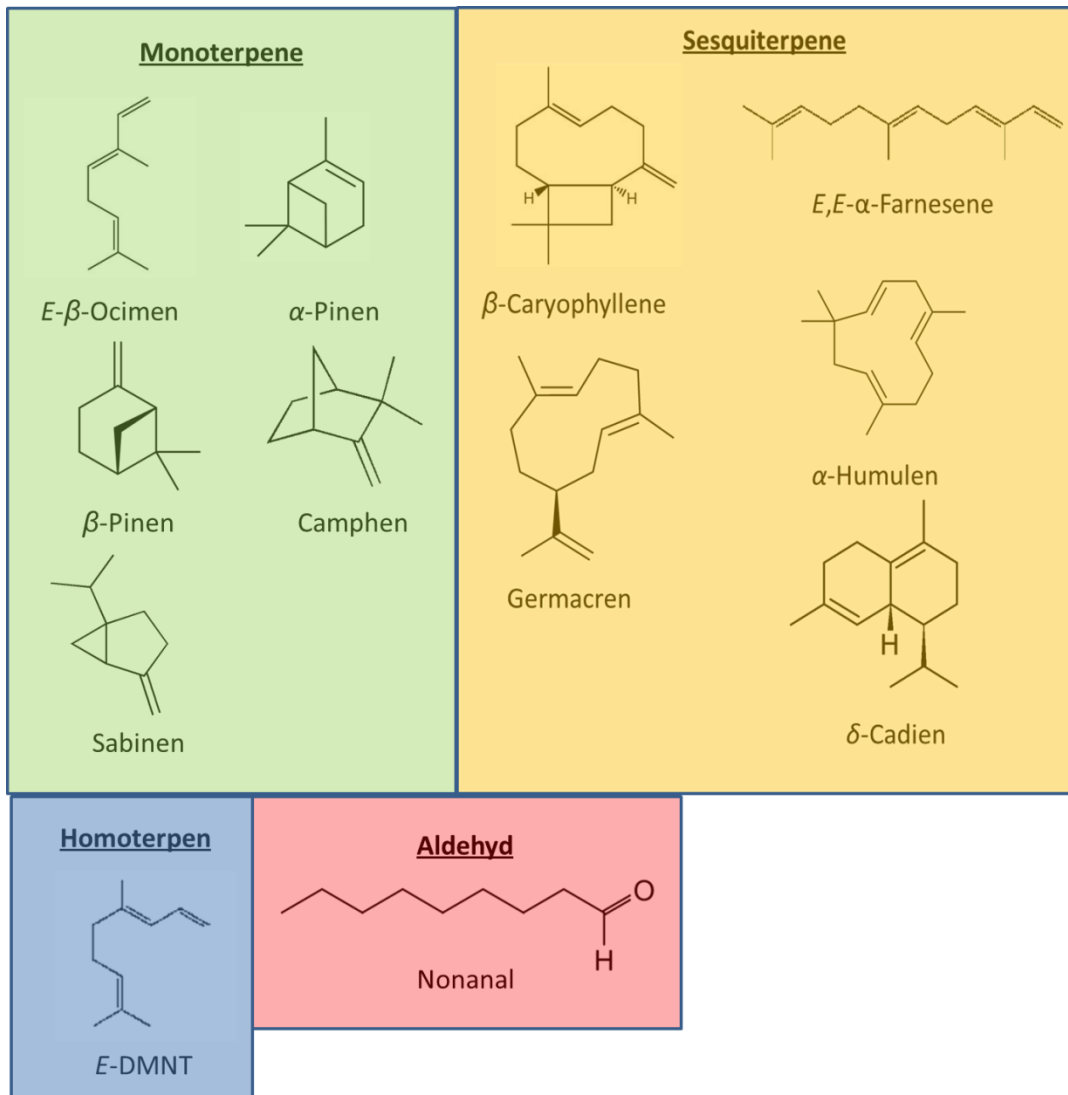


Abbildung 1: ausgewählte flüchtige Verbindungen, die von vielen Pflanzenarten abgegeben werden. Die Stoffgruppen sind farbig unterlegt: grün = Monoterpene, orange = Sesquiterpene, blau = Homoterpen, rot = Aldehyd

Mono- und Sesquiterpene haben eine giftige oder abschreckende Wirkung auf viele Organismen. Der Fingerhut (*Digitalis*) beispielsweise bildet zum Schutz gegen Pflanzenfresser Digitoxin und Digoxin, dabei handelt es sich um Sterolderivate die einen Herzschlag auslösen können [9]. Viele Pflanzenarten emittieren diese Stoffe konstitutiv aber die Menge kann nach einer Schädigung durch Herbivoren stark induziert werden [10]. Viele Studien zeigten, dass flüchtige Terpene karnivore Insekten durch ihre eigene Attraktivität oder das Zusammenspiel mit Pheromonen der Herbivoren anlocken oder als Schlüsselverbindung für andere flüchtige Verbindungen dienen [11].

1.2. Priming

Pflanzenduftstoffe können auch als Signale zwischen und innerhalb einer Pflanze fungieren [12]. Solche Signale können nicht-betroffene Pflanzen oder Stellen einer Pflanze in der näheren Umgebung einer befallenen Pflanze darauf aufmerksam machen, dass Herbivoren in der Nähe sind. Somit kann sich die nicht-betroffene Pflanze auf eine Verteidigung einstellen [13]. Die Pflanze oder die Pflanzenteile die herbivor-induzierten Duftstoffen ausgesetzt waren, werden im Allgemeinen als Receiver (deutsch: Empfänger) bezeichnet. Im Gegenzug dazu werden die emittierenden Pflanzen als Emitter (deutsch: Sender) bezeichnet. Die Receiver-Pflanzen reagieren effektiver auf Herbivorie durch eine erhöhte Produktion von beispielsweise Proteaseinhibitoren [14] und Terpenen [15]. Dieses Phänomen bezeichnet man als Priming. Zunächst sind keine phänotypischen Veränderungen des geprimten Bereichs oder der geprimten Pflanze zu erkennen. Erst nach einer Schädigung durch herbivore Insekten stellt sich bei diesen Pflanzen eine höhere und schnellere Reaktion, als bei nicht geprimten Pflanzen ein. Diese Veränderungen könnten im Falle einer Herbivoren-Attacke zu einem geringeren Schadensausmaß und somit zu einer Erhöhung der Fitness führen [16], da die Verteidigungsmetaboliten erst induziert werden wenn es zu einem tatsächlichen Schaden gekommen ist. Die Pflanze investiert also erst in die Abwehr, wenn diese auch erforderlich ist, dann aber effektiver, als eine nicht geprimte Pflanze.

Die Ausschüttung von Duftstoffen kann sich aber auch negativ auf die Fitness einer Pflanze auswirken. So werden beispielsweise für die Produktion der Verbindungen Nährstoffe und Energie benötigt, die der Pflanze sonst zum Wachstum oder zur Reproduktion zur Verfügung stünden [17].

Dieses Phänomen konnte meist nur im Labor unter kontrollierten Bedingungen beobachtet werden, daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Feldstudie dazu erstellt, mit der Erwartung, dass sich ähnliche Ergebnisse auch im Freiland nachweisen lassen.

1.3. Proteaseinhibitoren

Proteaseinhibitoren sind Proteine die proteinspaltende Enzyme (die Proteasen) hemmen. Somit verhindern oder verzögern sie den Abbau von Proteinen. Die Ausschüttung solcher Inhibitoren (zum Beispiel Inhibitoren der Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin) gehört ebenfalls zu den herbivor-induzierten Abwehrmechanismen der Pflanzen. Die Synthese solcher Stoffe wird durch das

Pflanzenhormon Jasmonsäure gesteuert. Die Produktion von Jasmonsäure wiederum wird durch Elicitoren induziert, das sind Verbindungen die aus der Reaktion von Glutamin (aus dem Speichel angreifender Insekten) mit Fettsäuren aus den zerstörten Plasmamembranen der Pflanzenzellen entstehen. Frisst nun beispielsweise eine Raupe an einem Blatt, so wird die Verdauung der Raupe gehemmt. Das führt dazu, dass die Raupe nicht mehr in der Lage ist wichtige Nährstoffe aufzunehmen, die sie für ihre Entwicklung benötigt [18].

Mit Hilfe der Analyse der Proteaseinhibitoren und der Phytohormone (Jasmonate), der im Feld untersuchten Proben, sollen die Ergebnisse der Duftsammlung untermauert werden.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Das Hauptziel der Arbeit ist zu untersuchen, ob das Priming-Phänomen auch unter Freilandbedingungen zu beobachten ist. Speziell: reagieren Bereiche eines Baumes schneller und mit größerem Ausmaß auf eine Schädigung herbivorer Insekten, wenn in unmittelbarer Nähe bereits eine solche Schädigung stattgefunden hat? Da dieses Phänomen im Labor bereits nachgewiesen wurden ist, kann man davon ausgehen, dass es auch bei Pflanzen im Freiland auftritt. Es soll also nachgewiesen werden, dass experimentell geprimte Bereiche eines Baumes, eine höhere Menge Duftstoffe emittieren, als vorher unbehandelte Bereiche.

Unter der Annahme, dass auch im Freiland Priming stattfindet, sollten die Ergebnisse der Analyse der Proteaseinhibitoren und der Phytohormone ähnliche Muster zeigen. Das heißt die Aktivität der Proteaseinhibitoren sollte in geprimten Bereichen höher sein als in nicht geprimten. Auch die Menge der Pflanzenhormone sollte in geprimten Bereichen höher sein.

2.Material und Methoden

2.1. Untersuchungsorganismen

2.1.1. *Populus nigra*

Die Schwarzpappel, eine Laubbaumart aus der Gattung der Pappeln in der Familie der Weidengewächse (Salicaceae), ist ein typischer Flussbegleiter in den gemäßigten Klimabereichen Europas. Diese Art kommt in größeren Beständen nur noch an den größeren Flüssen wie beispielsweise Rhône, Po, Donau, Elbe, Rhein und Weichsel vor und wird daher in den Roten Listen bundesweit als gefährdet eingestuft. Die Gefährdung besteht vor allem in der Vernichtung des natürlichen Lebensraumes der Pappel und den speziellen Standortansprüchen (lichtreich, warm, gut nährstoff- und wasserversorgt, gut durchlüftete Kies- oder Sandböden [19]).

2.1.2. *Lymantria dispar*

Der Schwammspinner, ein Nachtfalter aus der Unterfamilie der Trägspinner (Lymantriidae) innerhalb der Familie der Eulenfalter (Noctuidae), ist eine in wärmeren Gebieten Europas, Nordafrika, Zentralasiens und den USA weit verbreitete Art und zählt vor allem in den USA zu einem der gefürchtetsten Schädlinge. Bereits einige Tage nach dem Schlupf beginnen die Raupen Löcher in junge Blätter von Baumkronen zu fressen. Ab einem bestimmten Alter können einzelne Blätter aber auch fast vollständig vertilgt werden [20].

2.2. *Populus nigra* – Oderinsel Küstrin-Kietz

Die Untersuchung erfolgte vom 25.06.-28.06.2012 im Naturschutzgebiet „Oderinsel-Küstrin-Kietz“. Das 213 Hektar große Gebiet ist Bestandteil von Natura-2000 und beherbergt eine weitestgehend stabile Schwarzpappelpopulation. Für das Experiment wurde ein weiblicher Genotyp ausgewählt, der schon während intensiver Gewächshausexperimente, im Rahmen der Diplomarbeit von Stefanie Schirmer untersucht wurde (siehe Abbildung 2). Das Alter des Baumes wird auf 60 bis 70 Jahre datiert [21]. Da eine Seite der Baumkrone eher in süd- bis südwestlicher Richtung und die andere Seite eher in nord- bis nordwestlicher Richtung lag, kam es zu einer ungleichen Beleuchtung des Kronenbereiches. Um diese abiotischen Einflüsse auf das Experiment beurteilen zu können, wurde das Experiment in zwei Blöcke aufgeteilt. Block 1 lag eher im schattigen und Block 2 eher im sonnendurchfluteten Teil der Baumkrone.



Abbildung 2: Für die Experimente ausgewähltes Individuum von *Populus nigra* L. auf der Oderinsel Küstrin-Kietz

2.3. Versuchsaufbau im Freiland

2.3.1. Duftsammlung

Es wurden die äußeren Äste der unteren Baumkrone vermessen. Zur Vorbereitung der Sammlung wurden 40 Astpaare ausgewählt, die vaskular zwei Gabelungen entfernt sind, sich aber in räumlicher Nähe befinden (Abbildung 3). Um dies auch unter windigen Bedingungen zu gewährleisten wurden alle Ast Paare mit Hilfe eines Kabelbinders fixiert. Jeweils ein Ast eines Paares wurde als Emitter bestimmt und erhielt eine fortlaufende Nummer von 50 bis 89, der zweite als Receiver und erhielt eine fortlaufende Nummer von 1 bis 40. Es wurden nur die neuen Triebe des Jahres verwendet und zwischen fünf und fünfzehn Blätter behandelt. Vor der Messung erfolgte die Aufteilung der Paare nach vier Behandlungen, wobei jede Behandlung zehnfach vertreten war.

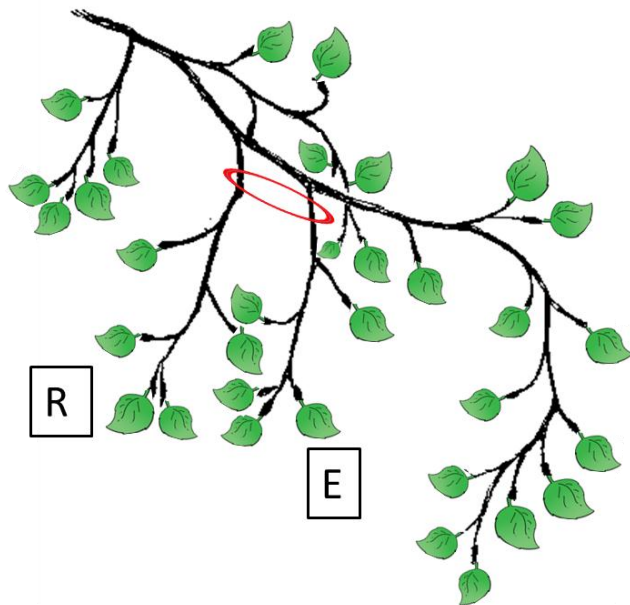


Abbildung 3: schematische Darstellung der Fixierung der Zweige im Feld mit Hilfe eines Kabelbinders (rot); R = Receiver, E = Emitter

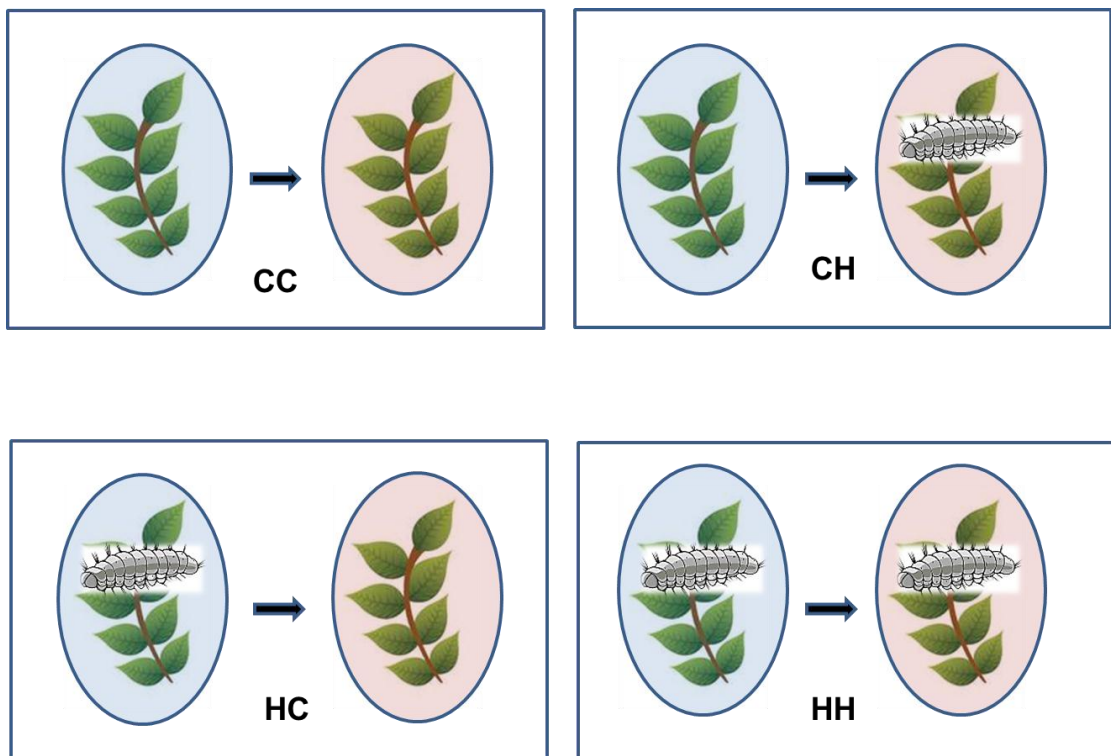


Abbildung 4: schematische Darstellung der Behandlungen. Blau = Emitter, Rot = Receiver, Emitter und Receiver sind jeweils mit einem luft- und lichtdurchlässigem Beutel aus Gaze (Vorhangstoff) dargestellt, die Behandlung von Emitter und Receiver erfolgte nicht gleichzeitig

Die vier Behandlungen sind CC, CH, HC und HH (siehe Abbildung 4), wobei der erste Buchstabe immer für den Emitter und der zweite für den Receiver stehen. Das C steht für Kontrolle, das heißt der Ast wurde nicht behandelt. Das H steht für Herbivorie, diese Äste wurden über einen bestimmten Zeitraum von *Lymantria dispar*-Raupen befallen. Hierfür wurden die ausgewählten Blätter zusammen mit den Raupen mit Hilfe eines Netzes (Drehergewebe, Maschenweite: 1mm²) eingehüllt. Um für etwaige, durch die Beutel auftretende, Veränderungen im Mikroklima zu kontrollieren wurden die Kontroll – Äste ebenfalls mit Gaze bedeckt. Der Versuch wurde in vier Tage aufgeteilt. Am 25. und 26.06. erfolgte die Induktion also die Behandlung der Emitteräste. Am ersten und am zweiten Tag wurden jeweils 20 Äste behandelt. An die Äste der Herbivorie Behandlung wurden je vier Raupen, die sich im fünften Larvenstadium befanden, gesetzt. Um einen größtmöglichen Schaden am Blatt zu verursachen, wurden die Raupen in der vorhergehenden Nacht, über einen Zeitraum von etwa zwölf Stunden, nicht gefüttert. Die Netze mit den Raupen wurden an Tag 3 des Experiments entfernt, das heißt die Emitterblätter wurden über einen Zeitraum von circa 24 Stunden von den Raupen befallen (siehe Abbildung 5).

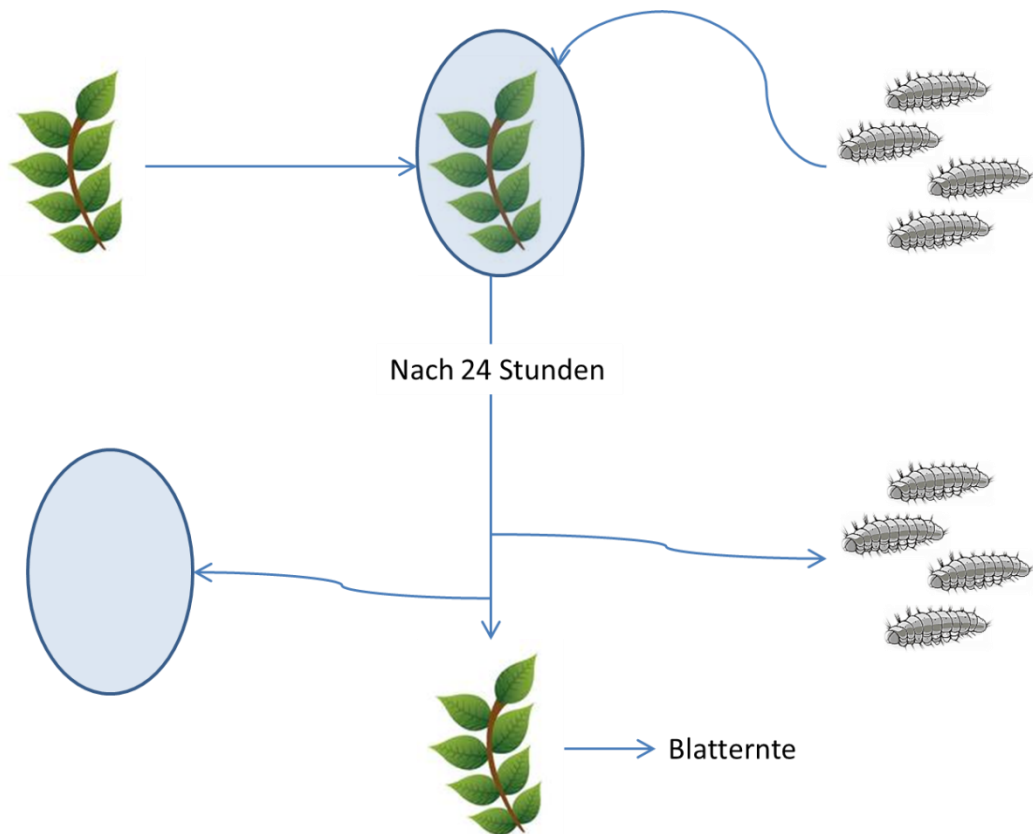


Abbildung 5: schematische Darstellung der Behandlung der Emitteräste am Beispiel einer Herbivorie-Behandlung, zeitlicher Ablauf, Gaze = blau, die Pfeile sind in Pfeilrichtung zu lesen, bspw.: anbringen/entfernen der Gaze und ansetzen/absammeln der 4 Raupen

Die Behandlung der Receiver erfolgte nach dem Absammeln der Raupen von den Emitter Ästen. Hierfür wurden alle Receiver in Plastikbeutel gehüllt. Dafür wurden handelsübliche Bratschläuche (Aroma-Bratschlauch von Toppits, Minden, Deutschland) verwendet, da diese keinen Eigengeruch aufweisen. An alle Receiver die eine Herbivoren Behandlung erfahren sollten, wurden sechs Raupen direkt in die Beutel gesetzt. Die Raupen setzten sich zusammen aus drei Raupen im fünften Larvenstadium, davon wurden jeweils zwei zuvor über circa zwölf Stunden gehungert, und drei Raupen im dritten bis vierten Larvenstadium, die ebenfalls über etwa zwölf Stunden gehungert hatten. Sofort nach dem Ansetzen der Raupen wurden die Receiver Äste drei Stunden lang gemessen. Die Messungen wurden auf Grund der unterschiedlichen abiotischen Verhältnisse in zwei Blöcke aufgeteilt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Zeitlicher Ablauf der Duftsammlungen an den *Populus nigra* Receiver Ästen.

1. Block 27.06.2012			2. Block 28.06.2012		
Zeitpunkt der Messung	gemessene Äste	Behandlung	Zeitpunkt der Messung	gemessene Äste	Behandlung
12.00-15.00 Uhr	1	HH	11.00-14.00 Uhr	21	HH
	2	CH		22	CH
	3	HH		23	CC
	4	HC		24	HC
	5	HH		25	CH
	6	CC		26	CC
	7	HC		27	HH
	8	HC		28	HC
	9	CH		29	CC
	10	CC		30	HH
	11	CC		31	CH
	12	CH		32	HC
16.00-19.00 Uhr	13	HH	15.00-18.00 Uhr	33	CC
	14	CC		34	HC
	15	HC		35	CH
	16	HH		36	CC
	17	HC		37	HH
	18	CH		38	HH
	19	CH		39	HC
	20	CC		40	CH

Für die Messung (siehe Abbildung 6) wurden pro Ast jeweils zwei Pumpen verwendet (Drehschieberpumpe, Model G12/02 EB, Thomas, Memmingen, Deutschland), eine für die Zuluft und eine für die Abluft. Die Pumpen waren über zwei Schläuche einer in jedem Ende des Bratschlauchs, mit dem Luftraum um die Blätter verbunden (Abbildung 7).

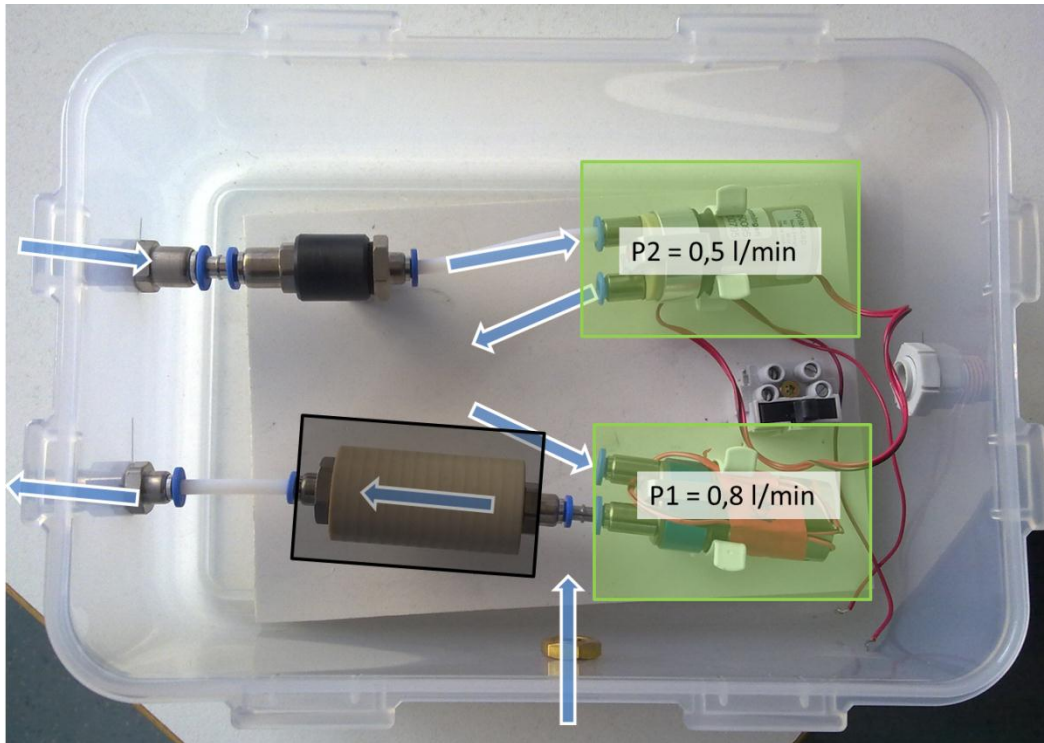


Abbildung 6: Pumpenkiste, grün = P1 und P2, schwarz = Aktivkohlefilter, blaue Pfeile zeigen den Luftstrom an, die Luft wurde durch die Pumpe P1 von außen angesaugt, über einen Aktivkohlefilter gereinigt und anschließend in den Luftraum der Äste geleitet. Mit Hilfe der Pumpe P2 wurde 0,5l/min dem Luftraum der Äste entzogen und durch einen Poropak Filter (nicht im Bild) gezogen (ARS Incorporation FI, USA), die Luftflüsse wurden mit Hilfe eines Flowmeters (nicht im Bild) eingestellt. Beide Pumpen wurden durch eine 12V Batterie betrieben (ebenfalls nicht im Bild).

Der eigentliche Filter befand sich am Ende des Abluftschlauchs, der in dem Bratschlauch steckte. Für das Material des Zuluftschlauchs wurde geruchsneutrales Teflon gewählt.

Nach der Messung wurden die Filter noch vor Ort eluiert, das heißt die Duftstoffmoleküle wurden mit Hilfe des Lösungsmittels Dichlormethan vom Filter gespült. Anschließend wurde das entstandene Eluat in einer Thermobox gekühlt aufbewahrt. Das Eluieren erfolgte in zwei Schritten mit jeweils 100ml Dichlormethan mit internem Standard (Nonylacetat, Konzentration = 10ng/µl). Die Filter wurden immer vor der Duftsammlung und nach der Elution mit reinem Dichlormethan gespült (Dichlormethan und Nonylacetat wurden bei Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland bestellt).

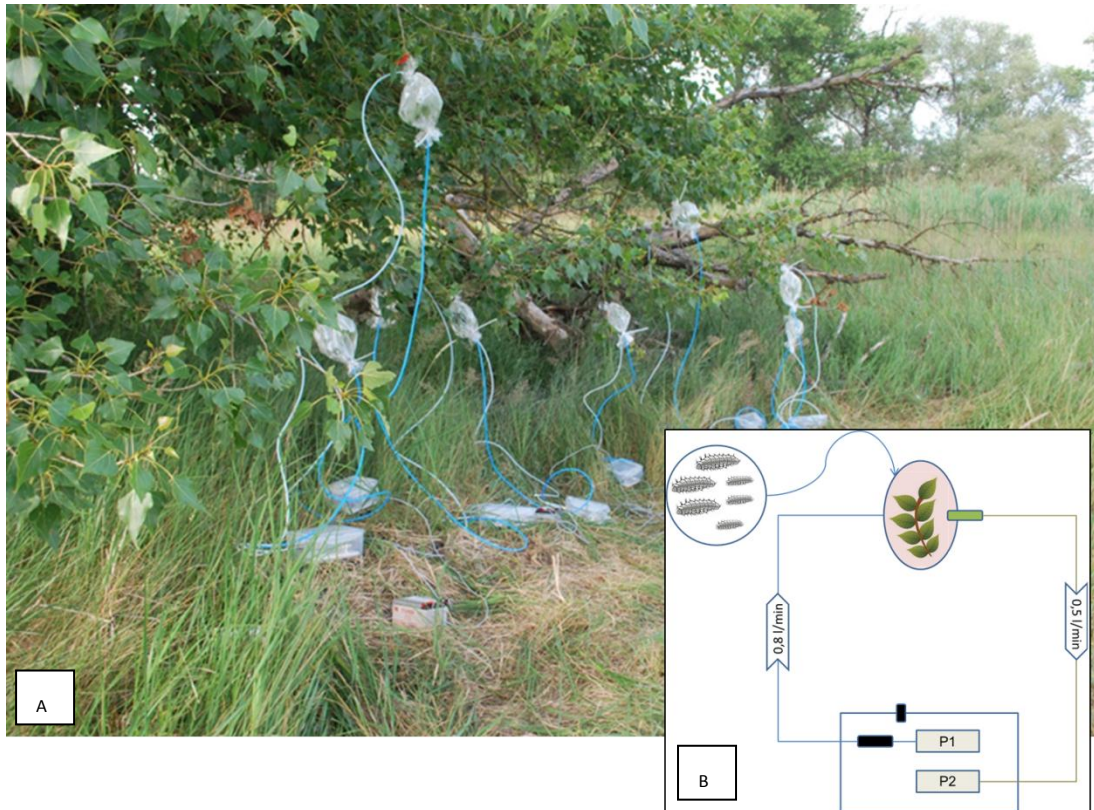


Abbildung 7: A: Versuchsaufbau im Feld, blaue Schläuche = Abluft, weiße = Zuluft; B: Schematischer Aufbau der Messung einer Herbivorie-Behandlung. P1 = Zuluft Pumpe, P2 = Abluftpumpe, Schwarz = Aktivkohlefilter, Grün = Filter für die Duftstoffe; Zuluftstrom: 0,8l/min, Abluft: 0,5l/min; Schläuche: Innendurchmesser: 0,4mm², Außendurchmesser: 0,6mm²

2.3.2. Blatternte

Anschließend wurden alle Äste, sowohl Receiver als auch Emitter, für weiterführenden Untersuchungen (Trockengewichtsbestimmung, Phytohormone, Proteaseinhibitoren) geerntet. Hierfür wurden alle Blätter eines Astes, die eine Behandlung erfahren haben, mit Hilfe einer Schere entfernt. Daraufhin folgte das Fotografieren aller Blätter jedes Astes auf einer Fotoplatte (Abbildung 8B).

Durch die Referenzfläche der Fotoplatte konnten später genaue Aussagen zu den Blattflächen getroffen werden. Die Emitterblätter wurden anschließend zum Trocknen aufgehängt und später im Institut in einem Trockenschrank vollständig getrocknet. Danach wurde mittels einer Waage die Biomasse der Blätter bestimmt. Die Blätter der Receiver wurden noch vor Ort mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren. Im Labor wurden die Blätter in flüssigem Stickstoff zu einem sehr feinen

Pulver gemörsert. Das Pulver wurde in zwei Hälften aufgeteilt. Der erste Teil wurde in einem -80°C Kühlschranks eingefroren und für die Analyse der Proteaseinhibitor Aktivität aufbewahrt. Der zweite Teil wurde für die Analyse von Phytohormonen gefriergetrocknet.

2.4. Bestimmung des Blattflächenverlusts durch Raupenfraß

Im Labor erfolgte dann die Auswertung der digitalen Bilder (Abbildung 8A) mittels Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, California, USA). Mit Hilfe des Zauberstabs (Magic-Wand-Tool) wurden die Pixel der Referenzfläche und der Blattflächen bestimmt und ebenso die Pixel der Fläche des Schadens an den Blättern. Somit konnte eine prozentuale Herbivorie für jedes Blatt und die reelle Blattfläche in cm^2 ermittelt werden. Mit den empirisch bestimmten Massen der Emitterblätter wurde das spezifische Blattgewicht in $\frac{\text{g}}{\text{cm}^2}$ berechnet. Über den Mittelwert der spezifischen Blattmasse aller Emitterblätter konnte auch für die Receiverblätter, die für Proteaseinhibitor- und Phytohormonanalysen bei -80° gelagert werden mussten, die Blattmasse errechnet werden.

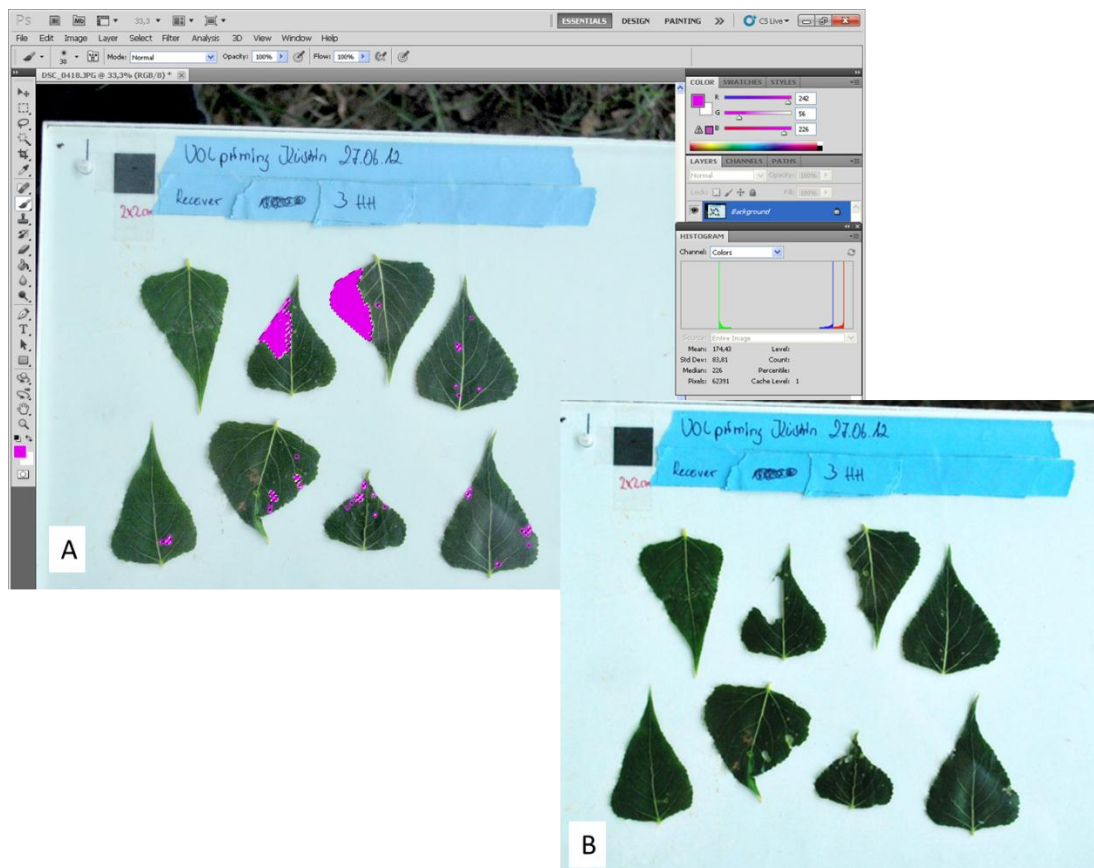


Abbildung 8: A: Foto der Blätter von 3HH in Adobe Photoshop; rosa: rekonstruierte Flächen der geschädigten Blätter; Ausgabe der Pixelanzahl im Histogramm rechts B: Fotoplatte mit allen Blättern des Astes 3HH; obere linke Ecke: Referenzfläche: 2cm² großes schwarzes Quadrat

2.5. Analyse der Duftstoffe

Um die Proben qualitativ und quantitativ bestimmen zu können, wurden sie in einem Gaschromatograph (6890 Serie, Hewlett-Packard, Agilent Technologies, Böblingen Deutschland) mit gekoppeltem Quadrupol-Massenspektrometer (5973 Serie, Hewlett-Packard, Agilent Technologies, Böblingen Deutschland) (kurz GC-MS) (Grenzflächentemperatur: 270°C; Quadrupoltemperatur: 150°C; Quelltemperatur: 230°C, Energie der Elektronen: 70eV) und einem Flammenionisationsdetektor (kurz GC-FID) bei 300°C gemessen (9200 Hydrogen Detektor, Packard, Agilent Technologies, Böblingen Deutschland). Die Komponenten der Proben wurden mit Hilfe einer DB-5MS Säule (Agilent, Santa Clara, CA, USA, 30m×0,25mm×0,25µm) und Helium (MS) oder Wasserstoff (FID), als Trägergas, aufgetrennt. Es wurde jeweils ein Mikroliter jeder Probe, bei einer Anfangstemperatur von 40°C im Ofen, ohne Trennung injiziert. Diese Temperatur wurde anschließend über zwei Minuten

konstant gehalten und anschließend um 7°C pro Minute erhöht bis 155°C erreicht wurden. Danach wurde um 60°C pro Minute auf 300°C erhöht und über drei Minuten konstant gehalten.

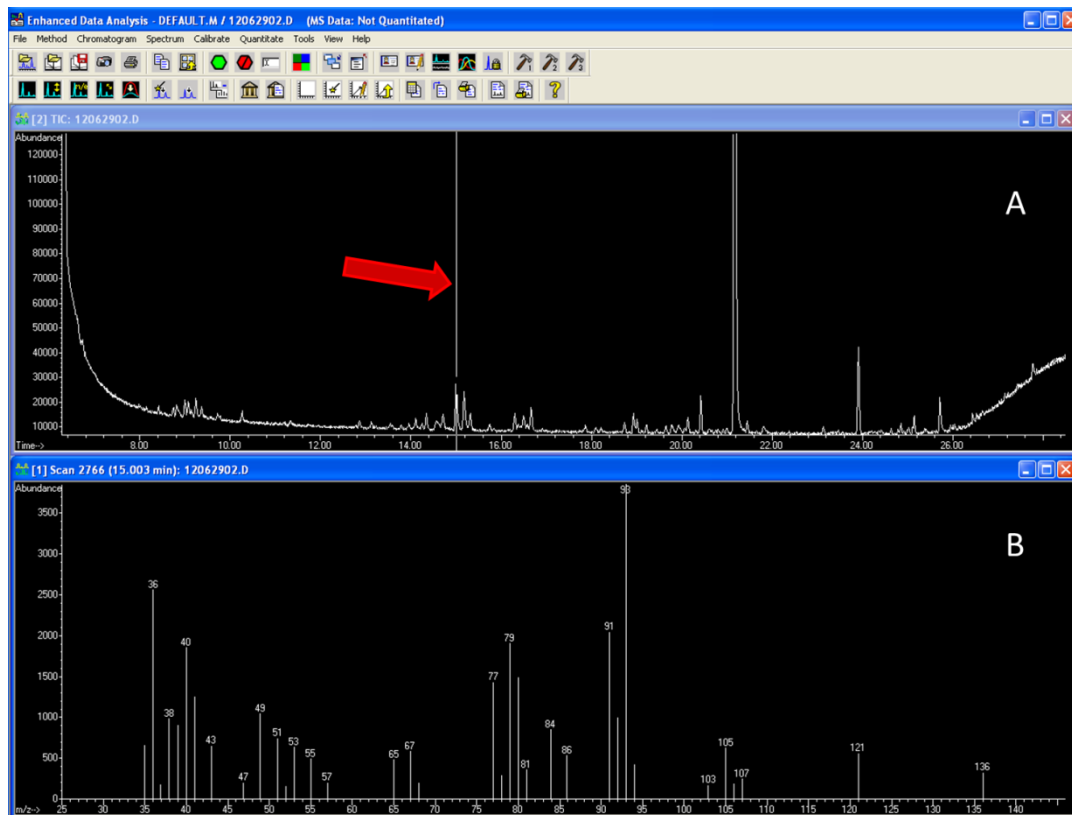


Abbildung 9: A: GC-MS Chromatogramm der Probe 29CC, x-Achse: Retentionszeiten; Cursor (roter Pfeil) auf Peak von Trans- β -Ocimen bei 15min; B: Massenspektrum des Peaks von Trans- β -Ocimen

Um die Komponenten in einer Probe zu identifizieren wurden die Massenspektren der einzelnen Peaks mit Datenbanken (Wiley 275, NIST, ADAMS) verglichen (siehe Abbildung 8). Die absolute Menge der so ermittelten Substanzen konnte nun mit Hilfe der GC-FID-Chromatogramme errechnet werden. Jede Verbindung, die mit Hilfe des Massenspektrometers identifiziert wurde, ist durch einen Peak zu einer bestimmten Retentionszeit im Chromatogramm der GC-MS dargestellt. Durch die Retentionszeiten der einzelnen Stoffe, können diese auch eindeutig zu Peaks in den Chromatogrammen der GC-FID zugeordnet werden. Über die Beziehung der Peakflächen der Stoffe zu der Peakfläche des Internen Standards konnten nun die absoluten Mengen berechnet werden. Diese Kalkulation basiert auf dem „effective

carbon number (ECN) concept“ von Scanion und Willis (1985) [22]. Die Emission der Stoffe in $\frac{ng}{g \times h}$ wurde mit Hilfe folgender Formel durchgeführt:

$$\frac{2000 \times \text{Fläche Analyt} \times \text{Response Faktor}}{\text{Fläche Internerstandard}} \div \text{Biomasse} \times \text{Dauer Messung}$$

Der Response Faktor gibt das Verhalten eines Stoffes zum internen Standard an. Über diesen Faktor kann auch dem Verhältnis der Peakflächen von Analyt und Internem Standard eine Masse errechnet werden. Die Responsefaktoren der gefundenen Stoffe wurden einer experimentell angefertigten Tabelle entnommen (siehe Anhang 1). Die Zahl 2000 ist die Menge des internen Standards, die sich in einer eluierten Probe befindet, dass ergibt sich während der Eluierung der Proben, da zweimal mit 100µl eluiert wurde und die Anfangskonzentration 10ng/µl betrug.

2.6. Analyse der Proteaseinhibitoren

Die Aktivität der Proteaseinhibitoren wurde mittels eines Protokolls bestimmt (siehe Anhang 2).

Vor der eigentlichen Messung wurden die Blätter der Receiver im Flüssigstickstoff zu einem sehr feinen Blattpulver gemörsert. Anschließend wurden 180mg dieses Pulvers mit 1,4ml Extraktionspuffer versetzt und nach fünfminütiger Inkubationszeit zweimal für 10min bei 4°C und 13.200rpm zentrifugiert, wobei das Extrakt nach der ersten Zentrifugierung in ein sauberes 2ml Eppendorf Tube überführt wurde. Die so gewonnenen Extrakte wurden nun nach dem Pipettierschema (siehe Anhang 2) präpariert, um die Proteaseaktivität zu bestimmen. Es wurden jeweils drei technische Replikate von Behandlung, Negativ und Positivkontrolle angesetzt und gemessen. Die so vorbereiteten Proben wurden anschließend im Photometer (Ultrospec 2100pro, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) bei 405nm gemessen. Die Inhibition der einzelnen Proben wurde mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$\text{Inhibition} = \frac{\text{Mittelwert Positivkontrolle} - \text{Abs Behandlung}}{\text{Abs Positivkontrolle} - \text{Abs Negativkontrolle}} \times 100\%$$

Um die Proben besser vergleichen zu können wurde zusätzlich eine Bestimmung der vorhandenen Proteinkonzentration nach Bradford durchgeführt (siehe Anhang 3). Hierfür wurde zunächst mit BSA (Bovines Serum Albumin) Verdünnungen bekannter Konzentration eine Standardkurve erstellt. Dafür wurden 20µl der Standards mit 1ml 1:5 verdünntem Bradfordreagenz über 10min inkubiert. Analog wurden 20µl der Proben mit dem verdünnten Färbereagenz für 10min inkubiert.

Danach wurde die Absorption der Standards und auch die der Proben am Photometer bei 595nm gemessen. Als Referenzwert wurden 20µl Wasser statt der Proben beziehungsweise der Standards eingesetzt und ebenfalls zuvor 10min inkubiert. Mit Hilfe der Funktion der Standardkurve lassen sich die Proteinkonzentrationen der Proben durch die Umrechnung der ermittelten Absorptionswerte über die Regressionsgleichung unter Beachtung des Verdünnungsfaktors von BSA errechnen. Eine Zwei- oder Dreifachbestimmung war nicht möglich, da für einige Proben nicht ausreichend Extrakt zur Verfügung stand.

Die Inhibitionswerte konnten nun mit Hilfe der Proteinkonzentrationen in eine spezifische Inhibition in $\frac{\text{Inhibition}}{\text{mg Protein}}$ umgerechnet werden.

2.7. Analyse der Phytohormone

Die Extraktion der Phytohormone wurde nach dem in Anhang 4 aufgeführten Protokoll durchgeführt. Das im gefrorenen Zustand gemörserte Blattmaterial wurde zunächst gefriergetrocknet und anschließend wurden 10mg des Blattpulvers jeder Probe in Extraktionsgefäße einer 96er Platte (1,4ml Lobarack 96 von Micronics, Aston, USA) eingewogen und eine 3mm Stahlkugel hinzugegeben. Nach Zugabe von 1ml Methanol (welches die folgenden internen Standards enthielt; 40 ng D₄-Salizylsäure [D4-SA], 40ng D₆-Absicinsäure [D6-ABA], 40ng 9,10-D₂-9,10-dihydrojasmonsäure [D2-JA]; 8 ng ¹³C₆-Jasmonsäure-Isoleucin-Konjugat [¹³C-JA-Ile]) wurden die Proben in der 96er Platte zunächst für 30s in einem Probenschüttler (Paint Shaker) homogenisiert. Danach wurde die 96er Platte kurz in vertikaler Position geschüttelt, um eventuelle Pulverreste aus den oberen Bereichen der Extraktionsgefäße zu spülen. Nach dem Zentrifugieren für 1min bei 2000rpm wurden 200µl des Überstandes in eine neue 96er Deepwell-Platte (Platte 1) (2ml, Nunc, Langenselbold, Deutschland) und 400µl in eine zweite Deepwell-Platte (Platte 2) überführt. Anschließend wurden die verbleibenden Pellets der 1,4ml 96er Extraktions-Platten mit 1ml Methanol reextrahiert, erneut im Probenschüttler geschüttelt und zentrifugiert. Je 200µl und 400µl dieses Überstandes wurden in die jeweiligen Platten (1 und 2) hinzu-pipettiert.

Die Quantifizierung der Extrakte in Platte 1 erfolgte an einer HPLC (1260 Infinity, Agilent Technologies, Böblingen Deutschland) mit massenspektrometrischer Detektion an einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (API 5000™LC/MS/MS System, Applied Biosystems). Hierfür wurde eine Zorbax Eclipse XDB-C18 Säule

(50 × 4,6mm, 1,8µm, Agilent) verwendet. Als mobile Phase wurden 0,05%ige (v:v) Ameisensäure (A) und Acetonitril (B) nach folgendem Elutionsprofil eingesetzt: 0-0.5 min, 5% B; 0.5-9.5 min, 5-42% B; 9.5-9.51 min 42-100% B; 9.51-12 min 100% B und 12.1-15 min 5% B. Die Flussrate der mobilen Phase betrug 1,1ml/min. Die Temperatur der Säule wurde über den gesamten Zeitraum konstant bei 25°C gehalten. Die Turbospray-Ionenquelle des Massenspektrometers operierte im negativen Ionisierungsmodus. Die Geräteparameter am Massenspektrometer wurden durch Infusionsexperimente mit Hilfe von reinen Standards optimiert. Während der Detektion wurden eine Ionensprayspannung von -4500eV und eine Turbogastemperatur von 700°C aufrechterhalten. Der Druck des Zerstäubungsgases betrug 60 psi, der des Curtain-Gases 25 psi, des Heizgases 60 psi und des Kollisionsgases 7 psi. Die Detektion der Analyten erfolgte mittels „multiple reaction monitoring (MRM)“, wobei folgende Ionenübergänge verwendet wurden: Precursor-Ion → Product-Ion: m/z 136.9 →93.0 (Kollisionsenergie (CE) - 22V; „Declustering“-Potenzial (DP) -35V) für Salizylsäure; m/z 140.9 →97.0 (CE - 22V; DP -35V) für D4-SA; m/z 209.1 →59.0 (CE -24V; DP -35V) für Jasmonsäure; m/z 213.1 →56.0 (CE -24V; DP -35V) für D2-JA; m/z 263.0 →153.2 (CE -22V; DP -35V) für Abscisinsäure; m/z 269.0 →159.2 (CE -22V; DP -35V) für D6-ABA; m/z 322.2 →130.1 (CE -30V; DP -50V) für Jasmonsäure-Isoleucin-Konjugat; m/z 328.2 →136.1 (CE -30V; DP -50V) für ¹³C-JA-Ile. An den Quadrupolen Q1 und Q3 wurde für die Auflösung „unit resolution“ eingestellt. Die Erfassung und Weiterverarbeitung der Daten erfolgte mittels der Geräte Software Analyst 1.5 (Applied Biosystems). Die Linearität der Effizienz der Ionisierung wurde mit Hilfe der Analyse von Standard-Verdünnungsreihen überprüft. Die Quantifizierung der Phytohormone erfolgte über die Berechnung des Verhältnisses des Signales des Hormone-Analyten zum korrespondierenden Signal des jeweiligen internen Standards. Für 12-oxo-Phytodiensäure (cis-OPDA) wurde D2-JA als interner Standard eingesetzt und der experimentell bestimmte Responsefaktor 2,24 zur Quantifizierung verwendet.

Platte 2 dient als Rückstellprobe.

2.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde hauptsächlich mit Hilfe von RStudio (RStudio, Inc.) durchgeführt. Hierfür wurde das „nlme – Package“ verwendet (Linear and Nonlinear Mixed Effects Models). Für die Auswertung aller Datensätze wurde folgendes Model benutzt:

```
model.lme0 <- lme(X~1, random=~1|block, method="ML")
model.lme1 <- lme(X~block, random=~1|block, method="ML")
model.lme2 <- lme(X~block+herbivory, random=~1|block, method="ML")
model.lme3 <- lme(X~block+herbivory+contact, random=~1|block, method="ML")
model.lme4 <- lme(X~block+herbivory+contact+fras, random=~1|block, method="ML")
model.lme5 <- lme(X~block+herbivory+contact+fras+herbivory:contact, random=~1|block, method="ML")
model.lme6 <- lme(X~block+herbivory+contact+fras+herbivory:fras, random=~1|block, method="ML")
model.lme7 <- lme(X~block+herbivory+contact+fras+contact:fras, random=~1|block, method="ML")
```

Abbildung 10: Model – Befehle in R, X = Verbindung einsetzen, Model 1: Blockeinfluss, 2: Einfluss Herbivorie am Receiver, 3: Kontakt mit Herbivor behandeltem Emitter, 4: Schadensausmaß durch Herbivorie am Receiver, 5: Interaktion Receiverbehandlung und Emitterbehandlung, 6: Interaktion Receiverbehandlung und Fraßschaden, 7: Interaktion Kontakt mit Herbivor behandeltem Emitter und Fraßschaden

Dabei handelt es sich um ein „mixed effect model“. Im Rahmen des Models wurden vier Faktoren und drei Interaktionen zwischen jeweils zwei Faktoren untersucht (siehe Abbildung 10). Das Model wurde so aufgebaut, dass es ausgehend von der einfachsten Annahme (nur ein bestimmender Faktor) von Stufe zu Stufe etwas komplexer wird. Anschließend wurde getestet welches Model am geeignetsten ist und dieses dann mit Hilfe des Befehls „summary(aov(model.lmeX))“ ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Duftstoffe in *Populus nigra*

Insgesamt wurden von der Untersuchten Schwarzpappel im Experiment 12 unterschiedliche Duftstoffe aus 4 Stoffgruppen nachgewiesen (Tabelle 2). Davon je fünf Mono- und Sesquiterpene, ein Homoterpen und ein Aldehyd. Alle Stoffe bis auf Nonanal sind Herbivor induziert. Nonanal ist ein Abbauprodukt von Wachsen und Oberflächenmolekülen. Die Pappelblätter weisen für Trans- β -Ocimen, β -Caryophyllen und Nonanal deutlich höhere Emissionswerte auf, wobei Trans- β -Ocimen die größte Menge der Duftpalette ausmacht.

Die Blätter der Pappel die im ersten Block des Versuchs behandelt und gemessen wurden zeigen jedoch nicht alle Duftstoffe. Hier wurden nur 6 Stoffe aus 4 Stoffgruppen gefunden. Es handelt sich um die Monoterpene Trans- β -Ocimen und Camphen, die Sesquiterpene β -Caryophyllen und α -Humulen, das Homoterpen *E*-DMNT und das Aldehyd Nonanal. Die restlichen Stoffe, α -Pinen, β -Pinen, Sabinen, *E,E*- α -Farnesen, Germacren-D und δ -Cadien wurden nur in den Emissionen der Blätter des zweiten Blocks gefunden oder waren in weniger als fünf Proben des ersten Blocks vertreten.

Tabelle 2: Übersicht aller gefundenen Duftstoffe von *Populus nigra* mit ihrer Gesamtemission in $\text{ng g}^{-1} \text{h}^{-1}$, Angegeben sind Mittelwerte \pm SE für die jeweilige Behandlung

Substanz	Behandlungen			
	CC	CH	HC	HH
<i>Monoterpene</i>				
α -Pinen	9.3 \pm 6.2	8.7 \pm 5.9	12,6 \pm 8,6	26.9 \pm 12
β -Pinen	11.1 \pm 7.4	12.9 \pm 7	17,2 \pm 11,5	29.6 \pm 12.8
Trans- β -Ocimen	762.5 \pm 198.2	406.3 \pm 100.4	775,8 \pm 240,6	1090.3 \pm 395.2
Camphen	34.5 \pm 9.4	18.4 \pm 8.2	31 \pm 13,3	42.5 \pm 18
Sabinen	16 \pm 8.7	44.8 \pm 21.4	31 \pm 18,5	29.1 \pm 10.2
<i>Homoterpene</i>				
<i>E</i> -DMNT	104.9 \pm 36.2	83.1 \pm 25.2	74,9 \pm 20,8	113.5 \pm 34.3
<i>Sesquiterpene</i>				
β -Caryophyllen	356.7 \pm 96.2	222.9 \pm 52.7	409,9 \pm 105,8	485.8 \pm 115.5
α -Humulen	98.2 \pm 46.4	37.5 \pm 22.2	114,1 \pm 45,9	92.8 \pm 37.7
<i>E,E</i> - α -Farnesen	49.8 \pm 28.1	14.5 \pm 14.5	60,5 \pm 40,2	63.6 \pm 56.7
Germacren	8.4 \pm 4.9	0 \pm 0	5,9 \pm 5,9	27.1 \pm 27.1
δ -Cadien	6.1 \pm 4.9	0 \pm 0	2,4 \pm 2,4	14.3 \pm 14.3
<i>Sonstige</i>				
Nonanal	296.1 \pm 80	350.8 \pm 102.4	342,8 \pm 81,7	297 \pm 58.5

Gesamtemission Stoffgruppen

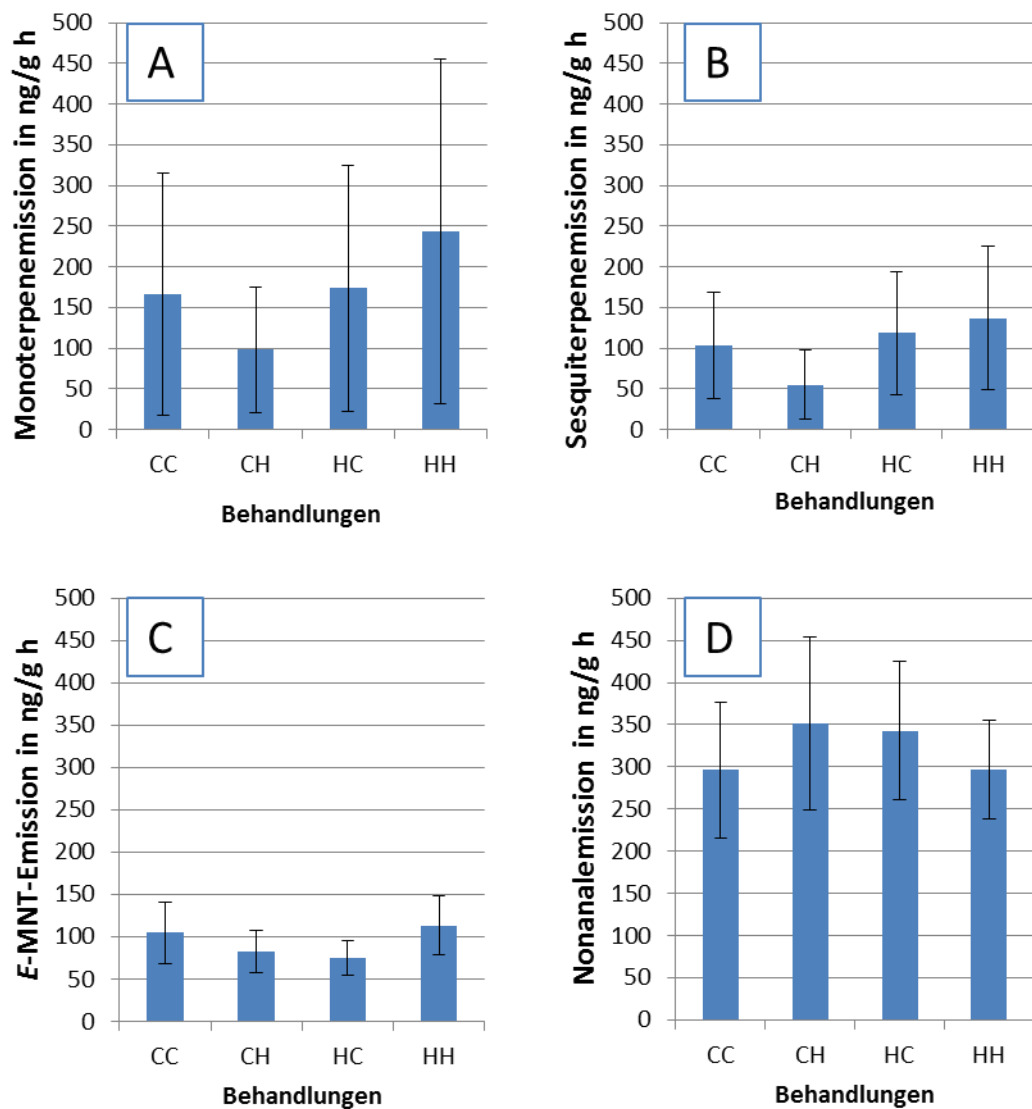


Abbildung 11: Duftstoffemission der Schwarzpappel in den verschiedenen Behandlungen, Übersicht der Duftstoffe, Angabe von Mittelwerten \pm SE für die jeweiligen Behandlungen; A: Monoterpene gesamt; B: Sesquiterpene gesamt, C: Homoterpene *E*-DMNT, D: Nonanal

In den Abbildungen 11A und 11B lässt sich erkennen, dass die Emissionen von Mono- und Sesquiterpenen ein ähnliches Muster aufweisen. Hier emittieren die CH-Behandlungen am wenigsten, die CC- und HC-Behandlungen etwa 1,7x so viel und die HH-Behandlungen etwa 2,5x mehr als die CH-Behandlungen. Die Emission von *E*-DMNT (siehe Abbildung 11C) verläuft dagegen so, dass die Behandlungen CH und HC eine ähnliche Menge emittieren und die Behandlungen CC und HH dagegen einen 1,3x höheren Wert aufweisen. Bei der Emission von Nonanal (siehe

Abbildung 11D) haben dagegen die CC und HH Behandlungen die niedrigsten Werte und die Behandlungen CH und HC emittieren 1,2x so viel. Im Vergleich der Stoffgruppen untereinander fällt auf, dass das Homoterpen *E*-DMNT in einer ähnlichen Menge wie die Sesquiterpene emittiert wird, die Monoterpenemission etwa 1,8x höher ist und die Menge an emittiertem Nonanal sogar teilweise mehr als 2,5x so hoch.

Emission der Stoffgruppen – Block 1

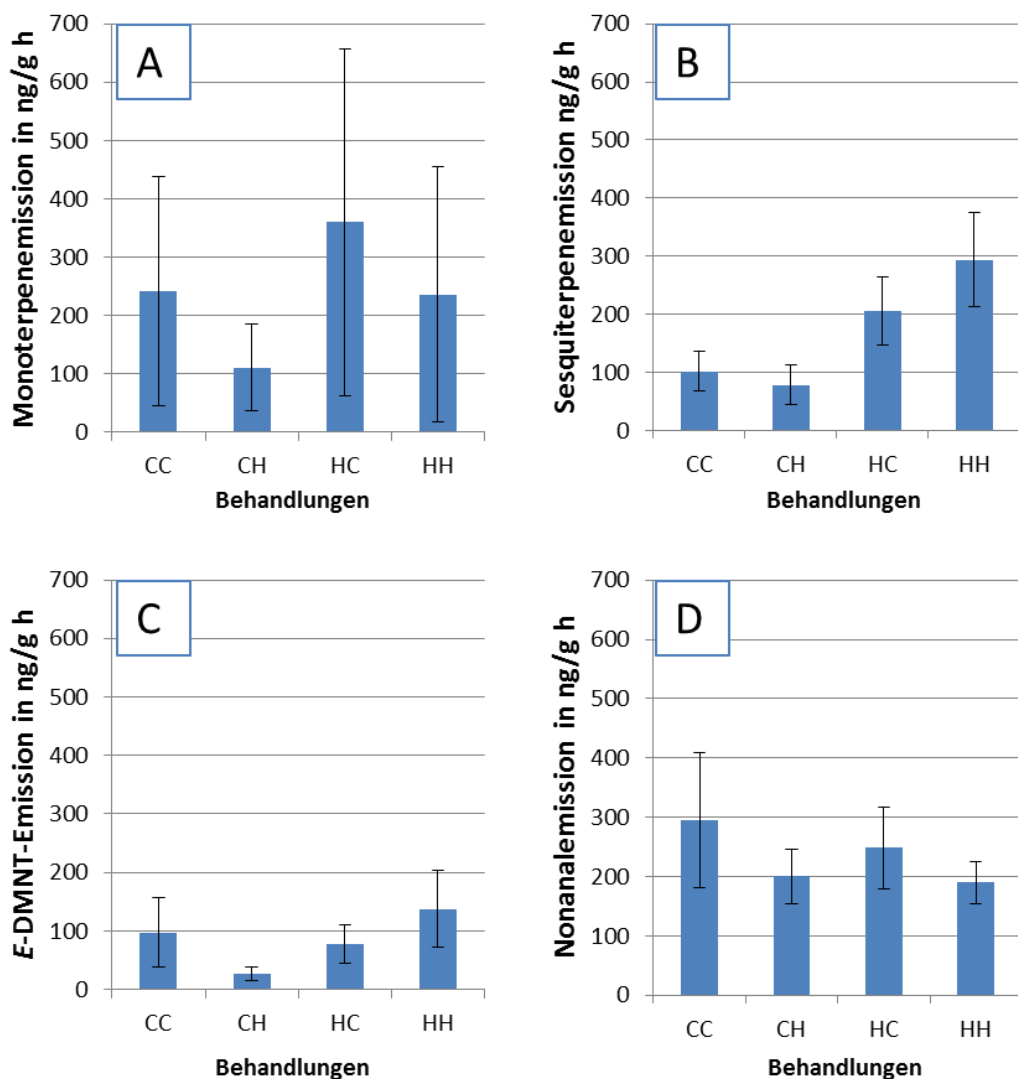


Abbildung 12: Emissionen aller Äste in Block 1, Angabe von Mittelwerten \pm SE für die jeweiligen Behandlungen; A: Monoterpene gesamt, B: Sesquiterpene gesamt, C: Homoterpen *E*-DMNT, D: Nonanal

Emission der Stoffgruppen – Block 2

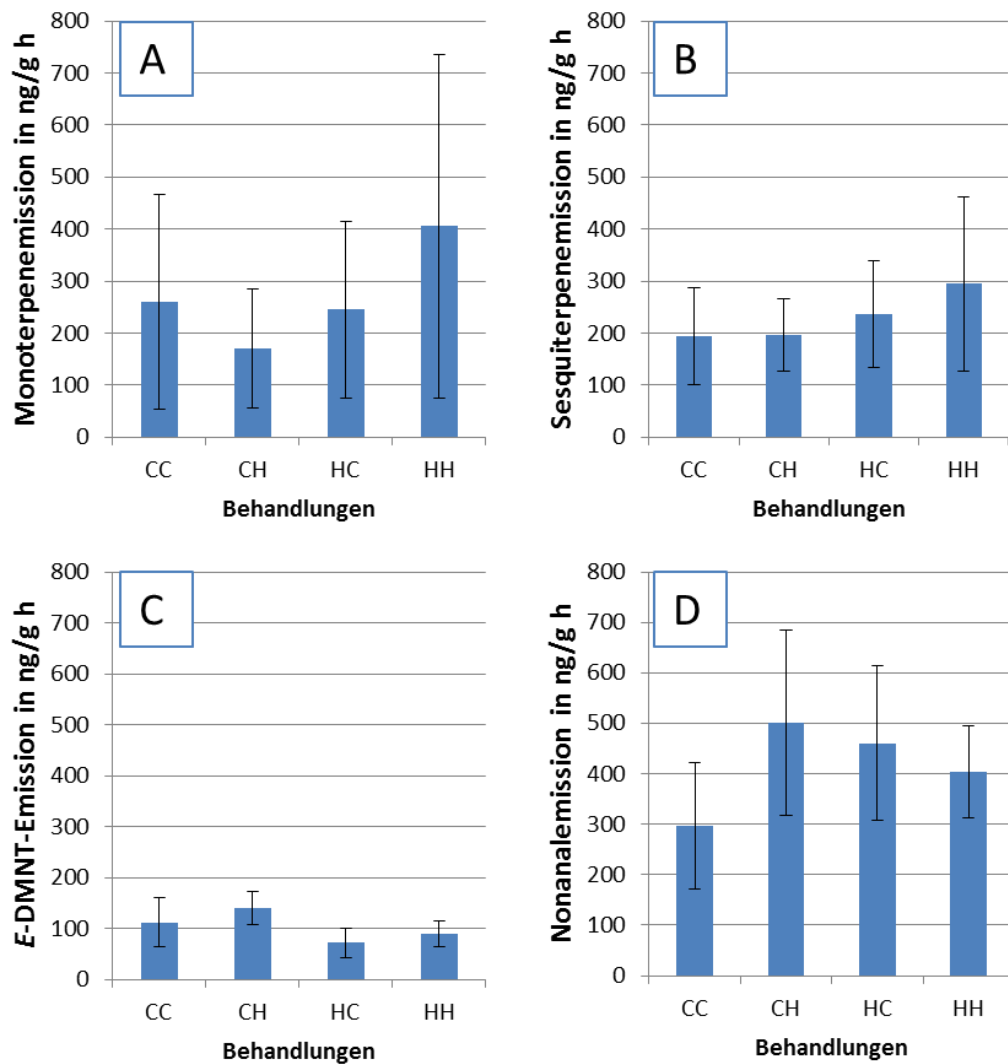


Abbildung 13: Emissionen aller Äste in Block 2, Angabe von Mittelwerten \pm SE der jeweiligen Behandlungen; A: Monoterpene gesamt, B: Sesquiterpene gesamt, C: Homoterpen E-DMNT, D: Nonanal

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen die Aufspaltung des Experiments in zwei Blöcke. Hier fällt auf das die Emissionsmuster im Allgemeinen ähnlich zur Gesamtemission verlaufen, bis auf wenige Ausnahmen wie die hohe Monoterpenemission der HC-Behandlungen im Block 1, die niedrige E-DMNT-Emission der CH Behandlung in Block 1 und die niedrige Nonanal Emission der CH und HC Behandlungen ebenfalls in Block 1. Zusätzlich fällt auf das die Menge der jeweiligen emittierten Stoffe in den

Proben aus Block 2 höher ist als in Block 1. Um dies besser verdeutlichen zu können, wurden für die Stoffe Trans- β -Ocimen und β -Caryophyllen separate Diagramme (siehe Abbildungen 14 und 15) angefertigt.

Trans- β -Ocimen

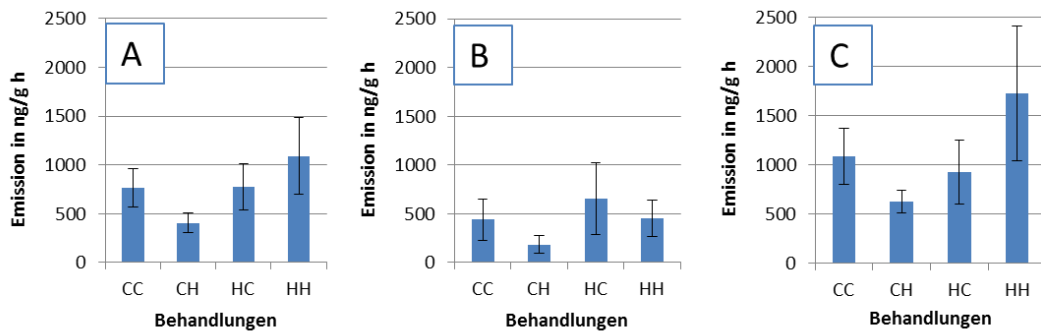


Abbildung 14: Emission von Trans- β -Ocimen, Angabe von Mittelwerten \pm SE für die jeweiligen Behandlungen; A: gesamt, B: Block 1 und C: Block 2

Aus Abbildung 14 geht hervor, dass das Emissionsmuster von Trans- β -Ocimen, dem bereits beobachteten Muster für Monoterpene (Abbildungen 9-11) sehr ähnlich ist. Quantitativ wurde in Block 2 (Abbildung 14 C) etwa doppelt so viel (CC) bis dreimal so viel (CH und HH) Ocimen ausgeschüttet, wie in Block 1.

β -Caryophyllen

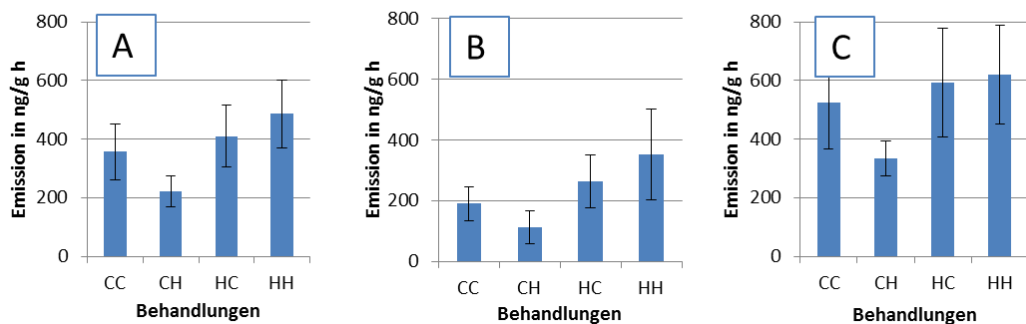


Abbildung 15: Emission von β -Caryophyllen, Angabe von Mittelwerten \pm SE für die jeweiligen Behandlungen; A: gesamt, B: Block 1 und C: Block 2

Auch das Emissionsmuster von β -Caryophyllen gleicht dem bisher beobachteten Muster der Sesquiterpene und auch hier ist die emittierte Menge in Block 2 teilweise (CC) mehr als doppelt so hoch wie in Block 1.

Es folgen die graphischen Darstellungen der übrigen gefundenen Stoffe (Abbildungen 16 und 17). Hieraus wird ersichtlich, dass die α - und β -Pinene eine sehr ähnliche Emission aufweisen, bis auf die niedrigen CC-Werte passt das auch ins bisher beobachtete Emissionsmuster. Camphen und *E,E*- α -Farnesen zeigen ebenfalls ein ähnliches Muster. Die Germacrene und δ -Cadiene zeigen keine Emission für die CH-Behandlungen, passen ansonsten aber ebenfalls ins Bild. Die Sabinen Emission unterschied sich durch relativ hohe CH- und HC-Werte (2x höher als die CC Behandlungen) und die α -Humulene ebenfalls durch einen höheren HC-Wert (etwa 3x höher als die CH Behandlungen) als bisher beobachtet.

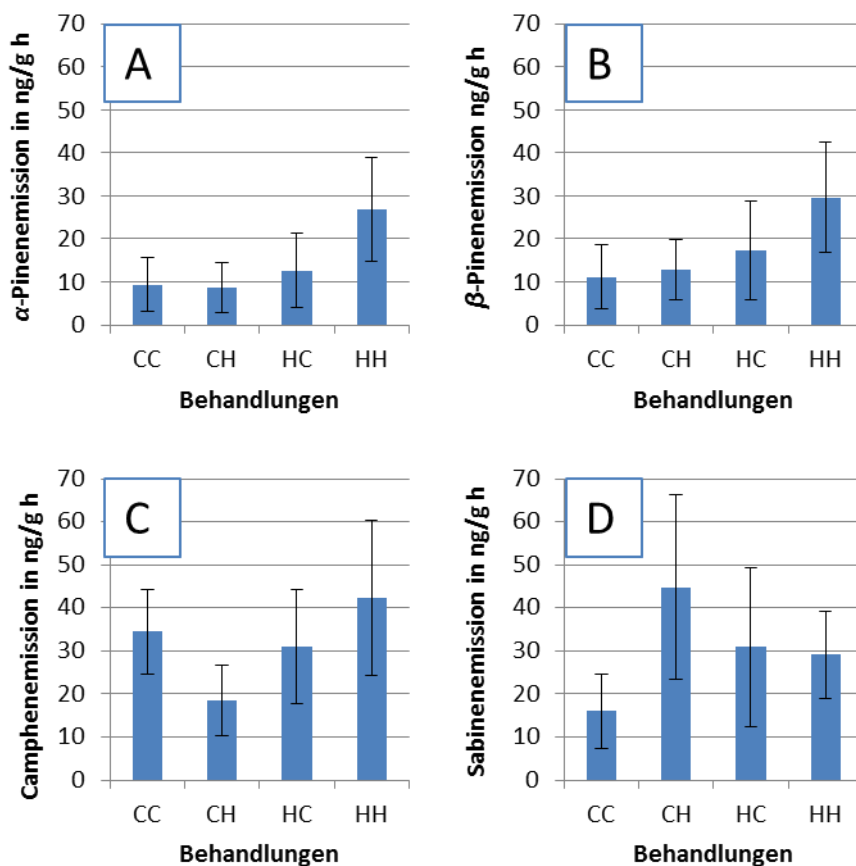


Abbildung 16: Gesamtemission der anderen gefundenen Monoterpenen, Angabe von Mittelwerten \pm SE für die jeweiligen Behandlungen; A: α -Pinen, B: β -Pinen, C: Camphen, D: Sabinen

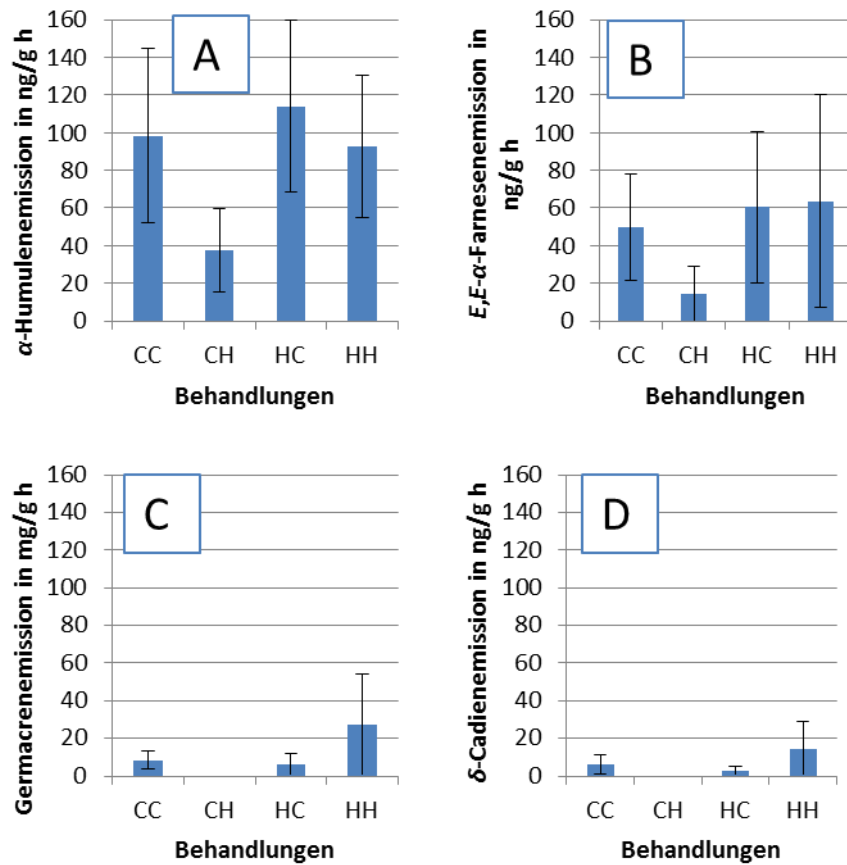


Abbildung 17: Gesamtemission der anderen gefundenen Sesquiterpene, Angabe von Mittelwerten \pm SE für die jeweiligen Behandlungen; A: α -Humulen, B: E,E- α -Farnesen, C: Germacren, D: δ -Cadien

Statistische Auswertung der Duftstoffdaten

Tabelle 3: Ergebnisse des linear mixed effect models für Veränderungen der emittierten Duftstoffe durch den Blockeffekt, Herbivorie am Receiver, Kontakt zu einem herbivor geschädigten Emitter und den Fraßschaden. AIC (Akaike Informationskriterium) und p-Werte beziehen sich auf den Vergleich der einzelnen Modelle

		Blockeffekt		Herbivorie am Receiver		Emitterkontakt		Fraßschaden		Herbivorie × Kontakt		Herbivorie × Fraß		Kontakt × Fraß	
		AIC	p	AIC	p	AIC	p	AIC	p	AIC	p	AIC	p	AIC	p
Gesamt	Trans-β-ocimen	632,7581	0,0292	634,7426	0,9009	634,0835	0,103	631,8869	0,0405	632,4348	0,2282	633,2373	0,4203	633,7973	0,7647
	β-Caryophyllen	552,933	0,0197	554,8658	0,7955	552,6702	0,0405	550,8548	0,0508	551,4429	0,2347	552,0781	0,3781	552,0525	0,3704
	Camphen	394,7305	0,02	369,6973	0,8555	397,5925	0,2932	396,5946	0,0834	397,4498	0,2846	398,3466	0,6184	398,591	0,9521
	E-DMNT	469,8172	0,4757	471,6318	0,6668	473,6267	0,9432	474,6149	0,3145	475,5051	0,2921	476,5888	0,8717	475,8917	0,3951
	a-Humulen	483,404	0,0268	484,0461	0,2439	484,843	0,2727	485,6266	0,2701	487,4197	0,6492	483,8033	0,0505	487,6251	0,9695
	Nonanal	541,9335	0,041	543,9335	0,9651	545,9335	0,9996	547,8611	0,7879	549,2026	0,4171	547,4095	0,1174	548,7349	0,2886
Block 2	Trans-β-ocimen	/		320,6119	0,6972	321,0717	0,2146	316,7403	0,0119	316,4779	0,1325	318,6315	0,7415	317,6883	0,305
	β-Caryophyllen	/		279,2416	0,5811	279,4176	0,1768	277,955	0,0628	279,5918	0,5468	279,8424	0,7372	277,4236	0,1116
	a-Pinene	/		191,9211	0,3749	190,8356	0,079	190,0396	0,0945	191,3124	0,3938	191,9779	0,8038	190,4349	0,2052
	β-Pinene	/		195,874	0,4103	195,018	0,091	195,9614	0,304	197,7594	0,6531	196,7884	0,2788	197,3204	0,4233
	Camphen	/		204,9095	0,6054	205,6887	0,2692	202,3494	0,0208	201,6843	0,1026	204,3443	0,9432	203,4441	0,3414
	Sabinen	/		209,9107	0,2718	211,9078	0,9567	213,0457	0,3532	212,8791	0,141	213,0155	0,1542	214,9107	0,7133
	E-DMNT	/		225,1397	0,5423	225,1844	0,162	225,6184	0,2108	227,4881	0,7181	227,4193	0,6554	227,2638	0,5515
	a-Humulen	/		249,0931	0,4197	250,0017	0,2962	250,2604	0,187	252,1708	0,7646	250,8766	0,2394	251,7437	0,4722
	Farnesen	/		231,84	0,0273	233,793	0,8283	234,208	0,208	235,9663	0,623	227,9284	0,004	235,6251	0,4452
	Germacren	/		155,1778	0,0742	156,9158	0,6087	158,8969	0,8908	160,5662	0,5652	160,8772	0,8883	160,7136	0,6686
	Cadien	/		123,7923	0,12	125,413	0,538	127,2433	0,6803	128,702	0,4619	128,9807	0,6038	129,24	0,9542
	Nonanal	/		276,5206	0,5281	278,4822	0,8447	280,4196	0,8025	281,28	0,2857	279,0045	0,0646	282,2825	0,7112

Tabelle 4: ANOVA-Übersichtstabelle der Receiver für die Effekte des Blocks, der Herbivorie am Receiver, dem Kontakt zu einem herbivor geschädigtem Emitter und dem Fraßschaden. F- und p-Werte beziehen sich auf das Verhalten eines Stoffes zu dem jeweiligen Faktor. Ein p-Wert <0,05 (fett) bedeutet eine signifikante Änderung des Wertes durch den jeweiligen Faktor.

		Blockeffekt		Herbivorie		Kontakt		Fraßschaden		Herbivorie × Kontakt		Herbivorie × Fraß		Kontakt × Fraß	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Gesamt	Trans-β-ocimen	8,5	0,0063	0,0	0,8998	2,7	0,1114	3,9	0,0576	n.s.		n.s.		n.s.	
	β-Caryophyllen	12,3	0,0013	0,1	0,7901	4,3	0,0468	3,5	0,0702	n.s.		n.s.		n.s.	
	Camphen	11,0	0,0022	0,0	0,8588	1,1	0,3116	2,7	0,1085	n.s.		n.s.		n.s.	
	E-DMNT	0,5	0,5020	0,2	0,6860	0,0	0,9467	0,9	0,3512	n.s.		n.s.		n.s.	
	α-Humulen	9,0	0,0051	1,4	0,2498	1,2	0,2859	1,2	0,2906	3,4	0,0742	n.s.		n.s.	
	Nonanal	5,3	0,0273	0,0	0,9676	0,0	0,9996	0,1	0,8030	n.s.		n.s.		n.s.	
Block 2	Trans-β-ocimen	/		0,2	0,6760	1,8	0,2036	5,9	0,0278	n.s.		n.s.		n.s.	
	β-Caryophyllen	/		0,3	0,5800	1,8	0,1981	3,0	0,1038	n.s.		n.s.		n.s.	
	α-Pinene	/		0,9	0,3671	3,1	0,0101	2,4	0,1439	n.s.		n.s.		n.s.	
	β-Pinene	/		0,7	0,0426	2,6	0,1296	0,9	0,3690	n.s.		n.s.		n.s.	
	Camphen	/		0,3	0,5921	1,3	0,2689	4,9	0,0434	n.s.		n.s.		n.s.	
	Sabinen	/		1,0	0,3262	0,0	0,9612	0,7	0,4171	n.s.		n.s.		n.s.	
	E-DMNT	/		0,4	0,5594	1,8	0,2038	1,3	0,2741	n.s.		n.s.		n.s.	
	α-Humulen	/		0,6	0,4480	1,0	0,3398	1,4	0,2488	n.s.		n.s.		n.s.	
	Farnesen	/		6,9	0,0200	0,1	0,8126	1,9	0,1916	n.s.		7,6	0,0152	n.s.	
	Germacren	/		2,8	0,1161	0,2	0,6545	0,0	0,9045	n.s.		n.s.		n.s.	
	Cadien	/		2,1	0,1683	0,3	0,5888	0,1	0,7188	n.s.		n.s.		n.s.	
	Nonanal	/		0,4	0,5599	0,0	0,8564	0,1	0,8176	n.s.		2,8	0,1191	n.s.	

Aus der statistischen Auswertung der Duftstoffdaten geht jedoch hervor, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungen gab. Nur bei den Stoffen β -Pinen und Farnesen lässt sich sicher sagen, dass die Behandlung der Receiver einen signifikanten Effekt auf die Emission dieser Stoffe hatte. Ebenso hatte der Kontakt zu einem herbivor behandelten Receiver nur Einfluss auf die Emission von β -Caryophyllen und α -Pinen. Auch der Einfluss der Größe des durch Herbivore hervorgerufenen Schadens ist nur bei Trans- β -ocimen, Camphen und maginal bei β -Caryophyllen nachweisbar.

Sicher belegbar ist aber, dass ein Blockeffekt (siehe Abbildungen 14 und 15) stattgefunden hat. Außer E-DMNT zeigen hier alle Stoffe einen signifikanten Unterschied.

Für den ersten Block konnte keine Statistik erstellt werden, da zu wenig Werte vorhanden waren.

3.2. Schädigung der Blätter

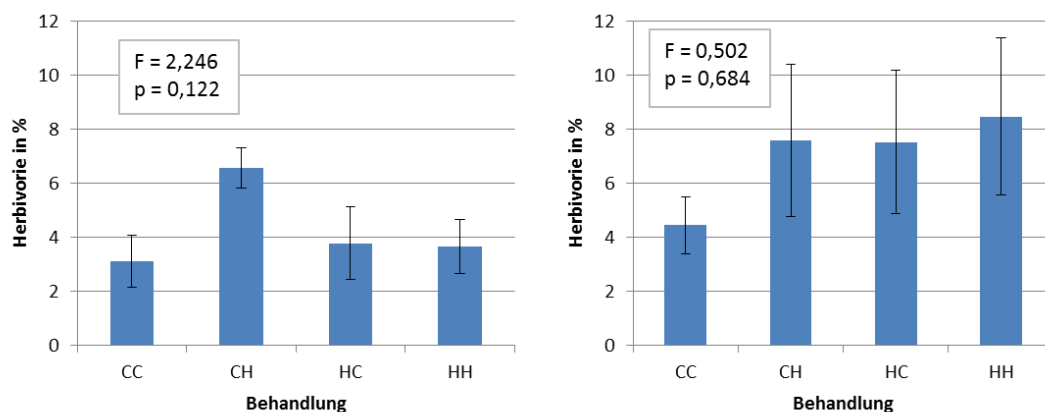


Abbildung 18: Schädigung der Blätter für A = Block 1 und B = Block 2, angegeben sind Mittelwerte \pm SE für die jeweiligen Behandlungen, F- und p-Werte wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA berechnet

Der Vergleich der Behandlungen in Bezug zur Schädigung der Blätter durch Herbivorie zeigt, dass zwischen den Behandlungen keine signifikanten Unterschiede im Schadensausmaß bestehen (siehe Abbildung 18)

3.3. Herbivorie

Um eine Aussage über den Zusammenhang von Blattschädigung und Duftstoffemission treffen zu können wurde für einige Stoffe die prozentuale Schädigung der Blätter gegen die Menge des jeweiligen emittierten Duftstoffs aufgetragen (siehe Abbildung 19). Nach den statistischen Tests zur urteilen gibt es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen diesen Größen. Es ist allerdings ein schwach negativer Trend erkennbar.

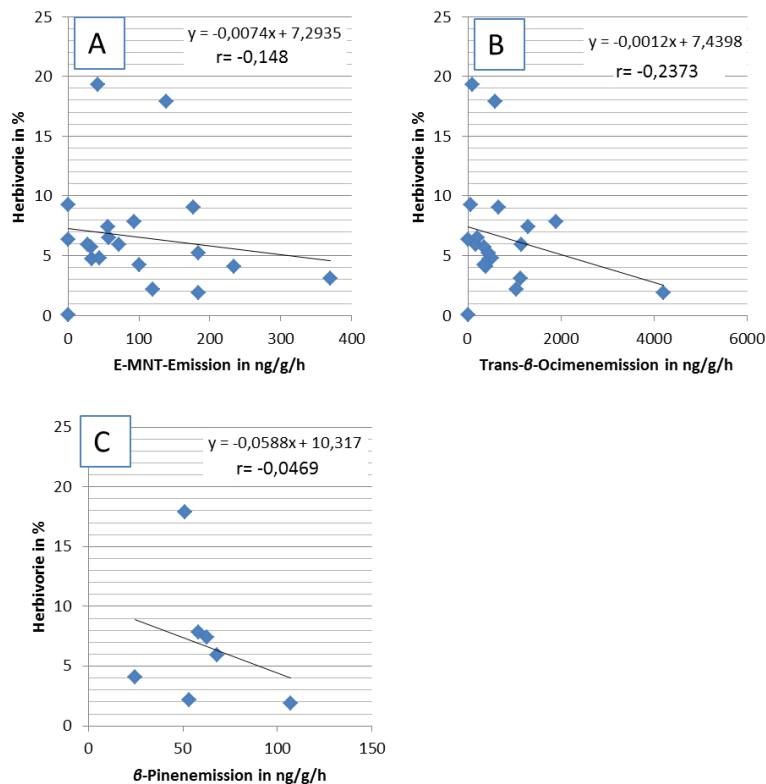


Abbildung 19: prozentuale Schädigung der Blätter durch die *L. dispar*. Raupen zur Menge des jeweiligen emittierten Stoffes in $\text{ng g}^{-1}\text{h}^{-1}$, Angegeben sind Emissionswerte der Herbivoren-Behandlungen (CH und HH), r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

3.4. Spezifische Blattmasse:

Beim Wiegen der Emitterblätter wurde für Block 1 eine durchschnittliche Blattmasse von $8,03 \text{ mg/cm}^2$ und $8,36 \text{ mg/cm}^2$ für Block 2 ermittelt, mit den jeweiligen Standardabweichung von $1,21$ und $1,29 \text{ mg/cm}^2$. Aufgrund dieser geringen Differenz zwischen den zwei Blöcken und den geringen Abweichungen wurden die Blattmassen der Receiver für beide Blöcke mit dem Faktor $8,20 \text{ mg/cm}^2$ ermittelt. Somit ergibt sich für die Massen der Receiverblätter eine durchschnittliche Abweichung von $0,17 \text{ mg/cm}^2$ von der wirklichen Masse der Blätter.

3.5. Aktivität der Proteaseinhibitoren:

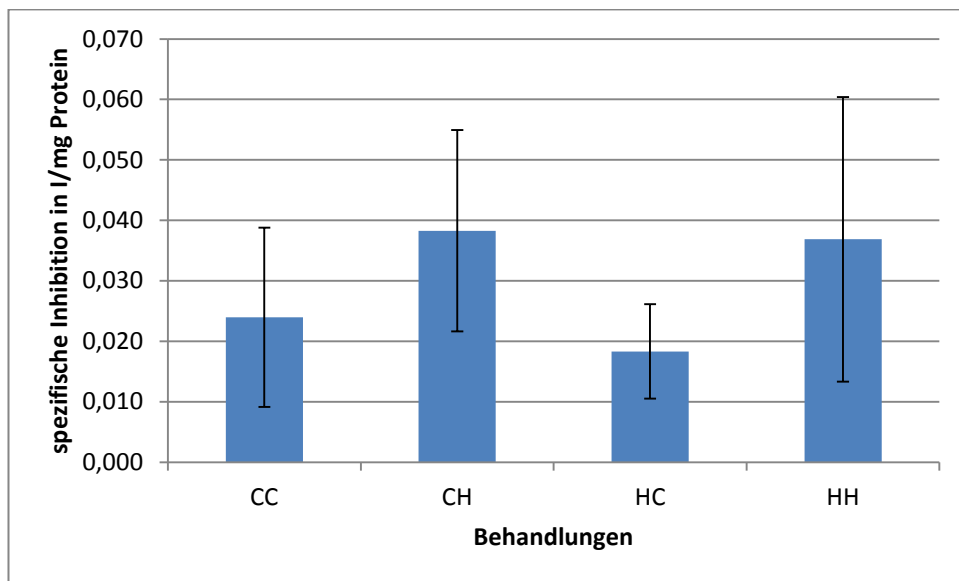


Abbildung 20: spezifische Inhibition der Proben in Inhibition/mg Protein, Angabe von Mittelwerten \pm SE für die jeweiligen Behandlungen

Wie in Abbildung 20 zu sehen, zeigen die CH und HH Behandlungen eine etwa 1,8-fach höhere Aktivität der Proteaseinhibitoren, als bei den Kontrollbehandlungen CC und HC.

Statistische Auswertung der Proteaseinhibitoren

Tabelle 5: Ergebnisse des linear mixed effect models für Veränderungen Aktivität der Proteaseinhibitoren durch den Blockeffekt, Herbivorie am Receiver, Kontakt zu einem herbivor geschädigtem Emitter und den Fraßschaden. AIC (Akaike Informationskriterium) und p-Werte beziehen sich auf den Vergleich der einzelnen Modelle

		Blockeffekt		Herbivorie am Receiver		Emitterkontakt		Fraßschaden		Herbivorie × Kontakt		Herbivorie × Fraß		Kontakt × Fraß	
		AIC	p	AIC	p	AIC	p	AIC	p	AIC	p	AIC	p	AIC	p
gesamt	Inhibition	-113,1	0,6426	-112,6	0,2084	-110,8	0,7071	-109,3	0,4555	-107,4	0,7988	-107,8	0,4799	-107,5	0,6928

Tabelle 6: ANOVA-Übersichtstabelle der Receiver für die Effekte des Blocks, der Herbivorie am Receiver, dem Kontakt zu einem herbivor geschädigtem Emitter und dem Fraßschaden. F- und p-Werte beziehen sich auf das Verhalten eines Stoffes zu dem jeweiligen Faktor. Ein p-Wert <0,05 (fette Zahlen) bedeutet eine signifikante Änderung des Wertes durch den jeweiligen Faktor.

		Blockeffekt		Herbivorie		Kontakt		Fraßschaden		Herbivorie × Kontakt		Herbivorie × Fraß		Kontakt × Fraß	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
gesamt	Inhibition	0,2	0,6578	1,4	0,2395	0,1	0,7257	0,5	0,4891	n.s.		n.s.		n.s.	

Die Statistische Auswertung der Aktivität der Proteaseinhibitoren zeigt, dass keiner der untersuchten Faktoren einen signifikanten Einfluss hat. Somit könnte das zu Abbildung 18 beschriebene Muster völlig zufällig entstanden sein.

3.6. Phytohormone

Die Blätter der Pappel wurden auf 7 Pflanzenhormone getestet: Salizylsäure, Jasmonsäure, Jasmonsäure-Isoleucin-1 und -2 (die aktiven Hormonformen der Jasmonsäure), OH-Jasmonsäure-Ile-1 und -2 (die inaktivierten Hormonformen) und cis-OPDA (der Vorstufe aller Jasmonate). Von Jasmonsäure und Salizylsäure wurden durchschnittlich die höchsten Mengen gefunden.

Tabelle 7: Übersicht aller untersuchten Phytohormone, angegeben sind Mittelwerte \pm SE für die jeweiligen Behandlungen

	Behandlung			
	CC	CH	HC	HH
Salizylsäure	795,5 \pm 84,3	695,8 \pm 123,8	835,3 \pm 100,1	728,1 \pm 108,2
Jasmonsäure	214,7 \pm 53,4	710,3 \pm 308,6	184,8 \pm 53,6	518,9 \pm 206,4
JA-Ile1	8,3 \pm 0,6	16,1 \pm 4,1	8,6 \pm 0,5	13,2 \pm 2,4
JA-Ile2	6,8 \pm 2,6	36,3 \pm 14,3	4,5 \pm 1,3	20,3 \pm 6,8
cis-OPDA	200,9 \pm 43,3	188,4 \pm 15,8	180,4 \pm 30,9	206,4 \pm 36,4
OH-JA-Ile1	5,5 \pm 0,9	13,2 \pm 2,9	6,7 \pm 2	10,5 \pm 2,3
OH-JA-Ile2	221,1 \pm 62,5	341,5 \pm 63,6	243,9 \pm 80,4	277,1 \pm 60,3

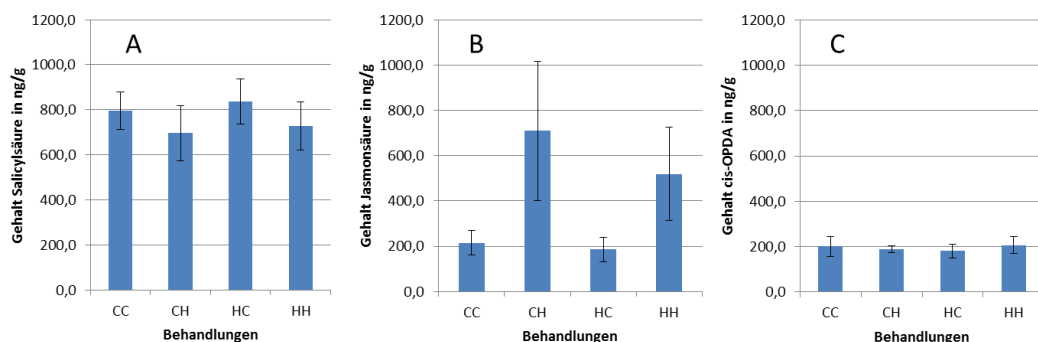


Abbildung 21: Übersicht über die Phytohormone der Schwarzpappel, angegeben sind Mittelwerte \pm SE für die jeweiligen Behandlungen; A = Salizylsäure, B = Jasmonsäure, C = cis-OPDA

Wie in Abbildung 21 ersichtlich zeigen die Salizylsäure und cis-OPDA im Vergleich kein deutliches Muster unter den Behandlungen. Bei der Jasmonsäure hingegen zeigt sich ein deutlicher Unterschied. So ist die Menge an Jasmonsäure in den CH-Behandlungen 3,5 mal höher als in den CC- und HC-Behandlungen. Auch die HH-Behandlungen sind 2,5mal höher. Dieses Muster findet sich mehr oder weniger ausgeprägt auch bei den aktiven und inaktiven Formen der Jasmonsäure (siehe Abbildungen 22 und 23).

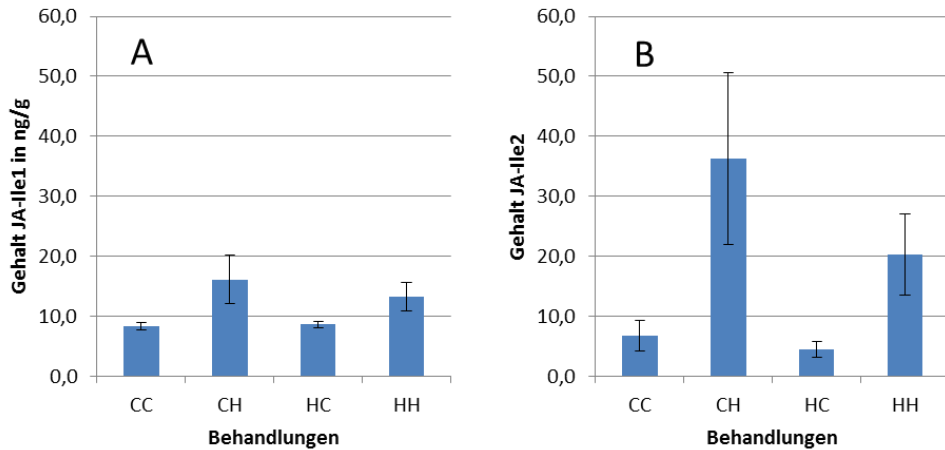


Abbildung 22: Gehalte der aktiven Form Jasmonsäure-Isoleucin-1 (A) und -2 (B), angegeben sind Mittelwerte \pm SE der jeweiligen Behandlungen

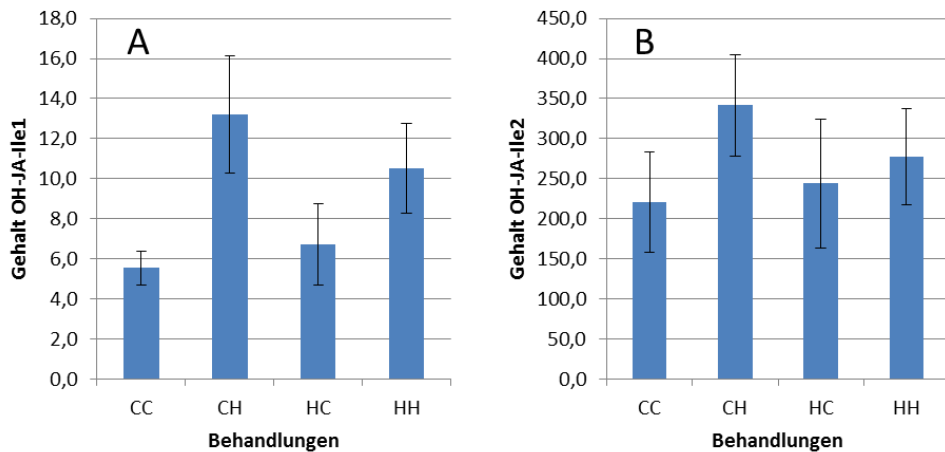


Abbildung 23: Gehalte der inaktiven Formen OH-Jasmonsäure-Isoleucin-1 (A) und -2 (B), angegeben sind Mittelwerte \pm SE der jeweiligen Behandlungen

Bei der aktiven Form JA-Ile-1 und der inaktiven Form OH-JA-Ile-2 ist das beobachtete Muster etwas weniger ausgeprägt. Bei JA-Ile-1 sind die CH-Behandlungen nur 2,0mal höher als die CC- und HC-Behandlungen und die HH-Behandlung nur 1,5mal höher. Bei OH-JA-Ile-2 sind sie nur 1,5 und 1,2mal höher. Die CH-Behandlungen der inaktiven Form OH-JA-Ile-1 sind hingegen 2,4mal und die HH-Behandlungen 1,6mal höher als die CC- und HC-Behandlungen. Bei der zweiten aktiven Form JA-Ile-2 zeigt sich das Muster jedoch am deutlichsten. Hier sind die CH-Behandlung sogar 5,3mal höher als die CC- und HC-Behandlungen, auch die HH-Behandlungen sind 4,5mal höher.

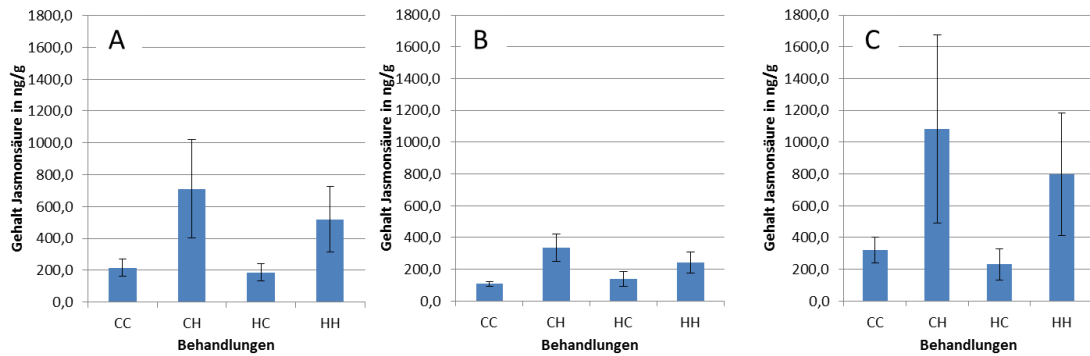


Abbildung 24: Menge Jasmonsäure in den Blättern A = gesamt, B = des 1. Blocks, C = des 2. Blocks, angegeben sind Mittelwerte \pm SE für die jeweiligen Behandlungen

Auch bei der Analyse der Phytohormone zeigt sich ein deutlicher Blockeffekt. So enthalten auch hier die Proben die im zweiten Block behandelt und gemessen wurden eine fast dreimal so hohe Menge an Pflanzenhormonen, wie die die im ersten Block gemessen wurden.

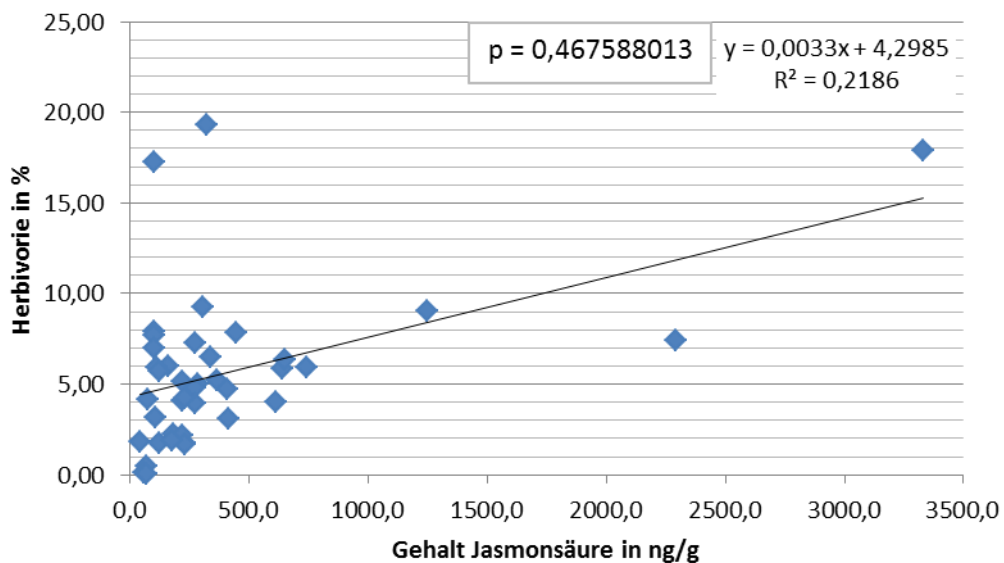


Abbildung 25: prozentuale Schädigung der Blätter durch die *Lymantria dispar* Raupen zur Menge der Jasmonsäure in den Blättern, angegeben sind Werte der Herbivoren-Behandlungen (CH und HH), r = Korrelationskoeffizient nach Pearson, R^2 = Bestimmtheitsmaß

Aus der Abbildung 25 lässt sich ein positiver Trend zwischen der Menge des Phytohormons Jasmonsäure und dem Maß der Schädigung der Blätter durch Herbivorie erkennen, das heißt je höher die Schädigung des Blattes desto mehr Jasmonsäure wurde synthetisiert.

Veranschaulicht man sich Abbildung 25 so, dass ersichtlich wird welche Proben mit *L. dispar* Raupen behandelt wurden (siehe Abbildung 26), dann wird ersichtlich, dass die Blätter die behandelt wurden deutlich mehr Jasmonsäure gebildet haben als die unbehandelten. So ist der Gehalt an Jasmonsäure der unbehandelten Blätter nur sehr schwach korreliert und der der behandelten hingegen deutlich positiv.

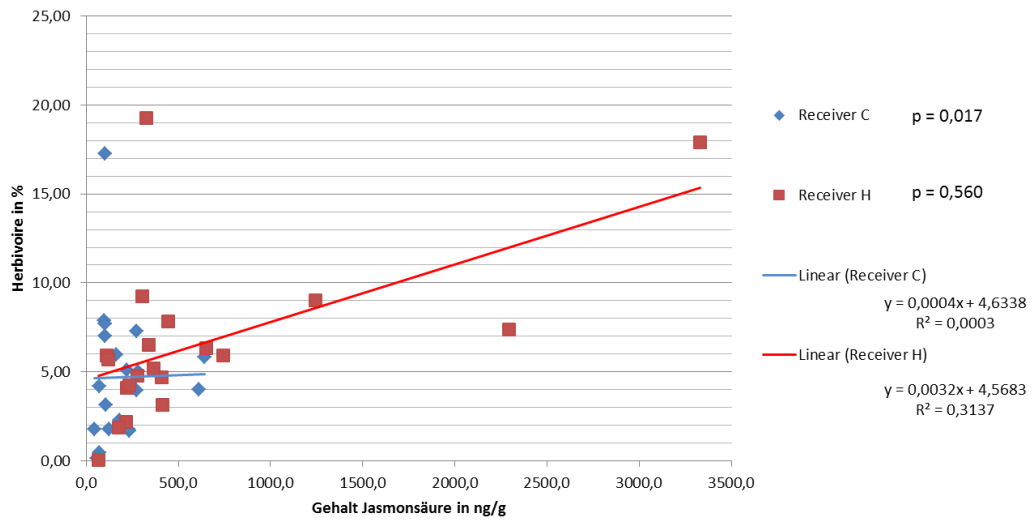


Abbildung 26: prozentuale Schädigung der Blätter durch die *L. dispar* Raupen zur Menge der Jasmonsäure in den Blättern, angegeben sind die Werte aller Blätter, rot = Behandlungen mit Herbivorie am Receiver (CH, HH), blau = Behandlungen ohne Herbivore am Receiver (CC, HC), r = Korrelationskoeffizient nach Pearson, R^2 = Bestimmtheitsmaß

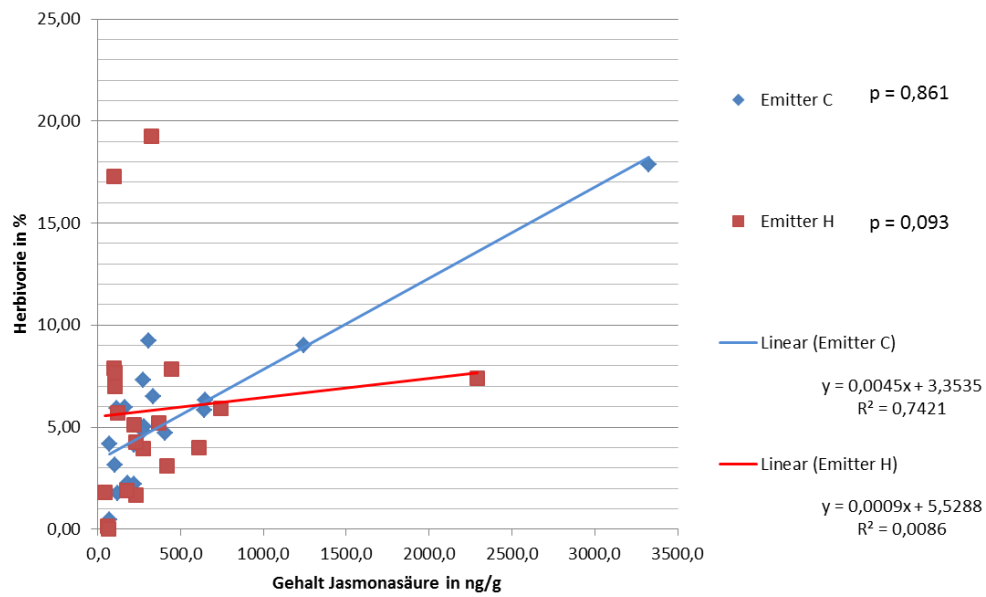


Abbildung 27: prozentuale Schädigung der Blätter durch die *Lymantria dispar* Raupen zur Menge der Jasmonsäure in den Blättern, angegeben sind die Werte aller Blätter, rot = Behandlungen mit Herbivorie am Emitter (HC, HH), blau = Behandlungen ohne Herbivore am Emitter (CC, CH), r = Korrelationskoeffizient nach Pearson, R^2 = Bestimmtheitsmaß

In Abbildung 27 wird der Einfluss der Emitterbehandlung auf den Gehalt der Jasmonsäure der Blätter verdeutlicht. Hier ist zu erkennen, dass die Gehalte der Behandlungen, die in Kontakt zu nicht befressenen Kontrollästen standen, stark positiv korreliert sind. Die der Behandlungen, die in Kontakt zu befressenen Ästen standen, jedoch nur sehr schwach positiv korrelieren.

Statistische Auswertung der Phytohormondaten

Tabelle 8: Ergebnisse des linear mixed effect models für die Gehalte der Phytohormone in den Blättern durch den Blockeffekt, Herbivorie am Receiver, Kontakt zu einem herbivor geschädigtem Emitter und den Fraßschaden. AIC (Akaike Informationskriterium) und p-Werte beziehen sich auf den Vergleich der einzelnen Modelle

		Blockeffekt		Herbivorie		Kontakt		Fraßschaden		Herbivorie × Kontakt		Herbivorie × Fraß		Kontakt × Fraß	
		AIC	p	AIC	p	AIC	p	AIC	p	AIC	p	AIC	p	AIC	p
Gesamt	SA	561,6	0,0071	562,2	0,2424	564,0	0,6772	566,0	0,8354	567,9	0,8461	567,7	0,6004	568,0	0,8944
	JA	629,8	0,0531	625,9	0,0155	627,7	0,5954	623,9	0,0160	625,9	0,9903	619,2	0,0102	606,3	< 0,0001
	JA-Ile1	283,9	0,0959	278,0	0,0049	279,8	0,6520	275,2	0,0099	277,1	0,8824	270,7	0,0113	257,9	< 0,0001
	JA-Ile2	382,2	0,0683	375,2	0,0027	376,0	0,2743	371,2	0,0090	373,0	0,0647	366,9	0,0120	348,8	< 0,0001
	OPDA	489,9	0,8174	491,6	0,5663	493,6	0,9904	495,4	0,6660	496,6	0,3609	497,4	0,8756	497,4	0,9821
	OH-Ja-Ile 1	277,0	0,1833	270,3	0,0032	272,2	0,8158	274,2	0,9064	275,6	0,4497	274,6	0,1494	268,5	0,0057
	OH-JA-Ile 2	546,3	0,1902	546,4	0,1695	546,3	0,7914	550,2	0,6924	551,9	0,6292	548,7	0,0628	547,2	0,0253
Block 1	SA	/		274,3	0,1178	276,1	0,6384	277,5	0,4322	279,5	0,9110	278,6	0,3404	279,2	0,6134
	JA	/		256,1	0,0023	258,0	0,8021	257,1	0,0902	259,1	0,8944	258,4	0,3915	259,0	0,6968
	JA-Ile1	/		98,1	0,0035	99,8	0,5948	101,8	0,9318	103,1	0,4001	103,5	0,5570	103,8	0,8649
	JA-Ile2	/		157,0	0,0073	158,5	0,4636	160,0	0,4813	161,4	0,4279	161,4	0,4531	162,0	0,9160
	OPDA	/		251,0	0,2279	252,8	0,6362	254,1	0,3978	248,8	0,0068	255,1	0,3126	255,6	0,4963
	OH-Ja-Ile 1	/		124,0	0,0206	124,5	0,2191	126,5	0,8788	124,7	0,0511	128,5	0,9741	127,6	0,3501
	OH-JA-Ile 2	/		259,7	0,2933	261,5	0,6329	262,2	0,2604	263,9	0,5530	264,2	0,8271	264,2	0,9325
Block 2	SA	/		290,4	0,7291	292,3	0,8787	294,1	0,6570	296,1	0,9569	294,8	0,2528	296,1	0,9964
	JA	/		328,3	0,0513	329,9	0,5577	328,2	0,0542	330,2	0,9115	327,5	0,0995	315,3	0,0001
	JA-Ile1	/		153,6	0,0293	155,5	0,6743	152,5	0,0266	154,5	0,7767	152,1	0,1170	137,2	< 0,0001
	JA-Ile2	/		201,5	0,0222	202,4	0,3092	1993,3	0,0234	201,1	0,6594	198,7	0,1052	178,4	< 0,0001
	OPDA	/		244,4	0,5931	246,2	0,6359	247,6	0,4270	249,3	0,5909	248,3	0,2527	249,6	0,9503
	OH-Ja-Ile 1	/		146,0	0,0382	147,0	0,3115	148,9	0,7599	147,9	0,0801	149,4	0,2128	144,4	0,0106
	OH-JA-Ile 2	/		285,0	0,3186	286,7	0,5647	288,6	0,8455	290,3	0,5736	287,6	0,0837	287,3	0,0689

Tabelle 9: ANOVA-Übersichtstabelle der Receiver für die Effekte des Blocks, der Herbivorie am Receiver, dem Kontakt zu einem herbivor geschädigtem Emitter und dem Fraßschaden. F- und p-Werte beziehen sich auf das Verhalten eines Stoffes zu dem jeweiligen Faktor. Ein p-Wert <0,05 (fette Zahlen) bedeutet eine signifikante Änderung des Wertes durch den jeweiligen Faktor.

		Blockeffekt		Herbivorie		Kontakt		Fraßschaden		Herbivorie × Kontakt		Herbivorie × Fraß		Kontakt × Fraß	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Gesamt	SA	25,8	< 0,0001	1,2	0,2763	0,2	0,6989	0,0	0,8470		n.s.		n.s.		n.s.
	JA	10,1	0,0032	11,2	0,0020	0,5	0,4843	9,6	0,0040		n.s.	9,3	0,0045	18,9	0,0001
	JA-Ile1	6,6	0,0150	15,7	0,0004	0,4	0,5510	10,9	0,0023		n.s.	8,9	0,0052	18,4	0,0001
	JA-Ile2	10,4	0,0028	21,1	< 0,0001	2,5	0,1254	12,8	0,0011		n.s.	10,0	0,0033	25,7	< 0,0001
	OPDA	0,0	0,8291	0,3	0,5934	0,0	0,9911	0,2	0,6885		n.s.		n.s.		n.s.
	OH-Ja-Ile 1	2,3	0,1369	10,0	0,0032	0,1	0,8145	0,0	0,9057		n.s.		n.s.	7,2	0,0113
	OH-JA-Ile 2	1,8	0,1851	1,9	0,1745	0,1	0,7935	0,2	0,6960		n.s.	3,3	0,0789	3,4	0,0760
Block 1	SA		/	2,2	0,1600	0,2	0,6743	0,5	0,4891		n.s.		n.s.		n.s.
	JA		/	10,9	0,0045	0,1	0,8126	2,5	0,1357		n.s.		n.s.		n.s.
	JA-Ile1		/	8,6	0,0097	0,2	0,6395	0,0	0,9400		n.s.		n.s.		n.s.
	JA-Ile2		/	7,3	0,0157	0,4	0,5135	0,4	0,5320		n.s.		n.s.		n.s.
	OPDA		/	1,7	0,2108	0,3	0,6229	0,8	0,3889	6,6	0,0211		n.s.		n.s.
	OH-Ja-Ile 1		/	6,0	0,0268	1,4	0,2511	0,0	0,8865	3,1	0,0965		n.s.		n.s.
	OH-JA-Ile 2		/	1,0	0,3372	0,2	0,6642	1,0	0,3216		n.s.		n.s.		n.s.
Block)	SA		/	0,1	0,7591	0,0	0,8925	0,2	0,6958		n.s.		n.s.		n.s.
	JA		/	8,1	0,0123	0,7	0,4294	6,4	0,0228		n.s.		n.s.	16,6	0,0010
	JA-Ile1		/	12,3	0,0031	0,4	0,5341	10,0	0,0065		n.s.		n.s.	20,7	0,0004
	JA-Ile2		/	19,2	0,0005	3,2	0,0926	13,8	0,0021		n.s.		n.s.	32,0	< 0,0001
	OPDA		/	0,2	0,6308	0,2	0,6719	0,5	0,4843		n.s.		n.s.		n.s.
	OH-Ja-Ile 1		/	5,3	0,0366	1,1	0,3114	0,1	0,7594		n.s.		n.s.	5,8	0,0295
	OH-JA-Ile 2		/	0,9	0,3528	0,3	0,5941	0,0	0,8569		n.s.		n.s.	2,7	0,1212

Die Statistische Auswertung der Phytohormondaten ergab, dass auch hier die Aufteilung des Versuchs in zwei Blöcke einen teilweise stark signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse hatte. Ebenso fällt auf, dass die Behandlung des Receivers mit Herbivoren oder eben ohne Herbivoren einen deutlichen Effekt hat und auch das Schadensausmaß. Auch der Kontakt zu einem behandeltem bzw. nicht-behandeltem Emitter, in Bezug auf das Schadensausmaß am Receiver ist ein wichtiger Faktor.

4. Diskussion

4.1. Duftsammlung

Allgemein betrachtet, konnten relativ wenig Duftstoffe identifiziert werden. Im Rahmen des Versuchs wurden nur 12 Stoffe gefunden. Die Pappel emittiert aber natürlich wesentlich mehr als 12 Duftstoffe. In anderen Arbeiten wurden beispielsweise mehr als 50 Komponenten gefunden, von denen 33 identifiziert werden konnten [23]. Eine Ursache für die geringe Zahl von Duftstoffen in diesem Experiment könnte sein, dass es sich um einen Versuch im Freiland handelt und die Messung nur über einen Zeitraum von drei Stunden lief.

Beim Blick auf die Emissionsmuster der Stoffgruppen und der einzelnen Stoffe fällt auf, dass die Erwartungen, außer für Nonanal, welches nicht herbivor induziert wird, nicht erfüllt wurden. Wie auch in der ANOVA-Tabelle 4 deutlich wird, scheint keiner der Faktoren, außer der Block, einen Einfluss auf die Emission der Duftstoffe zu haben. Nach der in der Einleitung aufgestellten Hypothese, sollten eigentlich die CH- und die HH-Behandlungen eine wesentlich höhere Menge an Duftstoffen emittieren, als die CC- und HC-Behandlungen, da die Emission der gefundenen Duftstoffe durch eine herbivore Schädigung des Blattes ausgelöst wird. Dies ist allerdings nur sehr sporadisch der Fall. Die anfangs aufgestellte Hypothese, dass das Priming Phänomen auch im Freiland nachweisbar ist, konnte nicht bestätigt werden. Um diese Hypothese zu bestätigen, hätten die Duftemission der HH-Behandlungen deutlich höher als die der HC-Behandlungen sein müssen. Besonders auffällig sind jedoch die hohen Duftstoffemissionen in den Kontrollästen

(CC). Diese sind teilweise fast genauso hoch, wie die anderen Behandlungen (Abbildung 11), dabei sollten diese Äste eigentlich wesentlich geringe Werte aufweisen als die herbivor induzierten Behandlungen. Es hat also den Anschein als hätte keine der Behandlungen einen Einfluss auf den Baum gehabt.

Allerdings muss man bedenken, dass ein Baum niemals völlig ohne herbivore oder andere Schädigungen, wie zum Beispiel Krankheits- und Pilzbefall, ist. Im Labor gezüchtete Bäume weisen natürlich zum Beginn eines solchen Versuchs keinerlei Schädigungen an den Blättern auf. Somit können die Ergebnisse auch nicht verfälscht werden. Auch wenn für das Experiment frische Triebe des Baumes ausgewählt wurden, so waren diese auch vor den eigentlichen Behandlungen bereits durch Herbivore, Krankheiten oder Pilze befallen. Im Freiland ist es nur schwer bis unmöglich völlig Schadenfreie Blätter zu finden. Wie in Abbildung 18 ersichtlich, wurde an den CC- und HC-Behandlungen ein ähnliches Schadensausmaß festgestellt, wie bei den beiden mit *L. dispar* Raupen behandelten Ästen. Da man nun unmöglich sagen kann, wie lange diese Verletzungen bereits zurückliegen, muss man davon ausgehen, dass dies die Ursache dafür ist, dass zwischen den einzelnen Behandlungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten. Auch wenn man davon ausgeht, dass der Baum die Emission von Terpenen zur Verteidigung aus Kostengründen sehr schnell wieder einstellt, kann man nicht sagen, ob die Schädigung bereits lange genug zurücklag.

Zusätzlich könnte der experimentell erzeugte Schaden durch die Schwammspinnerraupe nicht ausreichend gewesen sein, um eine deutliche Abwehrreaktion zu induzieren. Die experimentelle Herbivorie war kaum höher als die natürlichen Blattflächenverluste. Um klarere Ergebnisse zu erhalten, hätten entweder mehr Raupen pro Behandlung angesetzt werden müssen oder es hätte über eine längere Zeit induziert werden müssen. Da die Emission von Terpenen herbivor induziert wird, sollte bei einem größeren Schadensausmaß auch eine größere Menge dieser Stoffe freigesetzt werden. Die Abbildung 18 und die statistische Untersuchung (siehe Tabelle 4) zeigten jedoch, dass dies nicht der Fall ist.

Im Freiland ist es zum Teil auch schwierig einen gleichen und kontinuierlichen Luftstrom, während der Messung der Blätter herzustellen, da die Drosseln sehr empfindlich sind, das ist im Labor wesentlich einfacher. Auch die Fixierung der Zweige und Schläuche ist im Freiland weniger stabil, da die gesamte Konstruktion während der ganzen Zeit abiotischen Faktoren, z.B.: Wind, ausgesetzt ist. So ist es

durchaus denkbar, dass die Sammlung der Duftstoffe weniger effektiv funktioniert hat als im Labor üblich. Da davon auszugehen ist, dass sich ein Baum im Labor und im Freiland ähnlich verhält, kann dies als Hauptgrund angesehen werden, dass einige Stoffe in so geringem Maß im Filter gefangen wurden, dass sie unter der Detektionsschwelle der GC-MS lagen.

4.2. Aktivität der Proteaseinhibitoren

Die Analyse der Aktivität der Proteaseinhibitoren sollte die Ergebnisse der Duftstoffanalyse bestätigen. Auch hier konnten die anfangs aufgestellten Hypothesen nicht bestätigt werden. Auch hier wäre zu erwarten gewesen, dass die CH- und HH-Behandlungen eine deutlich höhere Aktivität zeigen, wobei HH die größte zeigen sollte. Ähnliche Versuche zeigen eine starke Inhibition der Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin durch die Inhibitoren von unbehandelten Pappelblättern und Blättern, die durch Herbivore beschädigt wurden. Die Restaktivität der Verdauungsenzyme sinkt durch die Inhibitoren der behandelten Blättern teilweise auf unter 20% [24]. Im Umkehrschluss steigt die Aktivität der Proteaseinhibitoren der Pappel nach Herbivorie deutlich. In der Abbildung 19 ist dieses Muster auch ansatzweise erkennbar. Allerdings zeigt die statistische Auswertung (siehe Tabelle 6), dass keiner der Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität hat.

4.3. Phytohormone

Die Ergebnisse der Analyse der Phytohormone zeigen ebenfalls keinen Beweis für das Priming-Phänomen. Allerdings zeigen sie auf, dass die Schädigung der Blätter durch Herbivore sehr wohl einen Einfluss auf den Metabolismus der Blätter hat. So ist deutlich erkennbar, dass die CH- und HH-Behandlungen höhere Werte der Jasmonate aufweisen als die CC- und HC-Behandlungen (Abbildung 20). Salizylsäure und cis-OPDA zeigen dieses Muster nicht. Das war aber auch nicht zu erwarten, da Salizylsäure zwar eine zentrale Rolle als Signalmolekül bei der Abwehr von Krankheitserregern und Pilzinfektionen spielt [25], jedoch nicht im Falle einer herbivoren Attacke induziert wird. Auch cis-OPDA, eine wichtige Vorstufe der Jasmonate wird nicht induziert sondern viel mehr konstitutiv abgegeben, da es selbst als Verteidigung gegen Herbivore dient, indem es die Entwicklung von Raupen nach Aufnahme in deren Verdauungstrakt schädigt [26].

Zu erwarten war auch, dass die Menge der Jasmonate in den Blättern mit dem Schadensausmaß positiv korreliert (siehe Abbildung 24) speziell, dass die Menge nach akutem Schadensbefall stark ansteigt (Abbildung 25). Das zeigt was eigentlich auch die Duftstoffanalyse hätte belegen sollen, nämlich dass eine Pflanze spezifisch auf eine Schädigung durch Herbivore reagiert.

Wie bereits erwähnt, konnte allerdings auch mit Hilfe der Phytohormonanalyse das Priming-Phänomen nicht belegt werden. Die statistische Auswertung ergab zwar, dass das Ausmaß des Schadens und der Kontakt zu einem befallenen beziehungsweise nicht befallenen Emitter einen signifikanten Einfluss auf die Menge der Jasmonate im Blatt haben, jedoch scheinen die nicht behandelten Emitter einen größeren Effekt zu haben, als die behandelten (siehe Abbildung 26), dies widerspricht den Erwartungen völlig, ist aber ebenso wie die Varianz der Duftdaten durch die bereits im Vorfeld der Untersuchungen auftretende Schädigung der Blätter zu erklären.

Im Allgemeinen befanden sich allerdings keine allzu hohen Mengen an Pflanzenhormonen in den Blättern. Die Detektion durch die verwendete Triple Quad ist aber um einiges empfindlicher und somit genauer, als die zur Detektion der Duftstoffe verwendete GC-MS. Das ist vermutlich die Ursache dafür, dass die Phytohormonanalyse weniger durch die diversen Faktoren beeinträchtigt wurde die ein Versuch im Freiland mit sich bringt.

4.4. Blockeffekt

Sowohl bei der Analyse der Duftstoffe (Tabelle 4), als auch bei der Analyse der Phytohormone (Tabelle 9) ist aufgefallen, dass die Aufteilung des Experiments in zwei Blöcke einen teilweise stark signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse hat. In beiden Fällen kam es zu einer starken Erhöhung der Menge, der jeweiligen Analyten im zweiten Block (siehe Abbildungen 14, 15 und 23). Dies ist durch die jeweilige Lage der Blöcke zu erklären. Die Blätter von Block eins lagen eher auf der nord-östlichen Seite des Baumes und somit hauptsächlich im Schatten. Die Blätter von Block zwei befanden sich auf der südwestlichen Seite des Baumes und waren somit dem Sonnenlicht ausgesetzt. Weiterhin war es an dem Tag an dem die Blätter von Block zwei gemessen wurden generell milder und wärmer, als am Tag zuvor, das heißt die in Block zwei behandelten und gemessenen Blätter hatten generell bessere Umweltbedingungen, als die in Block eins. Da Pflanzen allgemein unter

besseren photosynthetischen Bedingungen höhere Stoffwechselraten aufweisen, ist davon auszugehen, dass davon auch die Synthese von Verteidigungsmetaboliten beeinträchtigt wird. Vor allem die Emission von Pflanzenduftstoffen ist stark Temperaturabhängig. Bei steigender Blattemperatur steigt auch die Menge der emittierten Stoffe [27]. Somit ist es auch gut denkbar, dass ein Blockeffekt zu Stande kommt.

5. Zusammenfassung

Viele Pflanzen erhöhen nach einer herbivoren Schädigung die Emission von Duftstoffen als Verteidigungsmechanismus. Im Labor wurde bereits nachgewiesen, dass der Kontakt zu befallenen Pflanzenbereichen das Ausmaß der Verteidigung verändert. Man spricht allgemein von Priming.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Äste eines Baumes im Freiland gezielt mit Hilfe von Raupen herbivor angegriffen. Um die Reaktionen der Äste zu beobachten, wurde eine Duftstoffsammlung im Luftraum der Blätter und eine Analyse der Blätter hinsichtlich der Aktivität der Proteaseinhibitoren und Phytohormon-Gehalte durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Herbivorie und die Temperatur einen entscheidenden Einfluss auf die Verteidigungsantwort haben. So fällt die Reaktion auf Herbivorie heftiger aus, wenn der Schaden größer ist. Auch eine höhere Temperatur begünstigt die Ausschüttung der Verteidigungsmetaboliten. Ein Priming konnte während dieses Versuchs nicht nachgewiesen werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Gehölzpflanzen auch im Freiland eine ähnliche Form der Verteidigung zeigen wie im Labor untersuchte Exemplare.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Schaller, A. 2008. Induced plant resistance to herbivory. Springer-Verlag, Dordrecht
- [2] Arimura, G.I., Kost, C., and Boland, W. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim. Biophys. Acta* 1734(2): 91-111. PMID: 15904867
- [3] Heil, M. 2008. Indirect defence via trophic interactions. *New Phytol.* 178(1): 41-61. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02330.x. PMID: 18086230
- [4] van Poecke, R.M.P., Posthumus, M.A., and Dicke, M. 2001. Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis. *J. Chem. Eco.* 27(10): 1911-1928. doi: 10.1023/A:1012213116515. PMID: 11710601
- [5] Loivamäki, M., Gilmer, F., Fischbach, R.J., Sörgel, C., Bachl, A., Walter, A., and Schnitzler, J.-P. 2007. *Arabidopsis*, a model to study biological functions of isoprene emission? *Plant Physiol.* 144(2): 1066-1078. doi: 10.1104/pp.107.098509. PMID: 17468218
- [6] van den Boom, C.E.M., van Beek, T.A., Posthumus, M.A., de Groot, A., and Dicke, M. 2004. Qualitative and quantitative variation among volatile profiles induced by *Tetranychus urticae* feeding on plants from various families. *J. Chem. Ecol.* 30(1): 69-89. doi: 10.1023/B:JOEC.0000013183.72915.99. PMID: 15074658
- [7] Unsicker, S., Kunert, G., Gershenzon, J., 2009. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defence against herbivores. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 479-485. doi: 10.1016/j.pbi.2099.04.001. Elsevier Ltd.
- [8] Mumm, R., Dicke, M. 2010. Variation in natural plant products and the attraction of bodyguards involved in indirect plant defense. *Can. J. Zool.* 88: 628-667. doi: 10.1139/Z10-032. NRC Research Press
- [9] Biologie der Pflanzen, von Peter H. Raven, Ray Franklin Evert, Susan E. Eichhorn, Rosemarie Langenfeld-Heyser, 3. Auflage, W. de Gruyter

- [10] Arimura, G.I., Huber, D.P.W., and Bohlmann, J. 2004. Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (-)-germacrene D synthase, PtdTPS1. *Plant J.* 37(4): 603-616. doi: 10.1111/j. 1365-313X.2003.01987.x. PMID: 14756770
- [11] Mumm, R. and Hilker, M. 2006. Direct and indirect chemical defence of pine against folivorous insects. *Trends Plant Sci.* 11(7): 351-358. doi: 10.1016/j.tplants.2006.05.007. PMID: 16769239
- [12] Heil, M. & Silva Bueno, J.C. (2007) Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 104, 5467–5472
- [13] Li, T., Holopainen, J.K., Kokko, H., Tervahauta, A.I., and Blande, J. 2012. Herbivore-induced aspen volatiles temporally regulate two different indirect defences in neighbouring plants. *Functional Ecology*. doi: 10.1111/j.1365-2435.2012.01984.x. British Ecological Society
- [14] Tschardtke, T., Thiessen, S., Dolch, R. & Boland, W. (2001) Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 1025–1047
- [15] Engelberth, J., Alborn, H.T., Schmelz, E.A. & Tumlinson, J.H. (2004) Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101, 1781–1785
- [16] Kost, C. & Heil, M. (2006) Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *Journal of Ecology*, 94, 619–628
- [17] Gershenzon J: Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *J Chem Ecol* 1994, 20:1281-1328
- [18] Martin Heil, Thomas Koch, Andrea Hilpert, Brigitte Fiala, Wilhelm Boland, K. Eduard Linsenmair: Extrafloral nectar production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced, indirect, defensive response elicited by jasmonic acid. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 98, 3, 2001, ISSN 0027-8424, S. 1083–1088, doi:10.1073/pnas.98.3.1083

- [19] Horst Weisgerber (Hrsg.) et al.: *Die Schwarzpappel. Probleme und Möglichkeiten bei der Erhaltung einer gefährdeten heimischen Baumart. Vorträge und Poster anlässlich des Symposiums am 13. und 14. Mai 1998 in Hann. Münden.* Forschungsberichte der Hessischen Landesanstalt für Forsteinrichtung, Waldforschung und Waldökologie, Band 24. Hessische Landesanstalt für Forsteinrichtung, Waldforschung und Waldökologie, Hann. Münden 1998
- [20] Karl Eduard Schedl: *Der Schwammspinner (Porthetria dispar L.) in Euroasien, Afrika und Neuengland.* Monographien zur angewandten Entomologie, Nr. 12. Parey, Berlin 1936
- [21] KRAMER, W. (2004): Charakterisierung von drei Populationen der Schwarzpappel (*Populus nigra* L.) entlang der Oder. Diplomarbeit FH Eberswalde, 95 S.
- [22] Scanion, J.T., Willis, D.E., 1985. Calculation of flame ionization detector relative response factors using the effective carbon number concept. *J. Chromatogr. Sci.* 23, 333–340.
- [23] Danner, H., et al. Four terpene synthases produce major compounds of the gypsy moth feeding-induced volatile blend of *Populus trichocarpa*. *Phytochemistry* (2011), doi:10.1016/j.phytochem.2011.03.014
- [24] Major, Ian T.; Constabel, C. Peter, 2008, Functional analysis of the Kunitz trypsin inhibitor family in poplar reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivores; *PLANT PHYSIOLOGY* Volume: 146 Issue: 3 Pages: 888-903 DOI: 10.1104/pp.107.106229
- [25] Karl-Heinz Kogel, Uli Beckhove, Birgit Jarosch, Ralph Hückelhoven, Ruth Schiffer, Katrin Beßer, Gregor Langen und Michael Korell 1998 „Die Pflanze wehrt sich selbst – Resistenzaktivierung in Kulturpflanzen“ , *Spiegel der Forschung* 15.Jg./Nr.2, 54-61
- [26] The phytohormone precursor OPDA is isomerized in the insect gut by a single, specific Glutathione transferase P. Dąbrowska, et. al., *PNAS* 2009, DOI: 10.1073/pnas.0906942106
- [27] Real-time monitoring of herbivore induced volatile emissions in the field; Schaub, Andrea; Blande, James D.; Graus, Martin; et al. Source: *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* Volume: 138 Issue: 2 Pages: 123-133 DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01322.x Published: FEB 2010

7. Anhang

1: Tabelle der experimentell ermittelten Responsefaktoren

ANDI	ANDI	Nach L. dispar Fraß 2011 May labor	RRF
(Z)-3-Hexenol	0,99566	3-met-butaldo	1
α -Pinene	0,738666	2-met-butaldo	1
Camphene	0,738666	cis-3-hexenol	0,99566
Benzaldehyde	0,949416	2-met-butaldo	1
Sabinene	0,738666	3-met-butaldo	1
β -Pinene	0,738666	isoamylacetate	1,1
Myrcene	0,753896	4-pentene-1-yl-acetate	1,1
(Z)-3-Hexenyl acetate	1,10627	prenyl-acetate	1,1
Hexyl acetate	1,105879	alpha-pinene	0,738666
Limonene	0,746203	camphene	0,738666
Eucalyptol	0,920011	benzaldehyde	0,949416
(Z)-Ocimene	0,753896	sabinene	0,949416
Benzylalcohol	0,893066	beta-pinene	0,949416
Salicylaldehyd	1,191886	myrcene	0,949416
E-Ocimene	0,753896	2-hydroxy-cyclohexanone	1
(Z)-Linalool oxide (furanoid)	1,087973	cis-3-hexenyl-acetate	1,10627
Linalool	0,890333	1-hexylacetate	1,105879
Nonanal	0,954426	E-2-hexenyl-acetate	1,1
E-DMNT	0,750318	limonene	0,746203
Benzylcyanide	1,302653	1,8-cineole	0,9
(-)-Borneol	0,87159	cis-beta-ocimene	0,753896
Citronellol	0,892397	salicylaldehyde	1,191886
Indole	0,867391	trans-beta-ocimene	0,753896
IS	1	1,2-cyclohexanediol	1,1
IS WAX	1	cis-linalool-oxide	1,087973
α -Cubebene	0,736205	linalool-oxide	1,087973
Eugenol	0,890325	Z-DMNT	0,750318
α -Copaene	0,736205	linalool	0,890333
Z-Jasmon	0,899629	nonanal	0,954426
β -Caryophyllene	0,741179	E-DMNT	0,750318
E- β -Farnesene	0,751333	benzyl cyanide	1,302653
α -Humulene	0,746222	Z-3-hexenol acetate/camphor	1
Germacrene D	0,746222	borneol	0,87159
E,E- α -Farnesene	0,751333	terpinene-4-ol	0,9
γ -Cadinene	0,741179	cis-3-hexenyl-isobutyrate	1
δ -Cadinene	0,741179	methylsalicylate	1
E-Nerolidol	0,840617	alpha-terpineol	0,9
Guaiol	0,828942	E-epoxyocimene	1,1
		cis-3-hexenyl-isovalerate	1
		phenyl-acetaldoxime	1
		2-phenylethyl acetate	1,1
		phenyl-acetaldoxime	1
		unknown 1	1
		indole	0,867391
		2-phenylnitroethane	1
		IS	1
		alpha-cubebene	0,736205
		eugenol	0,890325
		alpha-copaene	0,736205
		beta-cubebene	0,75
		cis-jasmon	0,899629
		beta-caryophyllene	0,741179
		alpha-humulene	0,746222
		alloaromadendrene	0,75
		unidentified ST	0,75
		germacrene D	0,746222
		E,E-alpha-farnesene	0,751333
		gamma-cadinene	0,741179
		delta-cadinene	0,741179
		unidentified ST	0,75
		alpha-cadinene	0,75
		alpha-calacorene	0,75
		nerolidol	0,840617
		Z-3-hexenyl benzoate	0,9
		caryophyllene-oxide	0,9
		unidentified ST-OH	0,9
		humulene oxide	0,9

2: Protokoll zur Bestimmung der Aktivität der Proteaseinhibitoren:

Modified from Practical manual David Hougen-Eitzman 12/20/02

Introduction

In response to herbivores, plants accumulate proteinase inhibitor enzymes within leaves and produce volatile organic compounds – predominantly terpenoids – that are emitted from leaves. Proteinase inhibitors (PI's) are eaten by herbivores when feeding from leaves and are believed to inhibit digestion in the stomach/ intestines of herbivores. This is called direct defense. Measuring the induction of PI's therefore is a means of measuring the induced direct defenses. Alternatively, volatile compounds are believed to repel herbivores and/ or to make the plant more attractive to natural enemies of herbivores. Measuring the induced emission of volatiles therefore is a means to assess the induction of direct defenses when complemented with herbivore choice assays and the induction of indirect defenses when complemented with predator choice assays.

1 - Proteinase inhibitors

General idea: Chymotrypsin (= proteinase as also found in the insect gut) hydrolyses proteins such as BTpNA (= N-Benzoyl-L-tyrosine p-Nitroanilide). This way, insects digest plant-proteins. Chymotrypsin can be inhibited by proteinase inhibitors (PI's) produced in the leaves of herbivore-infested plants. This way plants interfere with herbivore digestion. Total PI's can be measured in a spectrophotometer by assessing how fast pNA is generated from BTpNA by chymotrypsin at 405 nm. The absorbance of pNA will increase when chymotrypsin is added. However, addition of PI's from plant extracts will lead to a slower increase; the more PI's the plant produced, the slower the increase. The data is expressed as the relative inhibition compared to the control samples (= fold inhibition of treatment samples, taking the control sample as 1)

BTpNA + chymotrypsin -> fast degradation into BT + pNA

BTpNA + chymotrypsin + plant extract (= PI's) -> slow degradation into BT + pNA

Needed:

-Spectro photometer (405 nm)

-Cuvettes

-Liquid nitrogen

-Glass rod

-Extraction-buffer: 50 mM Tris-HCl (pH = 7.8) with Polyvinylpyrrolidone (7% w/v), phenylthiourea (1.67 mM), KCL (0.3 M) and ascorbic acid (0.4 mM). 100-250 ml (0.9 ml per sample).

-Incubation-mixture: 1 mM HCl with 0.1 mg Chymotrypsin/ ml. 50 ml (0.1 ml per sample)

-Absorbance-buffer: 0.08 M Tris-HCl with 0.1 M CaCl₂ (pH = 7.8). 100-250 ml (1 ml per sample).

-Reaction-mixture: BTpNA in DMSO mixed at 1 mg/ ml. 50 ml (0.1 ml per sample); don't put on ice!

-Stop-solution: 40% Acetic acid. 50 ml (0.1 ml per sample)

1) Freeze leafs in N₂ and grind to powder (you can weigh them first!).

2) Take 300 + 50 mg leaf powder and add 0.9 ml extraction buffer per 300 mg leaf

3) Centrifuge for 10 min at 11.000 rpm at 4 degrees

4) Transfer supernatant to clean tubes and centrifuge again; keep on ice

5) Run two times per extract:

Take 0.1 ml incubation mix, add 0.1 ml extraction buffer with sample (= treatment) or without sample (= control). Incubate at room temperature for 10-15 minutes in an eppendorf tube; make sure they are not below room temperature before you do the last step. Don't forget the positive and negative controls.

7) Add 1.0 ml absorbance buffer and 0.3 ml reaction mixture. Decant the epp three times. If adding the reaction mixture gives a 'troubled' precipitation response (= DMSO precipitating) then the extracts are still too cold! Don't use these samples.

Incubate at RT for 10 minutes exactly (better shorter than longer; as long as all tubes were incubated for the same reaction-time!). Add 0.1 ml stop-solution. Add incubation mix to negative controls and extract to the positive controls to equalize them. The positive controls should color yellowish within a couple of minutes. (Note: after addition of the stop-solution, the mixture is stable for several days at RT). Spin the eppendorfs for 10 minutes at RT and pipet it into cuvettes. Measure the absorbance at 405 nm. If the absorbance is too high (saturated reaction) you can do the reaction for 5 instead of 10 minutes or take a lower concentration of BTpNA.

How to calculate what to dissolve:

First look up the MW (FW) on the label of the chemical. Suppose the MW = 152.1 and suppose we want 0.2 mM of this compound in 100 ml water:

$152.1 \text{ gram} = 1 \text{ mol} \rightarrow 152.1 / 1000 = 0.1521 \rightarrow$

$0.1521 \text{ gram} = 1 \text{ mmol} \rightarrow$ we want 0.2 mmol per liter (= 0.2 mM) \rightarrow

$0.1521 \times 0.2 = 0.0304 \text{ gram} (=30 \text{ mg})$

So if we would dissolve 0.0304 gram in 1 liter water we would have 0.2 mM

We want only 100 ml so we have to take 10 times less (=0.00304 gram = 3 mg)

If the balance is accurate enough for 3 mg then take 50 ml water, dissolve 3 mg in it and fill the volume to 100 ml. If the balance is not accurate enough you can dissolve for example 30 or 300 mg in 50 ml of water and fill it to 100 ml. Then take 10 or 1 ml of this 'stock solution' and mix it with 90 or 99 ml water to get the 100 ml 0.2 mM solution.

Most stock solutions you can keep at room temperature for a couple of months. Only solutions containing proteins should be prepared freshly. Solutions containing DMSO should be at room temperature, otherwise the DMSO will precipitate.

Other proteinase inhibitors

Trypsin, chymotrypsin and elastase are the 3 main enzymes that form the group of the 'serine proteases' in several insect species (see: Gatehouse AM. et al. (1999). *J Insect Physiol.* 45(6):545-558. Digestive proteolytic activity ... and in vivo). So plants are likely to produce proteinase inhibitors to block these 3 enzymes. Tomatoes also elevate their levels of trypsin proteinase inhibitors upon attack by insects (Jongsma MA. et al. (1994) Trypsin inhibitor activity in mature tobacco and tomato plants is

mainly induced locally in response to insect attack, wounding, and virus infection. Planta 195: 29-35). Besides these 3 proteinases there are several others such as papain.

The above protocol you can also apply for trypsin instead of chymotrypsin but then you have to use BApNA as a substrate. In addition, you can also use papain instead of chymotrypsin using BTpNA in a slightly modified protocol (Tremacoldi et al. (2002). Detection of ... Rhizoctonia solani. Brazilian Journal of Microbiology 33:281-286).

3: Bestimmung von Proteinkonzentrationen von BIORad

Siehe Link:

http://labs.fhcrc.org/fero/Protocols/BioRad_Bradford.pdf

4: Protokoll zur Extraktion von Phytohormonen aus Blattmaterial

05.09.2012

PG und Phytohormon-Extraktion aus 10 mg Blatt-, Rindenpulver

1. 10 mg trockenes Blatt- oder Rindenpulver in 96er Platte einwiegen
2. Eine 3 mm Stahlkugel zugeben
3. Mit 8 Kanal Multi-Pipette 1 ml MeOH mit IS zugeben. Der Phytohormonstandard ist teuer und sollte nur bei Bedarf eingesetzt werden.

IS für Phenole: 1,3-Dimethoxybenzen 0.08 µL/ml und Phenyl-β-glucopyranosid 0.8 mg/ml

- Für 1 l Extraktionsmittel 80µL 1,3-DMB und 0.8g P-β-GP einsetzen

IS für Phytohormone: 40 ng/ml D4-SA, D6-ABA und D2-JA; 8 ng/ml 13C-JA-Ile

- Für Phytohormonmessung pro Milliliter Extraktionsmittel 4 µL Phytohormonstandard-Stammlösung zugeben (enthält 10µg/ml (SA,JA, ABA) bzw 2 µg/ml (JA-Ile))

4. 96er Platte fest verschließen, sodass der Deckel keine Unebenheiten aufweist

5. 30 s im paint shaker schütteln
6. Kurz in vertikaler Position schütteln um Pulverreste aus oberem Bereich der tubes zu spülen
7. Zentrifugieren (Bettinas Tischzentrifuge, 1 min, 2000 rpm)
8. Mit 12-Kanal Multipipette je 200 µl und je 400 µL in je zwei 96er Platten pipettieren
9. Restlichen Überstand vorsichtig dekantieren. Dazu 96er tubes mit Netz fixieren
10. 1000 µL reines MeOH zum festen Rückstand geben
11. Extraktionsprozedur wiederholen und 200 µl bzw. 400 µL des Überstandes zu den ersten Extrakten geben
12. Proben bis zur Analyse bei min. -20 °C lagern

Platte 1 (beide 200µL Extrakte) wird zur HPLC-Analyse verwendet, Platte 2 (beide 400 µL Extrakte) ist für Phytohormon-/Aminosäureanalyse an der Triple Quad oder als Rückstellprobe.

Für AA-Bestimmung:

40 µl vom PG/PH Extrakt mit 360 µl AA-Std mischen (10µgAA/ml Wasser) (--□ 10mg/ml-AA Stock bei Michael)

Probenvorbereitung für HPLC-Analyse

1. Unmittelbar vor HPLC Analyse 400 µL Wasser zugeben und homogenisieren. Als Laufmittel H₂O und Acetonitril vorlegen. Methode AB-SPX1, Injektionsvolumen 20 µL. Gradient: Zeit % ACN

0.0	14
22	58
22.1	100
25.0	100
25.1	14
30	14

8. Selbstständigkeitserklärung

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

Sandra Lackner

Danksagung:

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, für ihre Hilfe, Unterstützung sowie Kritik bedanken.

Besonderer Dank gilt Dr. Sybille Unsicker für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. habil. Günter Köhler sowie Dr. Sybille Unsicker, die sich bereit erklärt haben, diese Arbeit zu begutachten.

Ebenso möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe bedanken.