

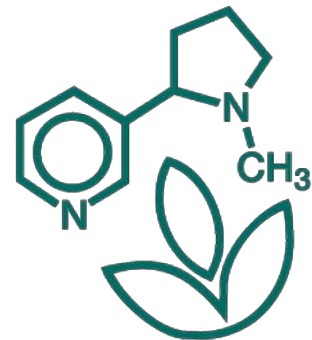
Induzierbare chemische Verteidigung von Pappeln

Diplomarbeit
Zur Erlangung des akademischen Grades
Diplom-Chemiker (Umweltchemie)



seit 1558

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Chemisch-Geowissenschaftliche Fakultät
Institut für instrumentelle Analytik



Max-Planck-Institut für chem. Ökologie
Arbeitsgruppe Biochemie

angefertigt von: Andreas Boeckler
geboren am: 13.01.1983
in: Hannover

Gutachter: Prof. Dr. Georg Pohnert
Prof. Dr. Jonathan Gershenzon

Eigenständigkeitserklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Jena, 19. Dezember 2008

.....

Andreas Boeckler

Inhaltsverzeichnis

1	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	1
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	3
3	EINLEITUNG	5
3.1	Allgemeine Begriffsdefinitionen	6
3.1.1	Physikalische, chemische und biochemische Verteidigung	6
3.1.2	Direkte Verteidigung und indirekte Verteidigung.....	7
3.1.3	Konstitutive und induzierbare Verteidigung	8
3.1.4	Priming.....	8
3.2	Der Modellorganismus <i>Populus</i>	9
3.3	Der Modellorganismus <i>Lymantria dispar</i>	11
3.4	Die Verteidigung von Pappeln gegen herbivore Insekten.....	12
3.4.1	Flüchtige organische Verbindungen (Volatile organic compounds VOC)	12
3.4.2	Verteidigung mit nichtflüchtigen organischen Verbindungen	16
3.4.3	Beziehung zwischen kondensierten Tanninen und phenolischen Glykosiden	20
3.4.4	Source-Sink-Relationship	20
4	ZIELSETZUNG UND AUFGABENSTELLUNG.....	22
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	24
5.1	Experimente der Methodenentwicklung	24
5.1.1	Methodenentwicklung zur Analyse der kondensierten Tannine (KT)	24
5.1.2	Methodenentwicklung zur Analyse der phenolischen Glykoside (PG).....	26
5.2	Charakterisierung der Sekundärmetaboliten von <i>P. nigra</i> und <i>P. trichocarpa</i> (Übersichtsanalyse).....	28
5.2.1	Motivation und Vorgehensweise.....	28
5.2.2	Ergebnisse der Analyse der volatilen Stoffe (VOC)	28
5.2.3	Analyse der kondensierten Tannine	40
5.2.4	Analyse der phenolischen Glykoside	42
5.2.5	Vergleich der phenolischen Glykoside von <i>P. nigra</i> und <i>P. trichocarpa</i>	46
5.3	Zeitauflösendes Experiment zur Bestimmung der induzierbaren Sekundärmetaboliten von <i>P. nigra</i>	47
5.3.1	Ziele und Vorgehensweise	47
5.3.2	Ergebnisse der VOC-Analyse	47
5.3.3	Diskussion der VOC-Analyse	52
5.3.4	Analyse der nichtflüchtigen Sekundärmetaboliten.....	57
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	64
7	EXPERIMENTELLER TEIL.....	66

7.1	Ablauf des Übersichtsanalyse (5.2)	66
7.2	Ablauf der zeitauflösenden Experimentes (5.3).....	67
7.3	Anzucht der Versuchsorganismen	68
7.3.1	Kultivierung der Pappeln und Klimaparameter	68
7.3.2	Aufzucht von <i>Lymantria dispar</i>	68
7.4	Probenahme der volatilen Stoffe.....	69
7.4.1	Allgemeines zur Probenahme von VOC.....	69
7.4.2	Probenahme im Push-System.....	69
7.4.3	Probenahme im Push-Pull-System.....	70
7.4.4	Luftransport und Flusskontrolle.....	73
7.5	Analyse der volatilen Stoffe	74
7.5.1	Adsorbens und Elution.....	74
7.5.2	GC/MS-Analyse.....	74
7.5.3	Substanzidentifizierung.....	75
7.5.4	Peakflächenbestimmung	75
7.5.5	Berechnung der relativen Emission	76
7.6	Probenahme für die Bestimmung der Blatinhaltsstoffe	76
7.7	Bestimmung der kondensierten Tannine	77
7.7.1	Grundlagen des angewendeten Analyseverfahrens nach Porter.....	77
7.7.2	Probenpräparation der kondensierten Tannine.....	77
7.7.3	UV/VIS-Messung und Berechnung des relativen Gehaltes	78
7.8	Bestimmung der phenolischen Glycoside.....	79
7.8.1	Probenpräparation der phenolischen Glycoside.....	79
7.8.2	HPLC/DAD-Methode zur Quantifizierung der PG.....	79
7.8.3	Peakflächenbestimmung und Berechnung des relativen Gehaltes	80
7.8.4	HPLC/MS-Methode zur Substanzidentifikation	80
7.9	Datenauswertung	81
8	ANHANG	82
8.1	Rel. Emission der VOC von <i>P. nigra</i> im zeitauflösenden Experiment als Funktion der Zeit. 82	
8.2	Tabelle der verwendeten Ionenspuren zur Berechnung der relativen Emission im zeitauflösenden Experiment	88
9	LITERATUR.....	89

1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 3.1 Natürliches Habitat der Schwarzpappel..... Error! Bookmark not defined.
- Abb. 3.2 Biosyntheseweg von (Z)-3-Hexenylacetat aus Linolensäure. . Error! Bookmark not defined.
- Abb. 3.3 Bioynthese der Mono-, Sesqui-, und Diterpene in höheren Pflanzen...Error! Bookmark not defined.
- Abb. 3.4 Aufbau kondensierter Tannine. Error! Bookmark not defined.
- Abb. 3.5 Die drei häufigsten phenolischen Glykoside der Gattung Populus. ...Error! Bookmark not defined.
- Abb. 3.6 Vermuteter Metabolismus von 6-HCH-haltigen phenolischen Glykosiden..... Error! Bookmark not defined.
- Abb. 5.1 Regressionsgeraden der KT-Proben zur Charakterisierung der Präzision des modifizierten Analyseverfahrens nach Porter. Error! Bookmark not defined.
- Abb. 5.2 Regressionsgeraden von Salicortin und Hydroxytremulacin zur Abschätzung der Präzision des Verfahrens zur Bestimmung der PG..... Error! Bookmark not defined.
- Abb. 5.3 Gaschromatogramm der volatilen Stoffe eines von L. dispar Raupen befallenen (A) und eines unbehandelten (B) P. trichocarpa Zweiges. Error! Bookmark not defined.
- Abb. 5.4 Relativer Gehalt der kondensierten Tannine [A550 * mg⁻¹(TM)] von P. nigra und P. trichocarpa Blättern in Abhängigkeit von der Behandlung. Error! Bookmark not defined.
- Abb. 5.5 HPLC-Chromatogramme der Methanolextrakte von Blattpulver der Pappelarten P. trichocarpa (A) und P. nigra (B). Error! Bookmark not defined.
- Abb. 5.6 Abb. 5.7 UV-Spektren des hypothetischen „Hydroxytremulacins“ (A) und Tremulacins (B). Error! Bookmark not defined.
- Abb. 5.7 Fragmentierungsmuster des [M-H]⁻-Ions von „Hydroxytremulacin“ und Tremulacin. Error! Bookmark not defined.
- Abb. 5.8 Hypothetische Fragmentierung von „Hydoxytremulacin“ bzw. Tremulacin bei Electronspray Ionization (ESI) im negativen Modus. Error! Bookmark not defined.
- Abb. 5.9 Relativer Gehalt [mg⁻¹(TM)] der erfassten phenolischen Glycoside von P. nigra und P. trichocarpa in Abhängigkeit von der Behandlung. Error! Bookmark not defined.
- Abb. 5.10 GC/MS-Chromatogramme einer P. nigra mit Herbivorie und einer Kontrolle im Zeitraum von 17-23 Uhr (A) und 23-5 Uhr (B)..... Error! Bookmark not defined.
- Abb. 5.11 Biosynthese der GLV-Ester über (Z)-3-Hexenal und (Z)-3-Hexenol. Error! Bookmark not defined.
- Abb. 5.12 Blattkennzeichnung nach LPI-Konvention und Einteilung der Blattaltersklassen zur Analyse der nichtflüchtigen Sekundärmetaboliten beim zeitauflösenden Experiment..... Error! Bookmark not defined.
- Abb. 5.13 Ergebnisse der KT-Analyse [A550 * g⁻¹(TM)] des zeitauflösenden Experimentes in Abhängigkeit vom Blattalter, der Behandlung und der Zeit nach Versuchsbeginn. Error! Bookmark not defined.

Abb. 5.14 Relativer PG-Gehalt [g^{-1} (TM)] der <i>P. nigra</i> Blätter im zeitauflösendes Experimentes in Abhängigkeit von der Behandlung, der Blattaltersklasse und der Zeit nach Beginn der Induktion.....	Error! Bookmark not defined.
Abb. 7.1 Zeitlicher Ablauf der Übersichtsanalyse mit Zweigen von <i>P. nigra</i> und <i>P. trichocarpa</i>	Error! Bookmark not defined.
Abb. 7.2 Schematische Darstellung des Push-Probenahmesystems	Error! Bookmark not defined.
Abb. 7.3 Schematischer Aufbau des Push-Pull-Probenahmesystems ..	Error! Bookmark not defined.
Abb. 7.4 Ablauf der oxidativ-sauren Spaltung kondensierter Tannine	Error! Bookmark not defined.
Abb. 8.1 Zeitverlauf der Emission der GLV im zeitauflösenden Experiment....	Error! Bookmark not defined.
Abb. 8.2 Zeitverlauf der Emission der Monoterpenoide mit Emissionsmuster 1 im zeitauflösenden Experiment.....	Error! Bookmark not defined.
Abb. 8.3 Zeitverlauf der Emission der Monoterpenoide mit Emissionsmuster 2 im zeitauflösenden Experiment.....	Error! Bookmark not defined.
Abb. 8.4 Zeitverlauf der Emission von DMNT im zeitauflösenden Experiment.....	Error! Bookmark not defined.
Abb. 8.5 Zeitverlauf der Emission der Sesquiterpenoide mit Emissionsmuster 1 im zeitauflösenden Experiment.....	Error! Bookmark not defined.
Abb. 8.6 Zeitverlauf der Emission der Sesquiterpenoide mit eigenem Emissionsmuster im zeitauflösenden Experiment.	Error! Bookmark not defined.
Abb. 8.7 Zeitverlauf der Emission der der nicht klassifizierten Substanzen zeitauflösenden Experiment.....	Error! Bookmark not defined.
Abb. 8.8 Zeitverlauf der Emission der der nicht klassifizierten Substanzen zeitauflösenden Experiment (Fortsetzung).....	Error! Bookmark not defined.
Tab. 5.1 Relative Emission [g^{-1} (TM)] der im VOC-Bouquet von <i>P. nigra</i> Zweigen untersuchten Substanzen in Abhängigkeit von der Behandlung.....	30
Tab. 5.2 Relative Emission [g^{-1} (TM)] der im VOC-Bouquet von <i>P. trichocarpa</i> Zweigen untersuchten Substanzen.....	36
Tab. 5.3 Gegenüberstellung der totalen relativen Emission [g^{-1} (TM)] und der relativen Emission [g^{-1} (TM)] der Hauptkomponenten des VOC- Bouquets von <i>P. nigra</i> und <i>P. trichocarpa</i>	39
Tab. 5.4 Liste der im zeitauflösenden Experiment untersuchten Volatile in fünf Substanzklassen.	49
Tab. 7.1: Geräteparameter der GC/MS-Methode.....	75
Tab. 7.2: Ofenparameter der GC/MS-Methode	80
Tab. 7.3: Gradient der mobilen Phase. Der Fluss betrug 1mL/min.....	80
Tab. 7.4: Methodenparameter der Ionenfalle	81

2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
amu	atomaren Masseneinheiten (<u>a</u> tomic <u>m</u> ass <u>u</u> nits)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
DAD	<u>D</u> iodenarray- <u>D</u> etektor
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<u>D</u> eoxyribonucleic <u>a</u> cid)
DMAPP	<u>D</u> imethylallylpyrophosphat
DMNT	(<i>E</i>)-4,8- <u>D</u> imethyl-1,3,7- <u>N</u> onatrien (C ₁₁ -Terpen)
ESI	<u>E</u> lektrospray- <u>I</u> onisierung
EUFORGEN	<u>E</u> uropean <u>F</u> orest <u>G</u> enetic Resources Programme
eV	<u>E</u> lektronenvolt
g	Gramm
GC	<u>G</u> aschromatographie
GLV	<u>G</u> reen <u>L</u> eaf <u>V</u> olatile(s)
GmbH	<u>G</u> esellschaft <u>m</u> it <u>b</u> eschränkter <u>H</u> aftung
h	Stunde
6-HCH	6-Hydroxycyclohexenon
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
IPP	<u>I</u> sopentenylpyrophosphat
KT	<u>K</u> ondensierte <u>T</u> annine
L	Liter
LC	<u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
m	Meter
min	Minute
MS	<u>M</u> assenspektrometrie
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
NS	<u>N</u> ormschliff
PEEK	<u>P</u> olyetheretherketon
PET	<u>P</u> olyethylenterephthalat
PG	<u>P</u> henolisches <u>G</u> lykosid/ <u>P</u> henolische <u>G</u> lykoside

PPO	<u>P</u> oly <u>ph</u> enol <u>o</u> xidase
RP	Umkehrphase (<u>R</u> eversed <u>P</u> hase)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<u>r</u> evolution per <u>m</u> inute)
SE	Standardfehler (<u>S</u> tandard <u>E</u> rror)
SIM	ausgewählte Ionenspur (<u>S</u> electe <u>d</u> <u>I</u> on <u>M</u> onitoring)
Tab.	Tabelle
TIC	Summe aller Ionenspuren (<u>T</u> otal <u>I</u> on <u>C</u> urrent)
TM	<u>T</u> rocken <u>m</u> asse
u.a.	<u>u</u> nter <u>a</u> nderem
UV/VIS	<u>U</u> ltraviolett/ <u>V</u> isible
s	Sekunde
VOC	<u>V</u> olatile <u>O</u> rganic <u>C</u> ompound
z.B.	zum <u>B</u> eispiel

3 Einleitung

Pflanzen sind seit Millionen von Jahren den Angriffen herbivorer Insekten ausgesetzt und haben ihre eigenen Verteidigungsstrategien entwickelt. Aufgrund dieser langen Zeitspanne und der ständigen Anpassung der pflanzenfressenden Widersacher entwickelte sich eine bemerkenswerte Vielfalt von pflanzlichen Abwehrmechanismen. Diese umfassen z.B. die Entwicklung von physikalischen Hindernissen wie Trichomen, die Anreicherung von toxischen Substanzen oder die Anlockung von natürlichen Feinden der herbivoren Insekten (Schoonhoven 2006). Derartige Maßnahmen verbrauchen jedoch Fotoassimilate und Nährstoffe und werden damit auf Kosten von Wachstum und Reproduktion unterhalten. Neuere Studien zeigen, dass Pflanzen Teile ihres Arsenalns nur im Ernstfall aktivieren und auf diese Weise Ressourcen einsparen (Chen 2008). Die Auslösung dieser zunächst latenten Abwehrmaßnahmen geschieht erst beim Eintreten von Fraßschäden, oder, wie neueste Erkenntnisse belegen, durch zwischenpflanzliche Kommunikation über gasförmige Signalmoleküle (Frost *et al.* 2008).

Der Mensch hat erst begonnen, die komplexen Abläufe der pflanzlichen Schädlingsabwehr zu begreifen. Ganz offensichtlich sind die Maßnahmen der Pflanzen wesentlich weniger wirksam als synthetische Insektizide und garantieren letztendlich nur das Gleichgewicht zwischen Pflanzen und Pflanzenfressern. Trotz allem kann die Aufklärung der Mechanismen möglicherweise einen Beitrag zur Schädlingsbekämpfung leisten. Durch Kreuzung oder Gentechnik ist der Mensch in der Lage die pflanzliche Verteidigung zu optimieren und somit Ernteerträge sowie die Holz- oder allgemein Biomasseproduktion zu steigern. So könnten Phytochemikalien z.B. Stress auf herbivore Insekten ausüben und damit die Anfälligkeit gegenüber Insektiziden erhöhen.

In dieser Diplomarbeit sollten die grundlegenden Abläufe der chemischen Verteidigung der Baumart *Populus nigra* aufgeklärt werden. Im Mittelpunkt stand dabei die Identifikation von Pflanzenstoffen, die im weitesten Sinne an der Abwehr von herbivoren Insekten beteiligt sein können und deren Produktion als Reaktion auf einen Herbivorenbefall verstärkt wird.

3.1 Allgemeine Begriffsdefinitionen

Die Maßnahmen, die Pflanzen gegen ihre Fraßfeinde ergreifen, sind das Resultat einer Jahrmillionen dauernden Koevolution. Da sowohl die höheren Pflanzen (rund 300 000 Arten (Schoonhoven 2006)) als auch die Pflanzenfresser (herbivore Insekten allein 400 000 Arten (Schoonhoven 2006)) eine enorme Zahl von Spezies umfassen, haben sich auf Seiten der Pflanzen die unterschiedlichsten Verteidigungsstrategien entwickelt. Diese werden in der Fachliteratur in mehrere Klassen unterteilt. Die Einteilung ist jedoch nicht vereinheitlicht, deshalb werden in diesem Kapitel zum klaren Verständnis einige Begriffe definiert. Jeder defensiven Maßnahme werden dabei drei Charakteristika zugeordnet. Die Mittel der Pflanze sind demnach entweder:

- physikalisch, chemisch oder biochemisch
- induzierbar oder konstitutiv
- direkt oder indirekt

Zum Teil können die Begriffe universal auf die Verteidigung gegen Herbivore (Pflanzenfresser), Pathogene und Pilze angewendet werden. In dieser Diplomarbeit stehen jedoch Fraßschäden von Raupen im Vordergrund, weshalb sich die Begriffsdefinition an der Abwehr von Insekten orientiert.

3.1.1 Physikalische, chemische und biochemische Verteidigung

In die Kategorie der physikalischen Verteidigung fallen alle Pflanzenstrukturen, die sich nachteilig auf Pflanzenfresser auswirken, indem sie z.B. die Nahrungsaufnahme oder die Eiablage behindern. Dazu zählen makroskopische und mikroskopische Strukturen wie Dornen, Stacheln, Blatthaare (Trichome) oder die auf allen Blättern vorhandene Wachsschicht (Cuticula). Wenn die Pflanzenfresser diese ersten Barrieren überwunden haben, werden ihre Kauwerkzeuge bei vielen Pflanzenarten durch die Härte der Nahrung stark beansprucht. In einigen Pflanzenfamilien, z.B. den Süßgräsern (*Poaceae*), ist dieser Effekt besonders ausgeprägt, da sie sehr robuste Silikatpartikel enthalten (Schoonhoven 2006). Auf diese Weise wird die Nahrungsaufnahme der Pflanzenfresser in die Länge gezogen und die Kauwerkzeuge im Extremfall vollkommen abgenutzt.

Zur chemischen Verteidigung gehören alle Sekundärmetaboliten, die Pflanzenfressern im weitesten Sinne Schaden zufügen können. In erster Instanz sind das die sogenannten Fraßabschrecker (engl.: feeding deterrents oder repellents), die die Attraktivität einer Pflanze verringern und damit Fraßschäden vorbeugen (Dethier *et al.* 1960). Weiterhin zählen alle pflanzlichen Verbindungen zu dieser Art der Verteidigung, die beim Verzehr mit aufgenommen werden und im Körper von Herbivoren nachteilige Effekte hervorrufen. Das sind beispielsweise Toxine oder Stoffe, die den Nährwert der Nahrung verringern. Sie sind ein wesentlicher Faktor bei der Wahl der Wirtspflanzen durch Herbivoren. Ferner gehören auch alle Moleküle zur chemischen Herbivorenabwehr, die von geschädigten Pflanzen zur Kommunikation mit höheren Trophieebenen ausgestoßen werden.

In das biochemische Abwehrsegment fallen bestimmte Enzyme oder Proteine, die im Pflanzengewebe enthalten sind und die den Herbivoren schaden. Exemplarisch können hier die in der Pflanzenwelt weit verbreiteten Endochitinasen angeführt werden (Emami *et al.* 2003), die in der Lage sind Chitin zu spalten, das einen wichtigen Bestandteil des Exoskelettes von Insekten und der Zellwand von Pilzen darstellt.

3.1.2 Direkte Verteidigung und indirekte Verteidigung

Die direkten Verteidigungsstrategien einer Pflanze sind unmittelbar gegen Herbivoren gerichtet. Die Wirkung entfaltet sich bei der Interaktion zwischen Pflanzen und Pflanzenfresser und bedarf keiner weiteren Unterstützung (Chen 2008).

Als indirekte Form der Verteidigung werden Verteidigungsstrategien bezeichnet, bei denen die Wirkung auf herbivore Insekten über Umwege unter Einbeziehung dritter Organismen entsteht (Turlings *et al.* 1990; Takabayashi & Dicke 1996; Heil 2008). Die Pflanze kann z.B. durch Botenstoffe natürliche Feinde der herbivoren Insekten anlocken, die deren Population vermindern (z.B. Ishiwari *et al.* 2007). Viele Pflanzen weisen zudem sogenannte Domatia auf, die als Unterschlupf für karnivore oder fungivore Insekten dienen und diese vor klimatischen Einflüssen schützen (Heil 2008).

3.1.3 Konstitutive und induzierbare Verteidigung

Mit wenigen Ausnahmen unterliegen alle Pflanzen in ihrem natürlichen Umfeld interspezifischer Konkurrenz. Dabei entscheidet häufig schnelles Wachstum und effektive Reproduktion über das Überleben, da Sonnenlicht und Nährstoffe nur in begrenztem Ausmaß zur Verfügung stehen. Im Allgemeinen wirken sich aber alle herbivorenabwehrenden Maßnahmen einer Pflanze zunächst nachteilig auf deren Wachstum und Reproduktion aus, da sie Ressourcen in Form von Fotoassimilaten, Stickstoff usw. verbrauchen.

Aus diesem Grund unterhalten Pflanzen nicht grundsätzlich alle zur Verfügung stehenden Verteidigungsmittel. Ein gewisses Maß wird jedoch stets aufrecht erhalten; hierbei spricht man von der konstitutiven Verteidigung. Diese steht immer zur Verfügung und kann auch beim plötzlichen Auftreten von Herbivoren ihre Wirkung entfalten. Im Gegensatz dazu wird die induzierbare Verteidigung nur im Ernstfall als Reaktion auf Schäden mobilisiert. Das erfordert einen gewissen Zeitraum, der von der Abwehrmethode abhängig ist, hilft aber Ressourcen einzusparen. Die Wirksamkeit der induzierbaren Verteidigung gegen herbivore Insekten konnte bereits in zahlreichen Fällen nachgewiesen werden (Kessler & Baldwin 2001; Heil 2004b; Kost & Heil 2005).

Bei vielen Pflanzen kann die induzierbare Verteidigung durch Behandlung mit Jasmonsäure und Methyljasmonat ausgelöst werden. Diese Phytohormone sind erwiesenermaßen an der Signalkaskade zur Aktivierung des defensiven Sekundärmetabolismus beteiligt (Kessler *et al.* 2004).

3.1.4 Priming

Das englische Wort priming, das hier im Sinne von „scharf machen“ zu verstehen ist, beschreibt in der chemischen Ökologie die Vorwarnung der induzierbaren Verteidigung in einem Pflanzengewebe durch die Rezeption von Signalen und ohne dem Auftreten von Schäden. Die Signale können von Teilen derselben Pflanze (intra-plant priming) oder von anderen Pflanzen (inter-plant priming) ausgehen und z.B. auf vaskulärem Wege (nur intra-plant priming (Davis *et al.* 1991)) oder über die Luft (Frost *et al.* 2007) übertragen werden. In letzterem Falle sind höchstwahrscheinlich flüchtige Moleküle (VOC) als Mediatoren zwischen Absender- und Empfängerpflanze beteiligt. Priming

wurde bereits häufig empirisch, u.a. bei Pappeln, beobachtet und kann sich in einer messbaren Aktivierung der induzierbaren Verteidigung äußern (Arimura *et al.* 2004; Heil & Silva Bueno 2007). Allerdings sind auch Fälle bekannt, bei denen zunächst keine beobachtbaren Rückwirkungen im „geprimten“ Gewebe festgestellt wurden, dafür fiel aber die Reaktion der induzierbaren Verteidigung beim Auftreten von Herbivoren schneller oder stärker aus (Frost *et al.* 2007; Frost *et al.* 2008). Obwohl Priming vielfach beobachtet werden konnte, sind die Mechanismen kaum bekannt.

3.2 Der Modellorganismus *Populus*

Die 29 Baumarten der Pappeln (*Populus*), einer Gattung aus der Familie der Weidengewächse (*Salicaceae*), können in der gesamten nördlichen Hemisphäre angetroffen werden (Eckenwalder 1996). Die Gattung umfasst Arten wie die in Europa und Nord-Asien weit verbreiteten *Populus tremula* (Espe) und *P. nigra* (Schwarzpappel) oder die in Nord-Amerika bedeutsamen *P. trichocarpa* (Westliche Balsampappel), *P. balsamifera* (Balsampappel) und *P. tremuloides* (amerikanische Zittelpappel). Pappeln bevölkern vorwiegend Flussufer und gelten wegen ihres schnellen Wachses als Pionierspezies, da sie gestörte Flächen schnell kolonisieren können. Dazu trägt auch die Möglichkeit der vegetativen Vermehrung bei, die es Pappeln ermöglicht, aus Wurzeln oder heruntergefallenen Ästen neue Bäume zu entwickeln. Darüber hinaus neigen viele Pappelarten zur Hybridisierung. Die entstehenden Bastarde sind in einigen Fällen sehr schwer von den unverfälschten Arten unterscheidbar.

Durch den schnellen Zuwachs von Biomasse und die einfache Vermehrung werden Pappeln häufig in der Forstwirtschaft eingesetzt. Dort dienen sie vor allem der Produktion von preiswertem Nutzholz oder als Ausgangsstoff für die Zellstoffherstellung. Derzeit wird der größte Flächenanteil der Nordamerikanischen Holzwirtschaft mit Pappeln und den nahe verwandten Weiden (*Salix*) bewirtschaftet (Coyle *et al.* 2005). Die große Bedeutung der Pappeln für den primären Wirtschaftssektor führte 1947 zur Gründung der *International Poplar Commission* als Teil der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der UN [<http://www.fao.org/forestry/ipc/en/>].

Seit Kürzerem werden Pappeln in der Wissenschaft als Modellorganismen verwendet. Sie stellen perfekte Versuchsorganismen dar, da sie schnell wachsen und sich einfach reproduzieren lassen. Durch vegetative Vermehrung können sie auf unkompliziertem Wege kloniert werden, wodurch mit einfachen Mitteln viele Individuen mit identischem bzw. nahezu identischem Genotyp erzeugt werden können. Weitere wissenschaftliche Impulse sind durch das kürzlich sequenzierte Genom der Pappelart *P. trichocarpa* zu erwarten (Tuskan *et al.* 2006), das als drittes Genom einer Pflanze überhaupt aufgeklärt wurde. DNA Microarrays und eine EST-Datenbank für einige Pappelarten wurden bereits etabliert. Auch aus ökologischen Aspekten ist die wissenschaftliche Arbeit mit Pappeln lohnenswert, da sie im Gegensatz zu anderen klassischen Modellorganismen, wie z.B. der Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana*, eine lange Lebensdauer haben und sekundäres Dickenwachstum aufweisen. Aus diesem Grund sollten sie eine wesentlich langfristige Verteidigungsstrategie verfolgen. Darüber hinaus interagieren Pappeln mit einer großen Anzahl Insektenpezies. Allein in Nordamerika müssen sie sich gegen über 300 und in Europa sogar gegen über 500 Schadinsektenarten zur Wehr setzen (Constabel 2005).

Zusammenfassend sind Pappeln sowohl von einem wissenschaftlichen als auch von einem wirtschaftlichen Standpunkt ein optimaler Organismus zur Erforschung von Interaktionen zwischen Pflanzen und Insekten.

Im Mittelpunkt dieser Diplomarbeit stand die Schwarzpappel (*Populus nigra* L.), deren Verbreitungsgebiet in **Abb. 3.1** dargestellt ist. Die Schwarzpappel ist eine bedrohte Spezies, da Flussauen, die ihren natürlichen Lebensraum bilden, in Europa durch Flussbegradigungen und Baumaßnahmen weitgehend verschwunden sind. Eine weitere Bedrohung besteht durch die Hybridisierung mit anderen Pappelarten, insbesondere durch die im 17. Jahrhundert entstandene Einkreuzung *P. x canadensis* (Smulders *et al.* 2008), einen Hybriden aus *P. nigra* und der nordamerikanischen *P. deltoides*. *P. x canadensis* wurde aus ökonomischen Gründen generiert, da der Bastard günstigere forstwirtschaftliche Eigenschaften als artenreine *P. nigra* aufweist. In Folge dieser Bedrohung wurde die Schwarzpappel in das *European Forest Resources Genetics Programme* (EUFORGEN) aufgenommen und zu Deutschlands Baum des Jahres 2006 gewählt. Das EUFORGEN hat unter anderem die Erhaltung der genetischen Vielfalt in Europas Wäldern zum Ziel. Im Rahmen des Programmes wurden die Standorte vieler

Schwarzpappeln in Deutschland kartografiert, woraus sich der wesentliche Vorteil der Verwendung von *P. nigra* für das Projekt ergab, dem diese Diplomarbeit zu Grunde liegt. Die Kenntnis von Freilandstandorten artenreiner Pappeln war für spätere Experimente maßgeblich und bei einer leicht hybridisierbaren Gattung wie *Populus*, deren Hybride zudem schwer erkennbar sind, von entscheidendem Vorteil.

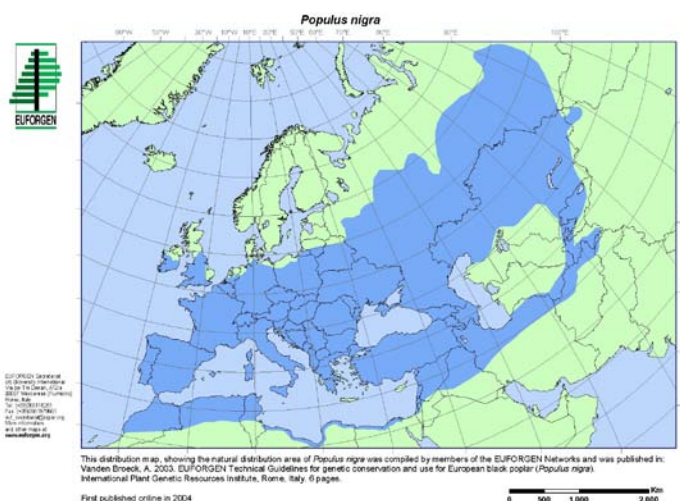


Abb. 3.1 Natürliches Habitat der Schwarzpappel (Quelle: EUFORGEN).

3.3 Der Modellorganismus *Lymantria dispar*

Der Schwammspinner (*Lymantria dispar* LINNAEUS, 1758) gehört zu der Ordnung der Schmetterlinge (*Lepidoptera*) und ist ein sogenannter Nahrungsgeneralist. Die Raupen dieser Spezies verspeisen das Blattwerk von fast jedem Laubbaum, den sie in ihrem Lebensraum antreffen (Ebert 1994). Bei starkem Nahrungsmangel durch Kahlfraß dringen sie auch in landwirtschaftlich genutzte Flächen wie Getreide- und Erdbeerbelder vor. Das ursprüngliche Verbreitungsgebiet umfasst Europa, Nordafrika und Asien. 1868 ist der Schwammspinner nach Nordamerika eingeschleppt worden, wo es seitdem in regelmäßigen Abständen zu Massenvermehrungen kommt, bei denen verheerende Schäden durch die massive Entlaubung ganzer Landstriche entstehen. 1993 kam es in Baden-Württemberg zu einer Schwammspinner-Kalamität, bei der über 10 000 ha Mischwald entlaubt wurden (Ebert 1994).

Als Folge dieser ökologischen und wirtschaftlichen Relevanz ist und war die Spezies *L. dispar* Gegenstand unzähliger wissenschaftlicher Studien, von denen viele auf die

Bekämpfung des Schädlings abzielten und von denen hier nur einige genannt werden können (Fajvan *et al.* 2008; Onufrieva *et al.* 2008; Whittle *et al.* 2008). Zur Erforschung der Herbivorenresistenz in *Populus* bietet sich der Schwammspinner an, da Pappeln zu seiner natürlichen Nahrung gehören und die Anzucht ohne weiteres im Labor durchgeführt werden kann.

3.4 Die Verteidigung von Pappeln gegen herbivore Insekten

Motiviert durch die forstwirtschaftliche Bedeutung und durch die oben erwähnten Vorzüge der Pappel als Modellorganismus wurden bereits eine Reihe von Untersuchungen über die Verteidigung der Gattung *Populus* gegen herbivore Insekten durchgeführt. Dabei wurden vor allem die chemische und die biochemische Abwehr betrachtet. Die gewonnenen Erkenntnisse waren bereits Gegenstand einiger Übersichtsartikel (Constabel 2005; Philippe & Bohlmann 2007) und sollen im Folgenden kurz zusammengefasst werden.

3.4.1 Flüchtige organische Verbindungen (Volatile organic compounds VOC)

Landpflanzen geben einen VOC-Mix in die Atmosphäre ab, dessen Menge und Zusammensetzung in der Folge von Stress, wie z.B. eines Schädlingsbefalls, verändert werden kann (Holopainen 2004). In der Regel ist die Erhöhung der VOC-Emission die schnellste und deutlichste Reaktion einer Pflanze auf Insektenfraß und stellt deshalb den Archetypus der induzierbaren Verteidigung dar. Dieses allgemeine Phänomen wurde auch bei Pappeln beobachtet (Arimura *et al.* 2004; Frost *et al.* 2007). Die Aufgaben und Wirkungen der VOCs sind sehr komplex und werden bisher kaum verstanden. Im Zusammenhang mit der chemischen Verteidigung werden Effekte wie Herbivorenabschreckung (Heil 2004a), Bakterien- und Pilzabwehr (Hamilton-Kemp *et al.* 1998; Archbold & Hamilton-Kemp 2000) Kommunikation zwischen Pflanzen (Frost *et al.* 2007; Heil & Silva Bueno 2007) und indirekte Verteidigung durch Anlockung von Parasiten und Prädatoren (Kessler & Baldwin 2001) diskutiert. Die indirekte Verteidigung durch VOC konnte bei Schwarzpappeln bereits beobachtet werden, indem die Attraktivität von verwundeten und unverwundeten Blättern gegenüber der parasitären Wespe *Glyptapanteles flavicoxis* (Hymenoptera: Braconidae) in olfaktometrischen Tests untersucht wurde. Die Wespen, die auch *L. dispar* Raupen

parasitieren, zeigten deutliche Präferenzen für die verwundeten Blätter (Havill & Raffa 2000). Allerdings wurden auch schon nachteilige Auswirkungen der VOC nachgewiesen, in dem sie zum Beispiel Herbivoren bei der Erkennung ihrer Wirtspflanzen helfen (Muller & Hilker 2000; Li *et al.* 2005).

Obwohl einige VOCs in der Pflanzenwelt weit verbreitet sind, ist die genaue Zusammensetzung des VOC-Bouquets meist art-typisch und kann sogar zwischen Klonen einer Art variieren. Bei chemischer Betrachtung lassen sich die VOC anhand struktureller Ähnlichkeiten klassifizieren. Chemische Übereinstimmungen sind häufig auf ähnliche Biosynthesewege zurückzuführen. Die beiden bedeutsamsten Oberklassen der VOC, Green Leaf Volatiles (GLV) und Terpenoide, sollen hier kurz skizziert werden.

Green Leaf Volatiles (GLV)

Unter dem Begriff GLV werden C₆-Aldehyde und -Alkohole sowie deren Derivate zusammengefasst, die bei der Zersetzung von Fettsäuren durch Lipoxygenasen entstehen und die in der Pflanzenwelt sehr weit verbreitet sind (D'Auria *et al.* 2007). Die Biosynthese eines der wichtigsten GLV, (Z)-3-Hexenylacetat, ist in **Abb. 3.2** dargestellt. GLV entstehen in großen Mengen bei der Zerstörung von pflanzlichen Zellmembranen. Bei gaschromatographischen Analysen des Bouquets von Blättern der Pappelart *Populus nigra italica* wurden neben den kurzkettigen GLV (Z)-3-Hexenal und (Z)-3-Hexenol auch (Z)-3-Hexenylacetat nachgewiesen (Li *et al.* 2005). GLV werden wegen ihres häufigen Auftretens eine große Anzahl von Aufgaben zugesprochen. So sollen sie beispielsweise bei der Anlockung von Bestäubern, bei der indirekten Verteidigung und bei der Abwehr von Bakterien und Pilzen beteiligt sein (D'Auria *et al.* 2007). Neben diesen dienlichen Effekten werden vor allem im Fall der GLV negative Auswirkungen auf die emittierende Pflanze diskutiert, weil sie beispielsweise von herbivoren Insekten bei der Ortung ihrer Nahrung verwendet werden (de Groot *et al.* 2008)

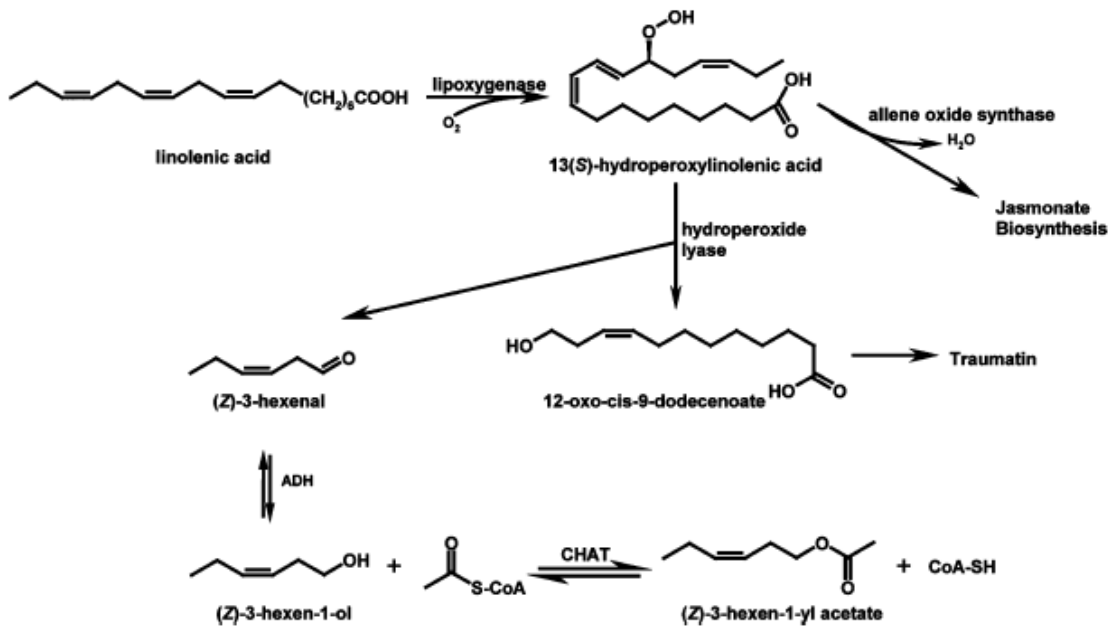


Abb. 3.2 Biosyntheseweg von (Z)-3-Hexenylacetat aus Linolensäure (D'Auria *et al.* 2007).

Terpenoide

Unter Terpenoiden werden die Kohlenwasserstoffe der Terpene und deren Derivate, wie z.B. Terpenalkohole, zusammengefasst. Formal können Terpene als Abkömmlinge des Isoprens aufgefasst werden, wobei aus der Anzahl der Isopreneinheiten die Einteilung in die Terpenunterklassen erfolgt. Hemiterpene enthalten nur eine Isopreneinheit, Monoterpene zwei, Sesquiterpene drei, Diterpene vier usw. Die strukturelle Regelmäßigkeit ergibt sich aus der Biosynthese der Terpene, die nach heutigen Kenntnissen stets über eine biologisch aktivierte Form des Isoprens, dem Isopentenylpyrophosphat (IPP) bzw. dessen Isomer Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), abläuft (Abb. 3.3, (McGarvey & Croteau 1995)). Für den Terpengrundbaustein IPP sind bisher zwei Biosynthesewege aufgeklärt worden: Der Mevalonat-Weg und der MEP-Weg (2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat), die jeweils nach wichtigen Intermediaten benannt sind. Monoterpene werden durch Monoterpensynthasen aus Geranylpyrophosphat gebildet, das durch die enzymatische Verknüpfung von IPP- und DMAPP entsteht (Abb. 3.3). Durch die sukzessive Anlagerung von weiterem IPP an Geranylpyrophosphat werden die Vorstufen der Sesquiterpene (FPP=Farnesylpyrophosphat) und Diterpene

(GGPP=Geranylgeranylpyrophosphat) gebildet, die durch Terpensynthasen in die Endprodukte umgeformt werden (McGarvey & Croteau 1995).

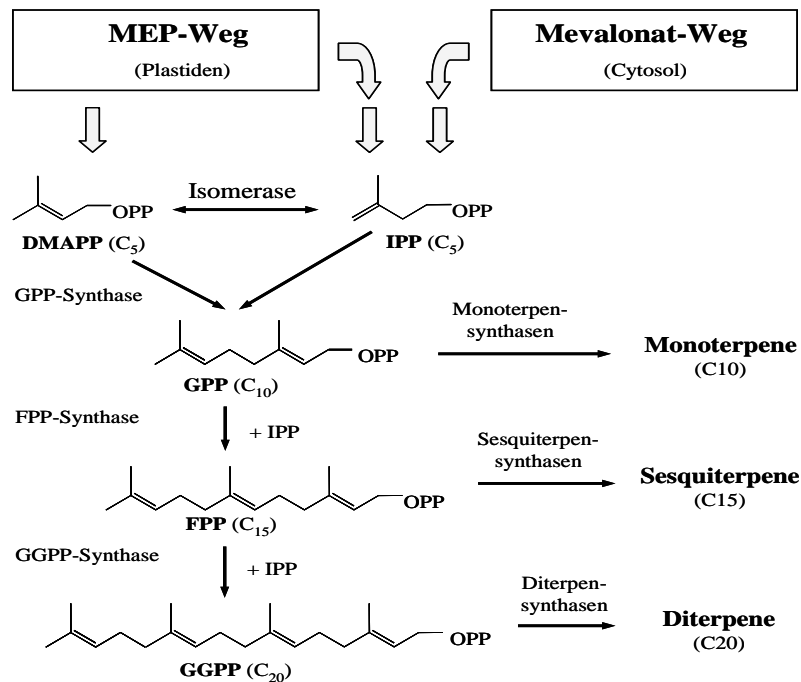


Abb. 3.3 Bioynthese der Mono-, Sesqui-, und Diterpene in höheren Pflanzen (Köllner 2004).

In der hybriden Pappel *Populus trichocarpa x deltoides* wurde bereits die gesteigerte Produktion von verschiedenen Terpenen als Reaktion auf den Angriff herbivorer Insekten mit Hilfe von VOC-Messungen festgestellt (Arimura *et al.* 2004). Dabei konnte auch die erhöhte Expression einer (-)-Germacren-D-Synthase in beschädigten Blättern sowie in unbeschädigten, stamm-aufwärts gelegenen Blättern beobachtet werden, was für eine vaskuläre Signalübertragung spricht. In einer weiteren Publikation wurde bei *Populus deltoides x nigra* in Laborexperimenten gezeigt, dass Bäume im Fall einer Herbivorie mehr Terpenoide emittieren, wenn das Blattwerk zuvor mit dem VOC-Bouquet beschädigter Individuen derselben Art in Kontakt gebracht wurde (Frost *et al.* 2007).

3.4.2 Verteidigung mit nichtflüchtigen organischen Verbindungen

Kondensierte Tannine (KT, auch: Proanthocyanidine)

Kondensierte Tannine (KT), auch Proanthocyanidine genannt, sind oligomere oder polymere Strukturen, die aus C-C-verknüpften Polyhydroxy-flavan-3-ol-Untereinheiten bestehen (**Abb. 3.4**). Da sowohl 8,4- als auch 6,4-Verknüpfungen auftreten und die Kettenlänge sehr variabel sein kann (Ayres *et al.* 1997; Schofield *et al.* 2001), umfasst der Oberbegriff „kondensierte Tannine“ strukturell sehr unterschiedliche Biopolymere. Sie sind in der Pflanzenwelt weit verbreitet und werden aus Phenylalanin über den Shikimatweg aufgebaut. KT wird eine nährwertvermindernde Wirkung zugesprochen, da sie durch ihre zahlreichen Hydroxygruppen Proteine oder Enzyme vernetzen und dadurch unbrauchbar machen können. Der Effekt ist jedoch von der Proanthocyanidinstruktur und zudem stark von der Anfälligkeit der Herbivoren abhängig. In einer umfassenden Studie mit den Larven von sechs verschiedenen pflanzenfressenden Insektenarten wurde eine sehr variable, aber im Durchschnitt mäßige antiherbivore Wirkung festgestellt (Ayres *et al.* 1997). Bei *L. dispar* Raupen, die mit Blättern unterschiedlichen KT-Gehaltes der Pappelart *P. tremuloides* ernährt wurden, wurde durch den Genuss von Blättern mit höheren Gehalten keine nachteiligen Auswirkungen auf wichtige körperliche Merkmale wie das Puppengewicht beobachtet (Hwang & Lindroth 1997; Osier *et al.* 2000a). Tatsächlich intensivieren die Raupen ihre Nahrungsaufnahme mit steigendem KT-Massenanteil, was wahrscheinlich auf den verringerten Nährwert der Nahrung zurückzuführen ist. Trotz dieses vergleichsweise schwachen Einflusses auf einen Generalisten wie *L. dispar* sind KT in *P. tremuloides* induzierbar (Peters & Constabel 2002) und können zwischen 0,5 und 20 % der Trockenmasse eines Pappelblattes ausmachen (Philippe & Bohlmann 2007). Andere Sekundärmetabolite der Pappeln, wie z.B. phenolische Glykoside, sind in deutlich kleineren Dosen wesentlich wirksamer (Ayres *et al.* 1997; Hwang & Lindroth 1997). Die erhebliche Aufwendung von Ressourcen bei nur begrenztem erkennbarem Effekt lässt den Schluss zu, dass KT andere Aufgaben erfüllen und nicht ausschließlich gegen Herbivoren gerichtet sind.

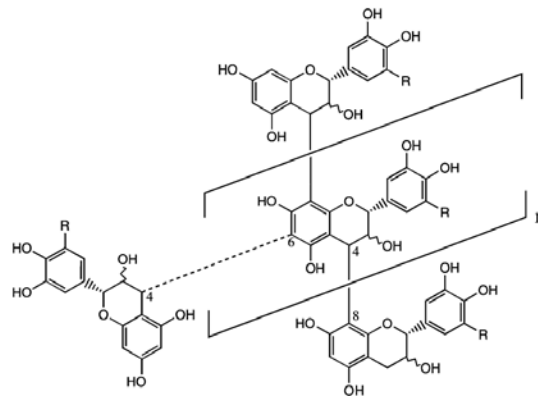


Abb. 3.4 Aufbau kondensierter Tannine (aus Schofield 2001).

Phenolische Glykoside (PG)

Der Grundbaustein der phenolischen Glykoside (PG) ist das Salicin, ein β -Glycosid des Salicylalcohols (Abb. 3.5). Höhere PG entstehen durch Veresterung der OH-Gruppen des Salicins, die in der Regel an der verbleibenden Hydroxylgruppe des Salicylalkohols und/oder am C-2-Atom des Zuckers stattfindet. Die Substanzklasse ist in der Familie der *Salicaceae* weit verbreitet, wobei viele Arten jedoch nur bestimmte PG enthalten. Aus diesem Grund wurde bereits versucht, die PG zur chemotaxonomischen Bestimmung von schwer unterscheidbaren *Salicaceae* zu verwenden (Julkunentiitto 1986). Von den bisher 20 in *Salicaceae* identifizierten Vertretern der Stoffgattung (Tsai *et al.* 2006) sind Salicin, Salicortin und Tremulacin die prominentesten (Abb. 3.5). Über die Biosynthese der PG ist bisher wenig bekannt. Der Ausgangspunkt ist jedoch, wie bei den KT, die Shikimisäure (Tsai *et al.* 2006).

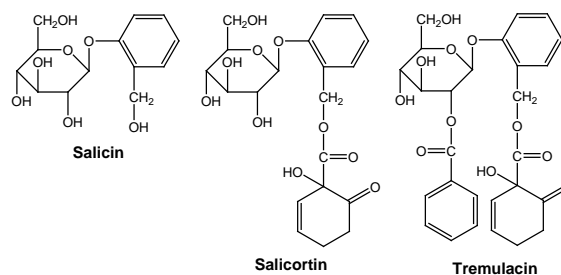


Abb. 3.5 Die drei häufigsten phenolischen Glykoside der Gattung *Populus*.

Im Gegensatz zu den KT wurde den PG in verschiedenen Bioassays eine ausgeprägte Toxizität gegen Insektenlarven, unter anderem *L. dispar*, nachgewiesen. Die Auswirkungen der PG der Pappeltart *P. tremuloides* auf die Fitness von *L. dispar* umfassen z. B. die Reduzierung Puppengewichte, die zeitliche Verlängerung der Larvenstadien und die Verminderung der Fruchtbarkeit der adulten Tiere (Ayres *et al.* 1997; Hwang & Lindroth 1997; Osier *et al.* 2000a). Das toxische Potential geht wahrscheinlich von den Metaboliten der PG aus, die durch die Einwirkung von Enzymen im Verdauungstrakt der Herbivoren gebildet werden. Aus diesem Grund hat die chemische Struktur Einfluss auf die Toxizität, die von den obengenannten Stoffen von Salicin über Salicortin zu Temulacin zunimmt. Es wird vermutet, dass PG mit einem 6-Hydroxycyclohexenon-Rest, wie z.B. Salicortin oder Tremulacin, besonders giftig sind. Bei deren Verdauung wird 6-Hydroxycyclohexenon (6-HCH) freigesetzt, das ein starkes Elektrophil darstellt und mit nucleophilen Biomolekülen wie Proteinen oder Nukleinsäuren reagieren kann (Clausen *et al.* 1989). Allerdings kann 6-HCH unter den basischen Bedingungen, die im Verdauungstrakt vieler Herbivoren herrschen, zum toxischen Brenzcatechin umgesetzt werden (**Abb. 3.6**, (Clausen *et al.* 1989)). Polyphenoxidasen, die zum biochemischen Verteidigungsarsenal von Pappeln gehören, könnten die Umsetzung von Brenzcatechin zu o-Chinon katalysieren. o-Chinon ist ein starkes Oxidationsmittel, das im Herbivorendarm unspezifisch andere Moleküle oxidieren könnte.

Die Angaben über die Induzierbarkeit von PG nach Schäden an Pappelblättern sind in Fachliteratur widersprüchlich. Sie reichen von einer messbaren Induktion innerhalb von 24 h (Clausen *et al.* 1989) über die Beobachtung einer schwachen Kurzzeit- aber ausgeprägten Langzeitinduktion (Stevens & Lindroth 2005) bis hin zu keinen messbaren Änderungen (Osier & Lindroth 2004).

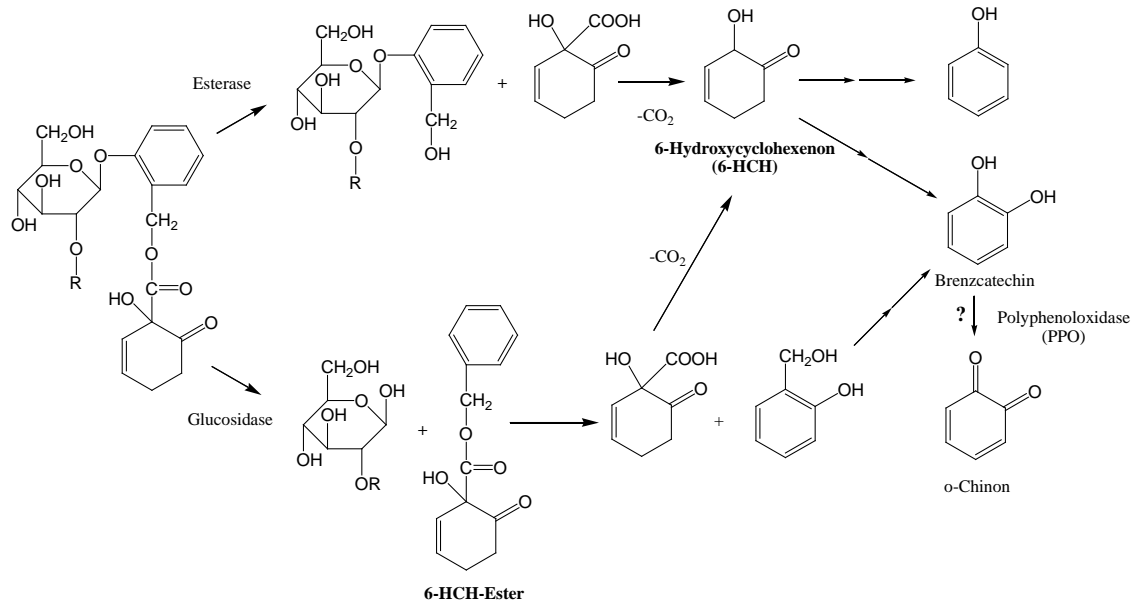


Abb. 3.6 Vermuteter Metabolismus von 6-HCH-haltigen phenolischen Glykosiden (Clausen *et al.* 1989). 6-HCH entsteht bei der spontanen Decarboxylierung der durch Esterasen freigesetzten β -Ketocarbonsäure. Aus 6-HCH entsteht unter basischen Bedingungen Brenzcatechin, welches durch Polyphenoloxidasen zu *o*-Chinon oxidiert werden könnte.

Biochemische Verteidigung

In dieser Kategorie pflanzlicher Verteidigungsstrategien sind drei Klassen von Verbindungen bekannt, die alle durch Verwundung induziert werden (Constabel 2005; Philippe & Bohlmann 2007). Kunitz Protease Inhibitoren sind eine Proteinfamilie, deren Aufgabe in der Inhibierung von peptidspaltenden Verdauungsenzymen besteht. Die Verfügbarkeit von Eiweißen ist für Insekten sehr wichtig. Ein Aminosäuremangel kann eine verlangsamte Entwicklung und im Ernstfall den Tod nach sich ziehen.

Chitinasen, eine chitinzersetzende Enzymfamilie, und Polyphenoloxidasen (PPO) werden ebenso in Pappeln gefunden. Chitin ist der Strukturbestandteil des Exoskeletts von Insekten und der Zellwand von Pilzen und wird durch Chitinasen gespalten. PPO sind in der Pflanzenwelt weit verbreitet und werden in Pappelblättern nach Gewebeverwundungen gebildet (Constabel *et al.* 2000). Sie katalysieren u.a. die Reaktion von Polyphenolen zu Chinonen, die als starke Elektrophile mit vielen Biomolekülen reagieren können. Die Wirksamkeit der in Pappeln gebildeten PPO gegen Insektenlarven wurde nach positiven Befunden (Wang & Constabel 2004) zuletzt wieder in Frage gestellt (Barbehenn *et al.* 2007). Ihr Auftreten in Pappeln ist trotzdem

bemerkenswert, da im Verdauungstrakt von Herbivoren zusammen mit den PG synergistische Effekte auftreten könnten (**Abb. 3.6**). Auf die biochemische Verteidigung von Pappeln wird im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen.

3.4.3 Beziehung zwischen kondensierten Tanninen und phenolischen Glykosiden

Untersuchungen an *P. tremuloides* haben ergeben, dass der Gehalt der PG in den Blättern negativ mit dem Alter der Bäume und negativ mit dem Massenanteil der KT korreliert ist (Donaldson *et al.* 2006). Große Mengen PG wurden hauptsächlich in den Blättern junger Bäumen gefunden. Mit zunehmendem Alter sinkt der Gehalt immer weiter ab. Bei den KT wurde ein inverses Verhalten beobachtet. Das gleiche Muster wird bei Blättern von *P. tremuloides* auch innerhalb einer Vegetationsperiode mit fortschreitendem Blattalter beobachtet (Lindroth *et al.* 1987; Bingaman & Hart 1993; 2000b). Es ist davon auszugehen, dass es sich dabei um ein allgemeines Phänomen in der Gattung *Populus* handelt. Der quantitative Vergleich der Sekundärmetabolite von sollte bei Pappeln immer vor dem Hintergrund altersabhängiger Schwankungen betrachtet werden.

3.4.4 Source-Sink-Relationship

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Betrachtung der Induktion von Blattchemikalien ist das sogenannte Source-Sink-Relationship. Junge, nicht vollständig entwickelte Pappelblätter (Sink) betreiben nur schwache Photosynthese und importieren Fotoassimilate von den etwas älteren Blättern (Source), die bereits völlig photosynthetisch aktiv sind (Arnold & Schultz 2002). Aufgrund des Gefäßaufbaus in Pappeln sind nur bestimmte Blätter miteinander verbunden, womit sich zwischen klar definierbaren Blättern Source-Sink-Relationships ergeben. Die stärkste Verbindung besteht zwischen jedem sechstem Blatt. In diesem Zusammenhang wird häufig die LPI-Konvention (Leaf Plastochron Index) verwendet (Davis *et al.* 1991; Frost *et al.* 2007), wobei ein LPI n Blatt mit dem LPI $n+5$ Blatt vaskulär stark verbunden ist. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Verwundung des Source-Blattes wundinduzierte Gene besonders im Sink-Blatt exprimiert werden (Davis *et al.* 1991). Ferner ergaben Experimente mit ^{13}C -markiertem CO_2 , dass bei Verwundung des Sink-Blattes der Import von Fotoassimilaten forciert wird und diese für den Aufbau von KT verwendet

werden (Arnold & Schultz 2002). Als Folge des Source-Sink-Relationships verläuft Priming über vaskuläre Verbindungen hauptsächlich apikal (Arimura *et al.* 2004), also in Richtung des Triebes und nicht in Richtung der Wurzeln, da in diese Richtung der größte Stoff- und Signaltransport stattfindet. Dies sollte vor allem bei der Analyse der induzierbaren Blatinhaltsstoffe beachtet werden, da z.B. bei Herbivorie an den jungen Blättern keine systemische Reaktion in älteren Blättern erwartet werden kann, sofern nicht-vaskuläre Singalübertragungswege keine Bedeutung haben.

4 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Diese Diplomarbeit war Teil eines Projektes, dessen fundamentale Fragestellung die Rolle von VOC beim Priming von Pappeln betraf. Frost *et al.* (2007) konnten bereits in Laborversuchen an dem Pappelhybriden *P. deltoides x nigra* Priming durch VOC und auf vaskulärem Wege beobachten. VOC geprimte Blätter reagierten in dem Experiment bei Herbivorie mit einer ihrerseits stärkeren VOC-Emission verglichen mit Kontrollblättern. Bei vaskulärem Priming wurde dagegen eine schnellere, im Ausmaß aber identische Reaktion der VOC-Abgabe der geprimten Blätter relativ zu den Kontrollen beobachtet. In weiterführenden Studien konnten Frost *et al.* (2008) zeigen, dass das GLV (Z)-3-Hexenylacetat beim atmosphärischen Priming wahrscheinlich große Bedeutung hat.

Wie im Fall von Frost, der ausschließlich die VOC-Emission und die Transkription eines Kunitz Protease Inhibitors beobachtete, konzentrieren sich die Betrachtungen beim Priming bisher nur auf kleine Ausschnitte des Verteidigungsarsenals einer Pflanze. Das Projekt, dem diese Diplomarbeit zu Grunde lag, sollte aufklären, ob die Rezeption bestimmter VOC zu einer umfassenden Reaktion der induzierbaren Verteidigung führen kann und vor allem ob diese Mechanismen in der freien Natur tatsächlich bedeutend sind. Die Untersuchungen sollten an dem Modellorganismus *P. nigra* durchgeführt werden. Als Ausgangspunkt des Projektes sollte in dieser Diplomarbeit ein möglichst umfassendes Profil der antiherbivoren Sekundärmetaboliten von *P. nigra* erstellt werden. Neben den VOC galt dabei ein wesentliches Interesse den nichtflüchtigen Verteidigungsmetaboliten, wie den KT oder PG. Eine Induktion dieser Stoffgruppen sollte voraussichtlich mehr Zeit als bei den VOC beanspruchen, da sie bereits einen bedeutenden Teil der Trockenmasse von Pappelblättern ausmachen und eine Anreicherung mit einem großen Energieaufwand für die Pflanze verbunden sein müsste. Daher wäre die vorzeitige Induktion dieser Substanzen durch Priming besonders wichtig, um einen rechtzeitigen Wirkungseintritt bei massiver Herbivorie zu gewährleisten. In dieser Arbeit sollte zunächst die Induzierbarkeit der VOC, PG und KT von *P. nigra* abgesichert und der Zeitraum für eine messbare Induktion ermittelt

werden. Dafür sollten im Zuge der experimentellen Tätigkeiten folgende Aufgaben bearbeitet werden:

- Entwicklung von Analysemethoden zur Bestimmung von KT und PG in Pappelblättern
- Identifikation der wichtigsten VOC und PG von *P. trichocarpa* und *P. nigra*
- Aufklärung des Verhaltens der VOC von *P. nigra* und *P. trichocarpa* in der Folge von verschiedenen Behandlungen
- Beobachtung des zeitlichen Verlaufes der VOC, PG und KT von *P. nigra* nach einem Insektenbefall

Nach der analytischen Methodenentwicklung, die vorwiegend mit eingefrorenem Pflanzenmaterial des Vorjahres durchgeführt wurde, sollten zwei Experimente durchgeführt werden. Das erste Experiment zielte auf Identifikation der wichtigsten Verteidigungsmetabolite von *P. trichocarpa* und *P. nigra* ab und sollte das Verhalten der VOC beider Pappelarten nach Raupenfraß und mechanischer Verwundung aufklären. Der Vergleich mit *P. trichocarpa* sollte eine Abschätzung der Unterschiede im Sekundärmetabolitenprofil zwischen Pappelarten ermöglichen. Im zweiten Experiment sollten die quantitativen Änderungen der antiherbivoren Sekundärmetaboliten von *P. nigra* nach einem Raupenangriff über einen längeren Zeitraum beobachtet werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Experimente der Methodenentwicklung

5.1.1 Methodenentwicklung zur Analyse der kondensierten Tannine (KT)

5.1.1.1 Motivation und Vorgehensweise

Die Bestimmung von KT ist trotz diverser Analyseverfahren wegen der strukturellen Diversität schwierig und war bereits Gegenstand mehrerer Übersichtsartikel (Waterman & Mole 1994; Hagermann *et al.* 1997; Schofield *et al.* 2001). KT mit unbekannter Struktur können derzeit nur mit großem Aufwand quantitativ analysiert werden. Das hier angewendete Verfahren stellte eine Variante des Verfahrens nach Porter dar, dessen Grundlagen unter **7.7** dargestellt sind. Es beruht auf der Spaltung der KT-Polymere in farbige Monomere, die spektrophotometrisch quantifiziert werden. Das ursprüngliche Verfahren ist weit verbreitet (Julkunen-Tiitto & Sorsa 2001; Peters & Constabel 2002; Donaldson *et al.* 2006), leidet aber unter verschiedenen Begrenzungen und wird deshalb nur zur halbquantitative Bestimmung von KT empfohlen (Schofield *et al.* 2001). In der Literatur ist die Extraktion der KT aus dem Blattmaterial vor der Spaltung in die farbigen Monomere üblich (Waterman & Mole 1994). Zur Vereinfachung wurde bei dem im Rahmen dieser Diplomarbeit eingesetzten Protokoll auf diesen Schritt verzichtet. Stattdessen wurde die trockene, gemahlene Blattprobe direkt mit dem BuOH-HCl-Aufschlussreagenz zur Spaltung des Polymers behandelt. Aufgrund dieser Modifikation musste die Präzision des Verfahrens charakterisiert werden. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass der Zufallsfehler des abgewandelten Verfahrens klein genug ist, um eine sinnvolle Messung der KT in Pappeln zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden zwei Proben mehrfach vermessen, die bei Vorversuchen die niedrigste und höchste Absorbanz ergeben hatten. Von beiden Proben wurden 5 Einwaagen im Arbeitsbereich zwischen 4 und 6 mg wie unter **7.7** beschrieben analysiert und aus den fünf Datenpunkten eine lineare Regression berechnet. Die Kenndaten der Regression sollten für eine grobe Abschätzung der Analysenpräzision verwendet werden.

5.1.1.2 Ergebnisse der Methodenentwicklung der kondensierten Tannine

Die Regressionsgeraden, die aus den Messergebnissen berechnet wurden, zeigt **Abb. 5.1**. Beide Geraden sind in guter Annäherung linear. Die visuelle Analyse der Residuen ließ auf eine akzeptable Streuung des Analyseverfahrens schließen. Die Regression mit der Probe höheren Gehaltes ergab eine relative Verfahrensstandardabweichung von 3 %, die Verfahrensstandardabweichung der Regression mit der Probe des niedrigen Gehaltes betrug 6 %. Bei den Steigungen und Achsenabschnitte beider Geraden wurden deutliche Unterschiede festgestellt.

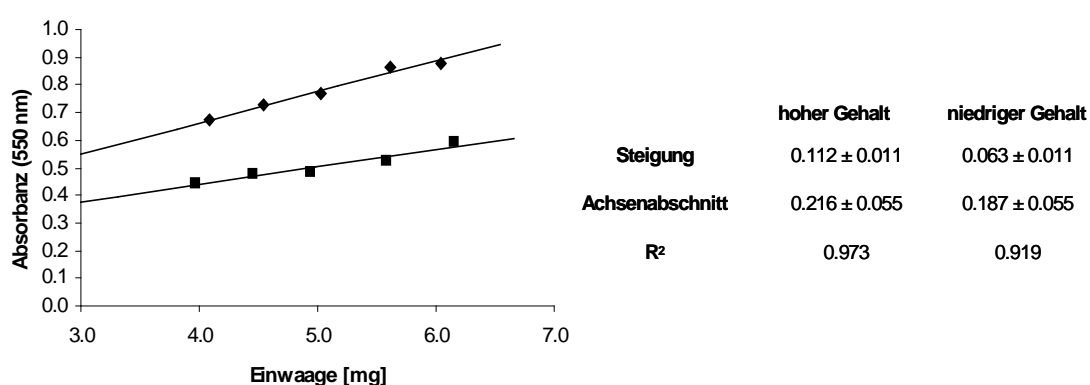


Abb. 5.1 Regressionsgeraden der KT-Proben zur Charakterisierung der Präzision des modifizierten Analyseverfahrens nach Porter. Die Bestimmung erfolgte aus *P. nigra* Blattpulver mit einer Probe höheren Gehaltes (Rauten) und einer Probe niedrigen Gehaltes (Quadrate)

5.1.1.3 Diskussion der Analysenergebnisse

Beide Regressionsgeraden zeigten ausreichende Linearität um eine Bestimmung der KT in Pappelblättern zu ermöglichen. Allerdings sind die Gründe für die deutlichen Abweichungen der Steigungen und Achsenabschnitte beider Geraden unklar. Möglicherweise enthielten die Proben KT mit unterschiedlichen Resten und damit verschiedenen Extinktionskoeffizienten (siehe **7.7.1**). In diesem Fall würde die Eignung des Analyseverfahrens in Frage stehen, da bei dem photometrischen Vergleich eines Analyten in zwei Proben von gleichen Extinktionskoeffizienten in beiden Proben ausgegangen werden muss. Neben unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten bereitet auch die Kettenlänge der kondensierten Tannine Probleme, da die terminale Einheit eines Tanninpolymers bei der Spaltung kein farbiges Molekül bildet (**Abb. 7.2**). Hochpolymerisierte KT mit wenigen terminalen Einheiten erzeugen deshalb höhere

Absorbanzen als KT mit kürzeren Kettenlängen, auch wenn die Gesamtzahl der Monomere im Probenmaterial gleich ist.

Trotz allem wurde in den hier durchgeführten Versuchen die Absorbanz als Indikator für den KT-Massenanteil angenommen, da in den Experimenten die gemittelte Absorbanz von mehreren Replikaten einer Behandlung verglichen wurde. Es konnte davon ausgegangen werden, dass sich eventuelle Schwankungen der Extinktionskoeffizienten oder der KT-Polymerlänge stochastisch auf alle Behandlungen verteilten und sich deshalb ausmittelten, so lange die Behandlungen nicht selbst für Veränderung der Extinktionskoeffizienten oder der KT-Polymerlänge verantwortlich waren. Als Behandlungen wurden Kontrollpflanzen und Pflanzen mit Blattschäden durch Herbivorie oder mechanische Verwundung verglichen. Bei *P. trichocarpa* konnte bereits gezeigt werden, dass mechanische Verwundung der Blätter die Expression eines tanninaufbauenden Enzyms induziert (Peters & Constabel 2002). Es konnte daher als wahrscheinlich angesehen werden, dass eine erhöhte Absorbanz einer Probe mit Blattschäden tatsächlich auf höhere KT-Gehalte zurückzuführen war, auch wenn andere Einflüsse auf die Absorbanz nicht ausgeschlossen werden konnten.

5.1.2 Methodenentwicklung zur Analyse der phenolischen Glykoside (PG)

5.1.2.1 Motivation und Vorgehensweise

Die Analyse von PG in Blattpulver war in der Literatur bereits etabliert. Das in dieser Diplomarbeit verwendete Extraktionsprotokoll wurde mit geringen Änderungen von Julkunen-Tiitto übernommen (Julkunen-Tiitto & Sorsa 2001). Um eine Überladung des Extraktionsmittels zu vermeiden, wurden zwischen 4-6 mg des Blattpulver mehrfach mit MeOH extrahiert. Die Analyse der Extrakte einer Realprobe zeigte, dass drei Extraktionen zur vollständigen Lösung der PG in dieser Masse Blattpulver ausreichen. Bei der flüssigkeitschromatographischen Trennung der Extrakte wurde mit einer NUCLEODUR[®] Sphinxsäule und einem Acetonitril - 0,2% Ameisensäure-Gradienten die besten Ergebnisse erzielt. Mit gewöhnlichen C₁₈-Säulen, wie sie in der Literatur eingesetzt wurden (Julkunentiitto 1989; Fields & Orians 2006), konnte keine gute Peaksymmetrie erreicht werden. Die Peakbreite wurde durch die Zugabe von Wasser zur Probe verringert. Aufgrund der Instabilität der PG im wässrigen Medium

wurde das Wasser erst kurz vor der Injektion durch ein Injektionsprogramm des Autosamplers zugefügt.

Die Präzision des Analyseverfahrens sollte aufgrund der zahlreichen Arbeitsschritte durch ein einfaches Experiment abgeschätzt werden. Dazu wurden fünf Einwaagen einer Realprobe zwischen 4 und 6 mg analysiert und aus den Analyseergebnissen eine Regressionsgerade berechnet.

5.1.2.2 Ergebnisse der Methodenentwicklung der phenolischen Glykoside

Die Probe enthielt Salicin, Salicortin und „Hydroxytremulacin“ (siehe 5.2.4.1). Die lineare Regression über die fünf Datenpunkte beider Verbindungen sind in **Abb. 5.2** dargestellt. Die Geraden zeigten in guter Annäherung eine lineare Abhängigkeit zwischen Einwaage und Absorbanz und eine akzeptabler Streuung der Datenpunkte um die Geraden. Die relative Verfahrensstandabweichung für beide Substanzen betrug 4%.

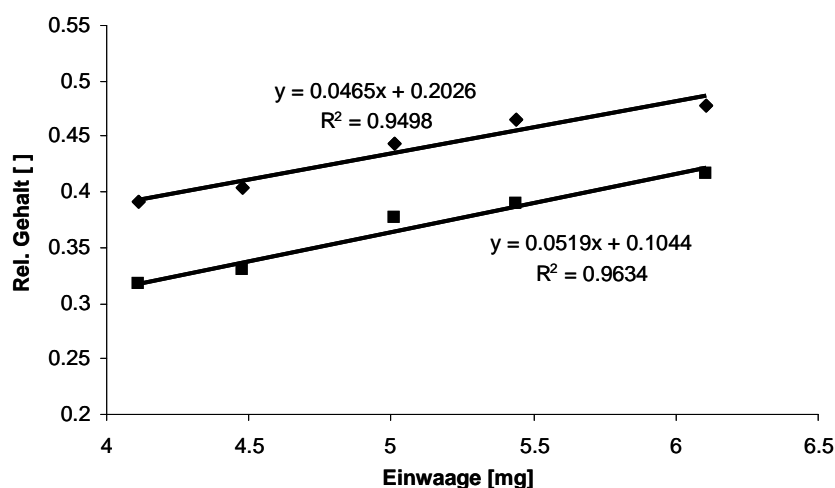


Abb. 5.2 Regressionsgeraden von Salicortin und „Hydroxytremulacin“ zur Abschätzung der Präzision des Verfahrens zur Bestimmung der PG. Rauten zeigen Salicortin, Quadrate zeigen „Hydroxytremulacin“. Die Datenpunkte für die Regression stammen von fünf Einwaagen einer Realprobe von *P. nigra* Blattpulver

5.1.2.3 Diskussion der Ergebnisse

Die Präzision des Verfahrens wurde durch die visuelle Analyse der Residuen für die hier benötigten Zwecke als ausreichend befunden. Durch eine Vereinfachung der Extraktion hätte vermutlich eine bessere Präzision erreicht werden können. Als einer der Gründe für die relativ große Streuung wurde die dreimalige Extraktion angenommen, da bei jeder Extraktion das Extrakt vom Blattpulver dekantiert werden

musste. Dieser Vorgang war vermutlich schlecht reproduzierbar und verursachte deshalb einen großen zufälligen Fehler. Die in der neueren Literatur gängige, einmalige Extraktion mit Ultraschalluntersützung könnte eine Vereinfachung darstellen, so lange eine quantitative Lösung der Analyten aus dem Blattmaterial gewährleistet ist (Fields & Orians 2006).

5.2 Charakterisierung der Sekundärmetaboliten von *P. nigra* und *P. trichocarpa* (Übersichtsanalyse)

5.2.1 Motivation und Vorgehensweise

In diesem Experiment sollten die wichtigsten Sekundärmetaboliten zur Verteidigung gegen herbivore Insekten von *P. nigra* und *P. trichocarpa* identifiziert und deren Verhalten in der Folge von induzierenden Behandlungen (Raupenfraß und mechanische Verwundung) beobachtet werden. Das Hauptaugenmerk galt dabei den VOC. Weiterhin sollte der Gehalt der nichtflüchtigen KT und PG untersucht werden. Die Gegenüberstellung der Sekundärmetabolitenprofile nach Herbivorie und mechanischer Verwundung sollte zeigen, ob die untersuchten Pappelarten spezifische, herbivoreninduzierte Reaktionen zeigen. Außerdem sollte ein Vergleich der beiden Arten einen Eindruck von der strukturellen Variabilität der Sekundärmetaboliten innerhalb der Gattung *Populus* verschaffen. Für das Experiment wurden abgeschnittene Zweige von *P. nigra* und *P. trichocarpa* durch mechanische Verwundung mit einer Lochzange bzw. *L. dispar* Befall induziert und deren VOC-Emission sowie der PG- und KT-Gehalt mit unbeschädigten Zweigen verglichen. Die detaillierte Vorgehensweise wird unter 7.1 beschrieben

5.2.2 Ergebnisse der Analyse der volatilen Stoffe (VOC)

5.2.2.1 VOC-Messung an *P. nigra*

Die typischen GC-Chromatogramme des VOC-Bouquets einer von *L. dispar* befallenen und einer unbehandelten *P. nigra* sind in **Abb. 5.3** gegenübergestellt. Wie die Chromatogramme verdeutlichen, enthielt das VOC-Profil unabhängig von der Behandlung (*E,E*)- α -Farnesen, (*E*)- β -Caryophyllen, DMNT und (*E*)- β -Ocimen als

Hauptkomponenten. Daneben wurde eine Reihe anderer Verbindungen in kleineren Mengen nachgewiesen.

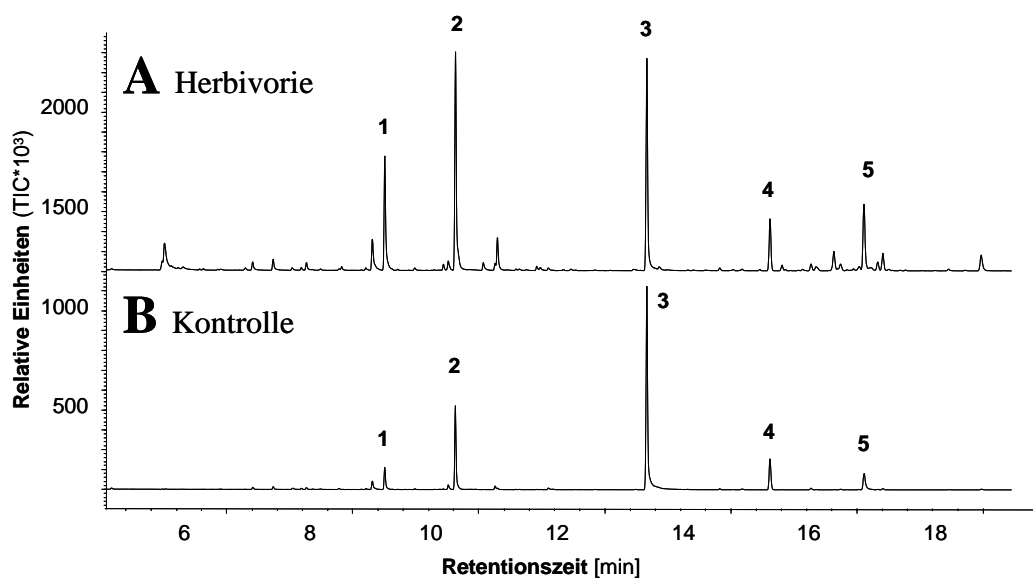


Abb. 5.3 Gaschromatogramm der volatilen Stoffe eines von *L. dispar* Raupen befallenen (A) und eines unbehandelten (B) *P. nigra* Zweiges. Die Stoffe wurden während der 6 stündigen Messung auf 100 mg Super-Q in einem Glasfilter adsorbiert, mit 200 μ L Dichlormethan eluiert und das Eluat mit GC-MS (DB5-MS, TIC) analysiert. (1): (*E*)- β -Ocimen, (2): DMNT, (3): Nonylacetat (IS), (4): (*E*)- β -Caryophyllen, (5): (*E,E*)- α -Farnesen.

Die erfassten Verbindungen zählten zu den Substanzklassen der Sesquiterpenoide, Homoterpenoide und Monoterpenoide. Nicht kategorisierbare Stoffe wurden unter der Bezeichnung „Andere“ zusammengefasst. In der Datenanalyse wurden mit vier Sesquiterpenoiden, einem C₁₁-Homoterpen, sechs Monoterpenen und zwei „Anderen“ insgesamt 13 Verbindungen auf ihr Verhalten bei unterschiedlichen Behandlungen untersucht. Die Ergebnisse sind in **Tab. 5.1** dargestellt. Wie die Zahlen in Klammern verdeutlichen, wurden viele VOC nicht bei allen Individuen gefunden. Diese Tatsache und die große Variabilität in der Menge der abgegebenen volatilen Stoffe verursachten eine große Varianz zwischen den Replikaten einer Behandlung.

Tab. 5.1 Relative Emission [$\text{g}^{-1}(\text{TM})$] der im VOC-Bouquet von *P. nigra* Zweigen untersuchten Substanzen in Abhängigkeit von der Behandlung. Mittelwerte aus $n = 10 \pm \text{SE}$. Die Werte in Klammern geben die Zahl der Individuen an, bei denen die Substanz gefunden wurde. Parameter der statistischen Auswertung: Einweg-ANOVA ($P=0,05$), bei nicht normalverteilten Daten oder Varianzeninhomogenität Rang-ANOVA nach Kruskal-Wallis, Post Hoc nach Tukey ($P=0,05$). Fett gedruckte P-Werte zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen. Im Fall einer ANOVA ist der Prüfwert F, im Fall einer Rang-ANOVA ist der Prüfwert H. Die Ergebnisse des Post Hoc Tests werden durch hochgestellte Kleinbuchstaben angezeigt.

	P	F bzw. H	Kontrolle	<i>L. dispar</i>	Mech. Schaden
Sesquiterpenoide					
(<i>E,E</i>)- α -Farnesen	0.673	H=0.792	36,6 \pm 13,6 (9)	45,9 \pm 9,9 (10)	82,6 \pm 46,0 (10)
(<i>E</i>)- β -Caryophyllen	0.474	H=1.491	20,5 \pm 6,0 (10)	18,1 \pm 5,1 (10)	31,0 \pm 8,0 (10)
Guaiol	0.838	F=0.178	5,4 \pm 2,1 (5)	4,6 \pm 1,0 (9)	6,1 \pm 2,5 (6)
δ -Cadinen	0.338	H=2.168	3,0 \pm 1,5 (4)	3,2 \pm 0,8 (9)	2,8 \pm 1,3 (4)
Homoterpenoide					
DMNT	0.006	H=10.299	25,7 \pm 9,9^a (9)	92,3 \pm 34,8^{ab} (10)	105,3 \pm 24,9^b (10)
Monoterpenoide					
(<i>E</i>)- β -Ocimen	0.110	H=4.408	26,3 \pm 8,5 (10)	58,2 \pm 19,7 (10)	90,4 \pm 28,9 (10)
Eucalyptol	0.513	F=0.684	7,0 \pm 1,2 (9)	7,4 \pm 1,8 (10)	9,3 \pm 2,3 (9)
Camphen	0.883	H=0.249	1,6 \pm 0,6 (6)	1,5 \pm 0,4 (7)	1,4 \pm 0,5 (6)
α -Pinen	0.856	H=0.312	1,1 \pm 0,4 (5)	0,9 \pm 0,3 (5)	0,8 \pm 0,3 (5)
Linalool	0.070	H=5.312	0,5 \pm 0,3 (2)	2,3 \pm 1,5 (6)	3,5 \pm 1,0 (7)
β -Pinen	0.797	H=0.545	0,8 \pm 0,4 (4)	0,4 \pm 0,2 (4)	0,8 \pm 0,3 (5)
Andere					
p-Vinylanisol	0.599	H=1.025	13,3 \pm 6,4 (8)	14,3 \pm 5,7 (10)	12,4 \pm 3,4 (9)
Benzylcyanid	0.017	H=8.098	2,9 \pm 2,0^a (2)	12,6 \pm 5,0^b (9)	6,9 \pm 5,6^a (6)
Total	0,138	H=3,956	144,7 \pm 45,9	261,7 \pm 78,8	353,2 \pm 106,9

Aus **Tab. 5.1** und **Abb 5.3** geht hervor, dass die relative Emission einiger Verbindungen durch den *L. dispar* Befall und/oder mechanische Verwundung erhöht wurde. Die mechanische Verwundung verursachte dabei im Vergleich zu *L. dispar* den stärkeren Effekt, wie die totalen relativen Emissionen der Behandlungen in der letzten Zeile von **Tab. 5.1** zeigen. Im Mittel stieg die VOC-Abgabe der durch die Raupen geschädigten *P. nigra* um etwa das 1,5-fache und die der mechanisch verwundeten Blätter etwa um den Faktor zwei. Trotz dieser großen Unterschiede waren die Ergebnisse aufgrund der großen Varianz nicht signifikant.

Bei der Betrachtung der einzelnen Verbindungen ergab der Vergleich der Behandlungen bei DMNT und Benzylcyanid signifikante Unterschiede. Bei DMNT klassifizierte der Post Hoc Test die Kontrollen und die mechanisch verwundeten Äste unterschiedlich. Die von *L. dispar* befallenen Individuen unterscheiden sich nicht von den beiden

anderen Behandlungsgruppen. DMNT wurde von fast allen Zweigen unabhängig von der Behandlung emittiert. Im Unterschied dazu wurde Benzylcyanid fast ausschließlich bei den herbivor geschädigten Individuen nachgewiesen. Diese emittierten signifikant größere Mengen des Stoffes, als die Kontrollen und die mechanisch verwundeten Zweige.

Im Fall einiger weiterer Verbindungen zeichneten sich durch die Behandlungen Trends in der VOC-Emission ab, die statistisch nicht abgesichert werden konnten. Dazu zählten das Monoterpen (*E*)- β -Ocimen sowie der Monoterpenalkohol Linalool, wie durch die kleinen P-Werte in **Tab. 5.1** deutlich wird. In beiden Fällen bestand der größte Unterschied zwischen den Kontrollen und den mechanische geschädigten Ästen. Bei den Sesquiterpenen (*E,E*)- α -Farnesen und (*E*)- β -Caryophyllen deutete sich ebenfalls eine Steigerung der VOC-Abgabe durch mechanische Verwundung an.

5.2.2.2 Diskussion der VOC-Emission von *P. nigra*

Das VOC-Bouquet der Kontrollzweige von *P. nigra* enthielt bereits nennenswerte Mengen von VOC mit (*E,E*)- α -Farnesen, (*E*)- β -Caryophyllen, DMNT und (*E*)- β -Ocimen als Hauptbestandteilen. In der Folge von Blattschäden durch die Raupen oder mechanische Verwundung traten vor allem quantitative Veränderungen der Abgabe der VOC auf. Mechanische Beschädigungen der Blätter rief dabei gegenüber Raupenfraß die deutlichere Verstärkung der VOC-Emission hervor. Als Resultat der erheblichen Varianz konnten lediglich bei DMNT und Benzylcyanid signifikante Unterschiede beobachtet werden.

Die erfassten Hauptkomponenten sind teilweise mit denen anderer Pappelarten konsistent. Arimuirá *et al.* (2004) berichten bei der Hybridpappel *P. trichocarpa* x *deltoides* über DMNT, Germacren D, (*E*)- β -Ocimen (*E,E*)- α -Farnesen und Linalool als wesentliche Bestandteile des VOC-Bouquets. Frost *et al.* (2007) erfassten im Headspace von *P. deltoides* x *nigra* DMNT, Germacren D, (*E*)- β -Ocimen sowie die beiden Sesquiterpene β -Caryophyllen und α -Farnesen ohne Nennung der (*E*)-(*Z*)-Isomerie. Mit Ausnahme von Germacren D gibt es demnach Übereinstimmungen bei den volatilen Hauptkomponenten der in der Literatur und in dieser Arbeit untersuchten Pappelarten.

Obwohl messbare Veränderungen der VOC-Emission durch die Raupenbehandlung und mechanische Verwundung beobachtet wurden, fiel der Vergleich mit den Kontrollen

weniger eindeutig aus, als erwartet worden war. In ähnlichen Experimenten mit anderen Pflanzenarten wurde über große und häufig signifikante Steigerungen der VOC-Abgabe durch vergleichbare Behandlungen berichtet (Kessler & Baldwin 2001; Heil 2004b; Frost *et al.* 2007). Als Ursache für die kleinen Differenzen zwischen Kontrollen und induzierenden Behandlungen wurde hier eine erhöhte konstitutive Emission der volatilen Stoffe angenommen, die auf einen Herbivorenbefall der Zweige vor Beginn des Experimentes zurückgeführt wurde. Wie unter 7.1 erwähnt wird, stammten die Äste für das Experiment von Bäumen aus dem Freiland. Obwohl visuell keine größeren Schäden an den Blättern festgestellt werden konnten, wurden verschiedene kleinere Herbivoren, z.B. Blattläuse und Thripse, an den Blättern beobachtet. Der Einfluss dieser Organismen wurde allem Anschein nach unterschätzt und verursachte bereits im Vorfeld des Experimentes eine ausgeprägte Produktion vieler VOC. Diese Vermutung wird durch aktuelle Diskussionen in der Fachliteratur unterstützt. So gibt es beispielsweise Hinweise darauf, dass Blattläuse die induzierbare Verteidigung von Baumwollpflanzen (*Gossypium hirsutum*) frühzeitig auslösen und damit einem späteren Raupenbefall entgegenwirken (DeLoach 2008).

Die beobachtete mäßige Induktion der VOCs und insbesondere der schwache Effekt der Raupenbehandlung im Vergleich zur mechanischen Verwundung entspricht nicht den aus der Literatur bekannten Mustern bei Pappeln. Arimura *et. al* (2004) berichteten bei *P. trichocarpa x deltoides* über eine deutliche höheren VOC-Ausstoß bei Individuen, die von *Malacosoma disstria* Raupen beschädigt wurden, als bei Bäumen deren Blattspitzen mit einer Schere abgeschnitten wurden. Das hier die umgekehrten Verhältnisse beobachtet wurden, ist möglicherweise auf die Vorgehensweise im Experiment zurückzuführen. Die Äste von *P. nigra* verfügten über viele und kleine Blätter, die alle mechanisch verwundet wurden, während bei der Raupenbehandlung einige Blätter unbeschädigt blieben. Es ist vorstellbar, dass in den unbeschädigten Blättern die Produktion volatiler Stoffe nicht, oder weniger stark intensiviert wurde. Die Trockenmassen der beschädigten und unbeschädigten Blätter zeigten, dass rund zwei Drittel der Blattmasse Fraßschäden aufwies (Daten nicht gezeigt).

Rückschlüsse auf die biologische Bedeutung der erfassten VOCs sind problematisch, da die Funktionen vieler VOC bisher weitestgehend unbekannt oder hypothetisch sind. Antiherbivore Wirkungen eines gesamten VOC-Bouquets konnte zwar mehrfach

(Kessler & Baldwin 2001; Heil 2004b) und auch im Fall von *P. nigra* (Havill & Raffa 2000) empirisch beobachtet werden, die Rolle einzelner Stoffe ist aber nur in wenigen Fällen bekannt. Im Folgenden sollen einige Berichte über die Wirkungen der Hauptkomponenten und der induzierbaren Verbindungen zusammengefasst werden.

Linalool und Eucalyptol wirken in Konzentrationen von 5 mg/m³ antimikrobiell (Sato *et al.* 2007). Linalool wurde hier zwar nur in sehr kleinen Mengen erfasst, zeigte aber bei der mechanischen Verwundung einen Trend zur Induktion (P=0,07). Eucalyptol wurde bei allen Behandlungen als Nebenbestandteil beobachtet. Es ist denkbar, dass *P. nigra* die Terpenalkohle zur Desinfektion von Wundflächen abgibt.

Bei drei der vier Hauptkomponenten, (*E*)- β -Ocimen, (*E,E*)- α -Farnesen und DMNT, wurde eine anziehende Wirkung auf die Raubmilbe *Neoseiulus womersleyi* nachgewiesen (Ishiwari *et al.* 2007). Dieser Effekt trat jedoch nur auf, wenn die Milben zuvor auf Teepflanzen aufwuchsen, die die entsprechenden Volatile als Reaktion auf einen Schädlingsbefall mit den Beuteorganismen der Raubmilbe emittierten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die anziehende Wirkung bei Mischungen der drei VOC besteht und verloren geht, sobald eine Komponente fehlt.

Tritrophische Effekte wurden auch bei der Hauptkomponente (*E*)- β -Caryophyllen beobachtet (Kollner *et al.* 2008). Das Sesquiterpen wird von Maisblättern als Reaktion auf Fraßschäden durch *Spodoptera littoralis* Raupen abgesondert und zieht parasitoide Schlupfwespen (z.B. *Cotesia marginiventris*) an. Diese legen ihre Eier in den Raupen ab, die beim Schlüpfen der Wespen sterben.

Benzylcyanid wurde als einzige untersuchte Verbindung durch Herbivorie besonders induziert und hat eine attraktive Wirkung auf die eiparasitierende Schlupfwespe *Trichogramma brassicae* (Fatouros *et al.* 2005). Die Substanz dient Kohlweisslingen (*Pieris brassicae*) als Anti-Aphrodisiakum und wird während der Paarung vom Männchen auf das Weibchen übertragen, um dessen Attraktivität gegenüber anderen männlichen Artgenossen zu senken. Die Schlupfwespen nutzen Benzylcyanid dabei als Kairomon um befruchtete Kohlweisslingweibchen zur Phoresie aufzuspüren und deren Eigelege zu parasitieren. In weiterführenden Untersuchungen wurde bewiesen, dass Benzylcyanid von den weiblichen *P. brassicae* bei der Eiablage mit der Eimasse sekretiert wird und bei Kontakt mit Rosenkohlblättern nach 72 h die Produktion von

VOC mit anziehender Wirkung auf *T. brassicae* induziert (Fatouros *et al.* 2008). Folglich kann darüber spekuliert werden, ob die Verbindung bei Pappeln zur indirekten Verteidigung und als Singaltüberträger beim Priming dient. Die Emission von Benzylcyanid nach Raupenfraß wurde auch von Arimura *et al.* (2004) bei dem Pappelhybriden *P. trichocarpa* x *deltoides* beobachtet¹.

Die Ergebnisse der oben genannten tritrophischen Studien sind nicht uneingeschränkt auf *P. nigra* übertragbar, da sie nicht mit Gehölzpflanzen durchgeführt wurden. Die Beispiele können nur andeuten, welcher Art die Wirkung der VOC von *P. nigra* sein könnte. Die Aussagekraft der experimentellen Ergebnisse wird durch einige weitere Faktoren abgeschwächt. Zu diesen Faktoren zählt unter anderem das künstliche Szenario des Experimentes. Wie unter 7.1 beschrieben wird, wurden für das Experiment abgeschnittene Äste als Versuchsobjekte eingesetzt. Das Abschneiden selbst stellte eine mechanische Verwundung dar und kann für die starke Emission der Kontrollzweige verantwortlich gewesen sein. Auswirkungen auf die Nährstoffversorgung mit Rückkopplungen auf den Sekundärmetabolismus können nicht ausgeschlossen werden, auch wenn für die Dauer des Experimentes kein Verwelken der Blätter beobachtet wurde. Außerdem sollten die angegebenen Mengenverhältnisse der Verbindungen untereinander vorsichtig bewertet werden, da die relative Emission mit Hilfe der TIC-Chromatogramme eines massenselektiven Detektors berechnet wurde (7.5.5). Bei der Berechnung wurden die unterschiedlichen Responsefaktoren der Verbindungen bei dieser Detektionsmethode ignoriert. Langkettige Substanzen mit starker Fragmentierung, wie beispielsweise Sesquiterpene, erzeugen im TIC-Modus ein stärkeres Signal als zum Beispiel Benzylcyanid, das aufgrund des stabilen aromatischen Ringes schwach fragmentiert. Auf der Basis der relativen Emission wird die Bedeutung stark fragmentierender Stoffe also systematisch überschätzt. Die totale relative Emission als Summe der Einzelwerte sollte besonders vorsichtig bewertet

werden. Der Vergleich derselben Substanz bei verschiedenen Behandlungen auf der Basis der relativen Emission ist dagegen unproblematisch, so lange annäherungsweise

¹ Arimura *et al.* berichteten über Benzencyanid. Korrespondenz mit dem Autor ergab jedoch, dass die Substanz aller Wahrscheinlichkeit nach falsch benannt wurde und es sich um Benzylcyanid handelte.

eine lineare Abhängigkeit zwischen Response und Konzentration angenommen werden kann.

5.2.2.3 VOC-Messung an *P. trichocarpa*

Abb. 5.4 zeigt die gaschromatographische Analyse der VOC im Headspace eines durch *L. dispar* Raupen beschädigten und einer unbehandelten *P. trichocarpa* Zweiges. Wie die Beispielchromatogramme zeigen, verursachten die GLV (Z)-3-Hexenol, (Z)-3-Hexenal und das Sesquiterpen (*E,E*)- α -Farnesen die größten Peaks, die in **Abb. 5.4** durch die Ziffern 1 und 7 gekennzeichnet sind. Wie bei *P. nigra* wurden außerdem diverse Sesquiterpenoide, Homoterpenoide, Monoterpenoide und „Andere“ detektiert. Neben den Hauptkomponenten (Z)-3-Hexenol und (Z)-3-Hexenal enthielt das VOC-Bouquet weitere GLV.

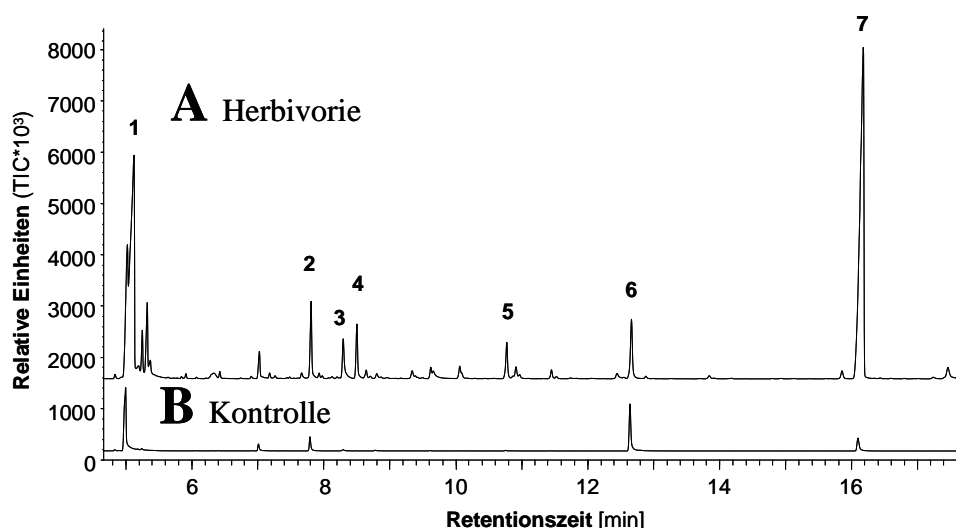


Abb. 5.4 Gaschromatogramm der volatilen Stoffe eines von *L. dispar* Raupen befallenen (A) und eines unbehandelten (B) *P. trichocarpa* Zweiges. Die Stoffe wurden während der 6 stündigen Messung auf 100 mg Super-Q in einem Glasfilter adsorbiert, mit 200 μ L Dichlormethan eluiert und das Eluat mit GC-MS (DB5-MS, TIC) analysiert. (1): (Z)-3-Hexenal/(Z)-3-Hexenol, (2): (Z)-3-Hexenylacetat (3): Eucalyptol, (4): (*E*)- β -Ocimen, (5): (Z)-3-Hexenylbutyrat, (6): Nonylacetat (IS), (7): (*E,E*)- α -Farnesen.

In die Auswertung wurden mit drei Sesquiterpenoiden, einem C_{11} -Homoterpen, acht Monoterpenen, zwei „Andere“ und vier GLV insgesamt 18 VOC einbezogen. Die emittierten Mengen dieser Stoffe in Abhängigkeit von der Behandlung zeigt **Tab. 5.2**. Wie bei der Schwarzpappel wurde auch bei *P. trichocarpa* bei jeder Verbindung eine große Varianz innerhalb der Behandlungen festgestellt.

Tab. 5.2 Relative Emission [g⁻¹ (TM)] der im VOC-Bouquet von *P. trichcarpa* Zweigen untersuchten Substanzen. (Mittelwerte aus n = 10 ± SE). Die Werte in Klammern geben die Zahl der Replikate von n = 10 an, bei denen die Substanz gefunden wurde. Parameter der statistischen Auswertung: Einweg-ANOVA (P=0,05), Bei nicht normalverteilten Daten Rang-ANOVA nach Kruskal-Wallis, Post Hoc nach Tukey (P=0,05). Fett gedruckte P-Werte sind signifikant. Im Falle einer ANOVA ist der Prüfwert F, bei Rang-ANOVA ist der Prüfwert H. Die Ergebnisse des Post Hoc Tests werden durch hochgestellte Kleinbuchstaben angezeigt.

	P	F bzw. H	Kontrolle	Herbivoren	Mech. Schaden
Sesquiterpenoide					
(<i>E</i>)- α -Farnesen	0,05	H=5,977	359,3 ± 138,5 (10)	1067,7 ± 269,8 (10)	1093,2 ± 551,4 (10)
(<i>Z</i>)- α -Farnesen	0,099	H=4,618	5,0 ± 2,4 (6)	18,8 ± 5,5 (9)	20,2 ± 11,4 (8)
Nerolidol	0,161	H=3,658	2,3 ± 1,4 (4)	6,3 ± 2,1 (7)	9,2 ± 4,1 (8)
Homoterpenoide					
DMNT	0,04	F=3,634	9,4 ± 3,7^a (8)	58,1 ± 15,5^b (10)	51,4 ± 17,9^{ab} (10)
Monoterpenoide					
(<i>E</i>)- β -Ocimen	0,001	H=13,213	10,7 ± 5,5^a (8)	108,2 ± 29,1^b (10)	57,8 ± 26,8^{ab} (10)
Eucalyptol	0,073	H=5,223	20,3 ± 8,4 (9)	73,9 ± 27,0 (10)	33,1 ± 8,0 (10)
α -Pinen	0,089	H=4,842	4,1 ± 1,6 (8)	13,0 ± 6,1 (10)	5,6 ± 1,9 (10)
Sabinen	0,048	H=6,056	1,2 ± 0,8^a (4)	6,2 ± 3,3^b (9)	2,4 ± 0,7^{ab} (8)
γ -Terpinen	0,095	H=4,712	1,7 ± 0,8 (6)	5,7 ± 2,1 (9)	2,8 ± 0,8 (8)
Limonen	0,129	H=4,095	1,3 ± 0,6 (6)	5,5 ± 3,1 (9)	2,2 ± 0,6 (8)
β -Pinen	0,197	H=3,253	1,7 ± 0,8 (6)	4,7 ± 1,7 (8)	2,3 ± 0,8 (8)
Myrcen	0,248	H=2,787	1,0 ± 0,5 (5)	3,9 ± 2,3 (8)	1,6 ± 0,5 (6)
GLV					
(<i>Z</i>)-3-Hexenol/(<i>Z</i>)-3-Hexenal	0,144	H=3,877	275,3 ± 115,2 (9)	505,1 ± 207,2 (10)	171,9 ± 105,3 (8)
(<i>Z</i>)-3-Hexenylbutyrat	0,548	H=1,205	23,6 ± 12,1 (8)	54,3 ± 19,1 (6)	30,8 ± 24,5 (5)
(<i>Z</i>)-3-Hexenylacetat	0,249	H=2,778	33,9 ± 13,3 (8)	52,9 ± 16,2 (9)	18,5 ± 12,3 (7)
(<i>Z</i>)-3-Hexenylbenzoat	0,201	H=3,209	9,1 ± 5,3 (6)	23,7 ± 6,7 (9)	13,7 ± 6,7 (8)
Andere					
Methylsalicylat	0,523	H=1,296	16,8 ± 7,4 (8)	74,2 ± 37,1 (8)	34,1 ± 14,4 (8)
Indol	0,001	H=13,930	0,2 ± 0,2^a (1)	26,3 ± 6,5^b (9)	29,6 ± 24,4^{ab} (7)
Total	0,114	H=4,346	776,8 ± 265,5	2108,5 ± 542,1	1580,2 ± 677,4

Wie **Tab. 5.2** und **Abb. 5.4** zu entnehmen ist, wurde die relative Emission aller betrachteten VOC durch die *L. dispar* Raupen und mechanische Verwundung erhöht, wobei die Raupen bei den meisten Verbindungen eine größere Steigerung bewirkten. Das zeigen auch die totalen relativen Emissionen der einzelnen Behandlungen in **Tab. 5.2**, die sich jedoch nicht signifikant unterscheiden.

Die Datenanalyse der einzelnen Verbindungen ergab bei DMNT, (*E*)- β -Ocimen, Sabinen und Indol eine signifikant höhere relative Emission bei Raupenbehandlung als bei den Kontrollen. Zwischen der mechanischen Schädigung und den Kontrollen bestand kein signifikanter Unterschied. Die Raupen verursachten folglich eine stärkere

Erhöhung der VOC-Abgabe als die mechanische Verwundung. DMNT und (*E*)- β -Ocimen zählten bei den herbivor behandelten und mechanisch verwundeten Individuen nach (*E,E*)- α -Farnesen (*Z*)-3-Hexenol und (*Z*)-3-Hexenal zu den Stoffen mit der größten relativen Emission. Indol war bei diesen Behandlungen eine Nebenkomponekte, während Sabinen in nur sehr kleiner Menge nachgewiesen wurde. Beide Stoffe traten im Headspace der Kontrollzweige seltener auf, als bei den beiden anderen Behandlungen. Dagegen wurden DMNT und (*E*)- β -Ocimen auch in den Kontrollmessungen bei fast allen Bäumen gefunden.

Die relative Emission aller anderen untersuchten Substanzen wurde durch Herbivorie und mechanische Verwundung zum Teil merklich vergrößert, ohne jedoch statistisch signifikant zu sein. Diese Trends äußern sich durch kleine P-Werte in **Tab. 5.2** insbesondere bei (*E,E*)- α -Farnesen, Eucalyptol, α -Pinen und γ -Terpinen.

5.2.2.4 Diskussion der VOC-Emission von *P. trichocarpa*

Unabhängig von den Behandlungsgruppen dominierten im Headspace von *P. trichocarpa* die beiden GLV (*Z*)-3-Hexenol und (*Z*)-3-Hexenal sowie das Sesquiterpen (*E,E*)- α -Farnesen. Die Summe der relativen Emission dieser drei Verbindungen machte bereits rund drei Viertel der totalen relativen Emission aus. Der ausgeprägte Ausstoß von GLV durch *P. trichocarpa* ist bemerkenswert und wurde in diesem Ausmaß noch nicht in der Literatur erwähnt. Frost *et. al* (2007) berichteten zwar über die Emission von GLV durch *P. deltoides x nigra*, gingen bei ihren Betrachtungen aber nicht weiter auf diese Stoffgruppe ein. Arimura *et al.* (2004) machten keine Angaben über die Emission von GLV bei ihren Arbeiten mit *P. trichocarpa x deltoides*. (*E,E*)- α -Farnesen, das hier die größte relative Emission aufwies, wurde dagegen in beiden Studien erwähnt und untersucht. Dasselbe gilt für DMNT und (*E*)- β -Ocimen, die in den Kontrollen in Spuren und bei Herbivorie und mechanischer Verwundung als Nebenbestandteile auftraten.

Raupenfraß und mechanische Verwundung hatten einen starken Einfluss auf die VOC-Emission und verursachten bei allen untersuchten Substanzen eine Erhöhung der relativen Emission. Signifikante Unterschiede wurden bei DMNT, (*E*)- β -Ocimen, Sabinen und Indol festgestellt. Auch wenn nur bei wenigen Verbindungen ein statistisch abgesicherter Anstieg der VOC-Emission beobachtet werden konnte, zeigten die

Behandlungen die erwartete Wirkung auf die Menge der abgegebenen Volatile. Der Maßstab der Induktion der VOC bei den *L. dispar* befallenen Zweigen und die etwas schwächere, aber dennoch deutliche Reaktion der mechanisch verwundeten Zweige stimmen im Wesentlichen mit Berichten aus der Literatur überein (Kessler & Baldwin 2001; Arimura *et al.* 2004; Frost *et al.* 2007). An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass die verwendeten Äste von *P. trichocarpa* sehr kleine Fraßschäden aufwiesen. Im Gegensatz zu den Proben von *P. nigra* wurden vor Beginn des Experimentes keine erwähnenswerten Zahlen von Herbivoren beobachtet. Die prä-experimentelle Induktion des Sekundärmetabolismus durch Herbivorie wurde daher als gering eingestuft. Darüberhinaus verfügten die Äste von *P. trichocarpa* über weniger, aber dafür größere Blätter als die Zweige von *P. nigra*. Als Folge dessen traten bei der Behandlung mit den *L. dispar* Raupen an allen Blättern Fraßschäden auf, sodass von einer Induktion des gesamten Blattwerkes ausgegangen werden konnte.

Über die Funktionen der VOC kann wie im Fall von *P. nigra* nur spekuliert werden, wobei hier nur die Substanzen mit großer relativer Emission und mit signifikanten Änderungen der Emission abgehandelt werden sollen. Das unter 5.2.2.2 bereits genannte Beispiel der möglichen, indirekten Verteidigungswirkung von (*E*)- β -Ocimen, DMNT und (*E,E*)- α -Farnesen kann auch bei *P. trichocarpa* aufgegriffen werden. In diesem Zusammenhang ist die signifikante Emissionssteigerung von (*E*)- β -Ocimen und DMNT durch Herbivorie bemerkenswert. (*E,E*)- α -Farnesen wurde bereits konstitutiv in großen Mengen nachgewiesen und zeigte nach Herbivorie eine deutliche Tendenz zur Induktion ($P=0,05$).

Die biologischen Konsequenzen des ausgeprägten GLV-Ausstoßes, insbesondere von (*Z*)-3-Hexenol und (*Z*)-3-Hexenal, können nur schwer abgeschätzt werden, da bei diesen Stoffen über eine große Anzahl von Wirkungen berichtet wurde (siehe 3.4.1). Demgegenüber sind über die Folgen der Emission von Sabinen und Indol bisher keine Berichte veröffentlicht worden. Die Induzierbarkeit von Indol wurde auch bei Mais festgestellt (Turlings *et al.* 1990), Rückschlüsse auf die Funktion des Stoffes konnten aber nicht gezogen werden.

Die zuvor bei *P. nigra* diskutierten einschränkenden Faktoren auf die Aussagekraft der Ergebnisse sind hier durch die identische experimentelle Vorgehensweise ebenso gültig.

Das bezieht sich vor allem auf mögliche Auswirkungen durch das Abschneiden der Äste, die bei *P. trichocarpa* bereits nach 1-2 Tagen deutliche Anzeichen von Trockenstress zeigten.

5.2.2.5 Vergleich der VOC-Profile von *P. nigra* und *P. trichocarpa*

Die VOC-Profile der beiden Pappelarten unterschieden sich sowohl hinsichtlich der relativen Emission einzelner Verbindungen als auch hinsichtlich der totalen relativen Emission aller untersuchten VOC. Die deutlichen Diskrepanzen fallen bereits bei Betrachtung der Hauptkomponenten in den VOC-Bouquets beider Arten auf und können anhand von **Tab. 5.3** nachvollzogen werden.

Tab. 5.3 Gegenüberstellung der totalen relativen Emission [$\text{g}^{-1}(\text{TM})$] und der relativen Emission [$\text{g}^{-1}(\text{TM})$] der Hauptkomponenten des VOC- Bouquets von *P. nigra* und *P. trichocarpa*. Dargestellt sind MW \pm SE aus n =10.

<i>P. nigra</i>			
	Kontrolle	<i>L. dispar</i>	mech. Verw.
Total	144,7 \pm 45,9	261,7 \pm 78,8	353,2 \pm 106,9
(<i>E,E</i>)- α -Farnesen	36,6 \pm 13,6	45,9 \pm 9,9	82,6 \pm 46,0
(<i>E</i>)- β -Caryophyllen	20,5 \pm 6,0	18,1 \pm 5,1	31,0 \pm 8,0
DMNT	25,7 \pm 9,9	92,3 \pm 34,8	105,3 \pm 24,9
(<i>E</i>)- β -Ocimen	26,3 \pm 8,5	58,2 \pm 19,7	90,4 \pm 28,9
<i>P. trichocarpa</i>			
	Kontrolle	<i>L. dispar</i>	mech. Verw.
Total	776,8 \pm 265,5	2108,5 \pm 542,1	1580,2 \pm 677,4
(<i>E,E</i>)- α -Farnesen	359,3 \pm 138,5	1067,7 \pm 269,8	1093,2 \pm 551,4
(<i>Z</i>)-3-Hexenol/(<i>Z</i>)-3-Hexenal	275,3 \pm 115,2	505,1 \pm 207,2	171,9 \pm 105,3

P. nigra emittierte vorwiegend (*E*)- β -Ocimen, DMNT, (*E*)- β -Caryophyllen und (*E,E*)- α -Farnesen während *P. trichocarpa* hauptsächlich (*Z*)-3-Hexenol, (*Z*)-3-Hexenal und (*E,E*)- α -Farnesen ausstieß. Dabei überstieg die konstitutive relative Emission von (*E,E*)- α -Farnesen durch *P. trichocarpa* bereits die konstitutive relative Emission aller durch *P. nigra* abgegebenen Volatile deutlich. Bei Betrachtung aller untersuchten Volatile wurde bei *P. trichocarpa* die um ein mehrfaches höhere totale relative Emission festgestellt.

Beide Arten reagierten unterschiedlich auf Herbivorie und mechanische Verwundung. Die Induktion der VOC bei *P. nigra* war nicht sehr ausgeprägt und fiel bei der mechanischen Verwundung stärker aus, als bei Raupenfraß. Die VOC-Emission von *P.*

trichocarpa wurde dagegen insbesondere durch Herbivorie stärker induziert. Das unerwartete Verhalten der Volatile von *P. nigra* wurde bereits unter 5.2.2.2 diskutiert. Die verschieden starke Induzierbarkeit wurde daher nicht als Artcharakteristikum angesehen. Bei der Betrachtung der induzierten Verbindungen fielen einige Parallelen auf. DMNT und (*E*)- β -Ocimen zeigten bei den beiden Spezies einen deutlichen Trend zur Induktion nach Herbivorie und mechanischer Verwundung. Darüberhinaus wurden mit Benzylcyanid (*P. nigra*) und Indol (*P. trichocarpa*) zwei stickstoffhaltige Konstitutionsisomere durch Herbivorie induziert. In den Kontrollmessungen wurden beide Verbindungen nur selten nachgewiesen. Benzylcyanid wurde in einzelnen Fällen auch bei *P. trichocarpa* detektiert, aber nicht in die Auswertung einbezogen.

Aussagen über artspezifische Volatile können anhand der oben gezeigten Tabellen nicht gemacht werden, da nur ein Teil der erfassten VOC in der Auswertung berücksichtigt wurden. Außerdem sollte der Vergleich der totalen relativen Emission unter Vorbehalt beurteilt werden. Unter 5.2.2.2 wurde bereits dargestellt, dass bei der Berechnung der relativen Emission keine Responsefaktoren berücksichtigt wurden. Die Summation zur totalen relativen Emission und der Vergleich zweier totaler relativer Emissionen sind mit besonderer Vorsicht zu bewerten. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Alter der beprobten Bäume für die Abundanz der Volatile relevant ist. Bei den zur Probengewinnung verwendeten Bäumen lag ein erheblicher Altersunterschied vor (7.1). Ferner sollte beachtet werden, dass das Ausmaß der Herbivorenverteidigung zwischen Klonen einer Spezies erheblich variieren kann (Lindroth & Hwang 1996). Die beobachteten Muster sollten deshalb nicht als uneingeschränkt repräsentativ für die jeweilige Art angesehen werden.

5.2.3 Analyse der kondensierten Tannine

5.2.3.1 Ergebnisse von *P. nigra* und *P. trichocarpa* im Vergleich

Die Ergebnisse der KT-Analyse beider Spezies in Abhängigkeit von der Behandlung veranschaulicht **Abb. 5.5**. Bei dem statistischen Vergleich der KT-Gehalte der Behandlungen traten keine signifikanten Unterschiede auf. Allerdings konnten deutliche Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Pappelarten festgestellt werden, wie aus **Abb. 5.5** ersichtlich wird. Innerhalb einer Behandlung variierte der Gehalt der KT verglichen mit der VOC-Emission geringer.

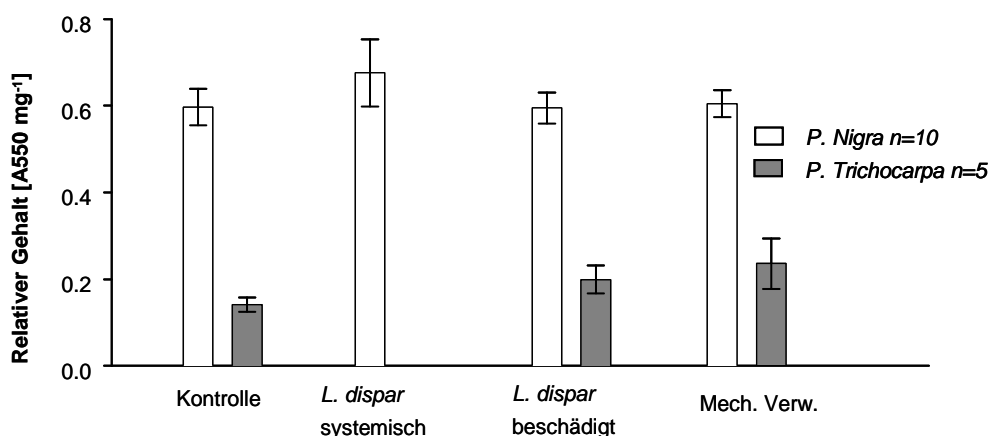


Abb. 5.5 Relativer Gehalt der kondensierten Tannine [A550 * mg⁻¹(TM)] von *P. nigra* und *P. trichocarpa* Blättern in Abhängigkeit von der Behandlung. Säulen zeigen Mittelwerte aus n = 5 (*P. nigra*) bzw. n = 10 (*P. trichocarpa*) ± SE. Im Fall von *P. nigra* wurden bei der herbivoren Behandlung nicht alle Blätter beschädigt. Unbeschädigte Blätter wurden getrennt analysiert und werden als „*L. dispar* systemisch“ bezeichnet. Einweg-ANOVA (P=0,05) zwischen den Behandlung innerhalb einer Spezies ergab keine signifikanten Unterschiede.

5.2.3.2 Diskussion und Vergleich des KT-Gehaltes von *P. nigra* und *P. trichocarpa*

Bei *L. dispar* Befall und mechanischen Verwundung konnte wegen der kurzen Experimentdauer von 24 h nicht mit einer Anreicherung der kondensierten Tannine gerechnet werden. Peters und Constabel (2002) stellten bei *P. trichocarpa* mit dem BuOH/HCl-Assay erst 144 h nach einer mechanischen Verwundung eine signifikante Zunahme des KT-Gehaltes fest.

Der scheinbare Unterschied zwischen den Pappelarten könnte artspezifisch sein, ist aber sehr wahrscheinlich auf den erheblichen Altersunterschied zwischen den beiden Bäumen zurückgeführt werden, an denen die Äste für das Experiment abgeschnitten wurden (7.1). Unter 3.4.3 wurde beschrieben, dass der KT-Gehalt in jungen Pappeln klein ist und erst mit dem Alter zunimmt. Das Alter der Schwarzpappel (geschätztes Alter: 50-70 Jahre), an der die Proben für das Experiment genommen wurden, war wesentlich höher als das Alter der *P. trichocarpa* (Alter: ca. 5 Jahre). Als Folge dessen konnte das Ergebnis der KT-Analyse erwartet werden.

5.2.4 Analyse der phenolischen Glykoside

5.2.4.1 Identifizierung der phenolischen Glykoside

Die HPLC-Chromatogramme der Blattextrakte von *P. nigra* und *P. trichocarpa* wiesen bei 200 nm mehrere Peaks auf (**Abb. 5.6**). Anhand der UV-Spektren zwischen 200 und 300 nm konnte bei vielen Peaks eine phenolische Struktur ausgeschlossen werden, da sie nicht das für Benzen charakteristische Absorptionsmuster zeigten. Peaks mit UV-Spektren, die auf das Benzenchromophor hinwiesen, wurden anschließend mit LC-MS (ESI) untersucht. Im Zuge dessen konnte bei beiden Pappelarten Salicortin durch das $[M-H]^-$ -Ion nachgewiesen werden. Die Extrakte von *P. trichocarpa* enthielten außerdem Tremulacin, das ebenfalls mit Hilfe der $[M-H]^-$ -Ion identifiziert wurde.

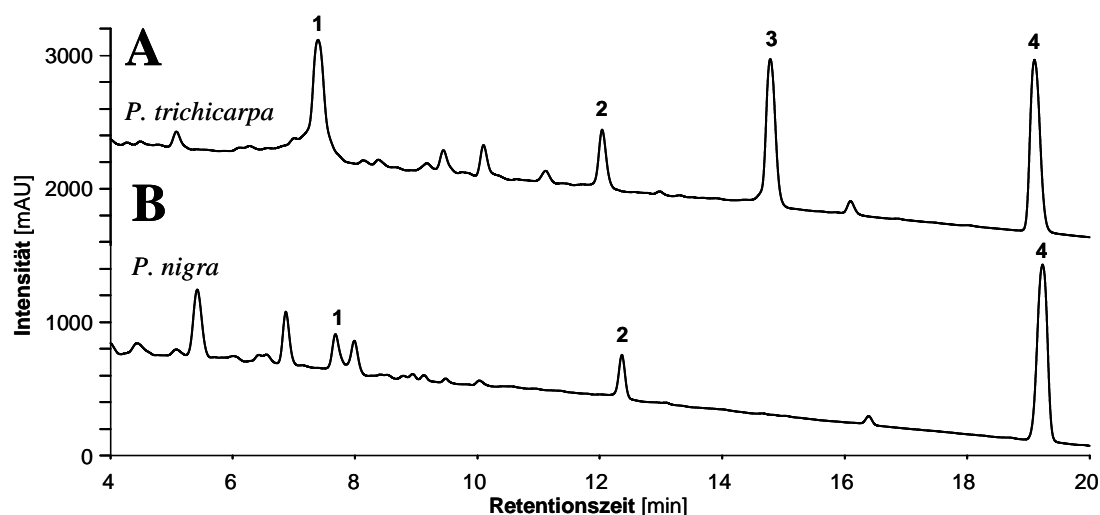


Abb. 5.6 HPLC-Chromatogramme der Methanolextrakte von Blattpulver der Pappelarten *P. trichocarpa* (A) und *P. nigra* (B). Als Detektor wurde ein Diodenarray-Detektor bei einer Analysenwellenlänge von 200 nm eingesetzt. Bei der anschließenden LC-MS-Messung zur Strukturzuweisung wurden nur Peaks mit Benzen-typischem UV-Spektrum untersucht. Strukturzuweisung mit Hilfe von LC-MS (ESI): (1): Salicortin, (2): Hydroxytremulacin, (3): Tremulacin, (4) 1,3-Dimethoxybenzen (IS).

Daneben wurde bei beiden Arten eine Substanz erfasst, deren UV-Spektrum Ähnlichkeit mit Tremulacin besaß (**Abb. 5.7**). Anhand der LC-MS-Spektren (**Abb. 5.8**) wurde für diese Verbindung die Struktur „Hydroxytremulacin“ vorgeschlagen. Die Strukturhypothese wurde auf der Basis der Massendifferenz von 16 amu des $[M-H]^-$ -Ions zu Tremulacin formuliert. Es wurde vermutet, dass ein Wasserstoffatom am Salicylring des Tremulacins durch eine Hydroxygruppe ersetzt wurde. Eine Substitution

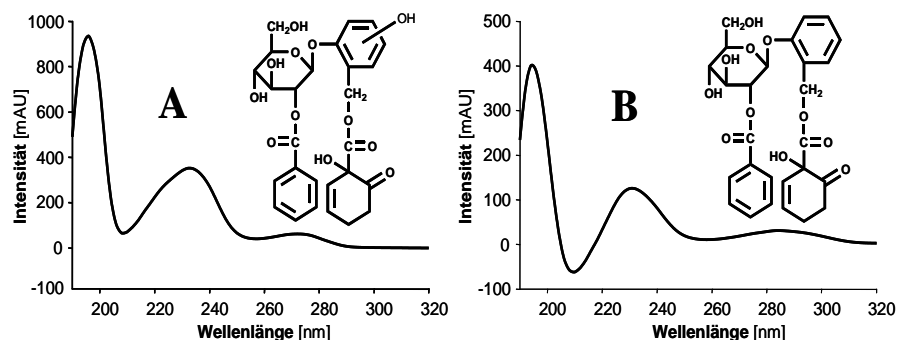


Abb. 5.7 UV-Spektren des hypothetischen „Hydroxytremulacins“ (A) und Tremulacins (B). Die Spektren wurden während einer flüssigkeitschromatographischen Messung mit einem Diodenarray-Detektor aufgenommen.

eines H-Atoms am 6-HCH-Rest wurde ausgeschlossen, da der neutrale Verlust von 138 amu ($m/z=543 \rightarrow m/z=405$), der auch bei Tremulacin beobachtet wurde ($m/z 527 \rightarrow m/z=389$) als Spaltung der Esterbindung zwischen 6-HCH-Rest und Salicylring interpretiert wurde (**Abb. 5.9**). Ferner trat bei „Hydroxytremulacin“ eine Massendifferenz von 121 amu ($m/z=543 \rightarrow m/z=422$) auf, die auf den Verlust des Benzoats hinwies. Durch diese Beobachtungen wurde auch ausgeschlossen, dass sich die OH-Gruppe am Benzoat befindet. Die Abspaltung von Benzoat wurde bei Tremulacin nicht beobachtet, obwohl es ebenfalls über diesen Rest verfügt. Außerdem sind viele weitere Fragmente beider Verbindungen nicht erklärbar. Die Struktur von „Hydroxytremulacin“ ist deshalb sehr spekulativ und muss durch NMR-Untersuchungen abgesichert werden. Die Hinweise wurden jedoch als ausreichend erachtet, um die Substanz unter Vorbehalt in die folgenden Betrachtungen einzubeziehen.

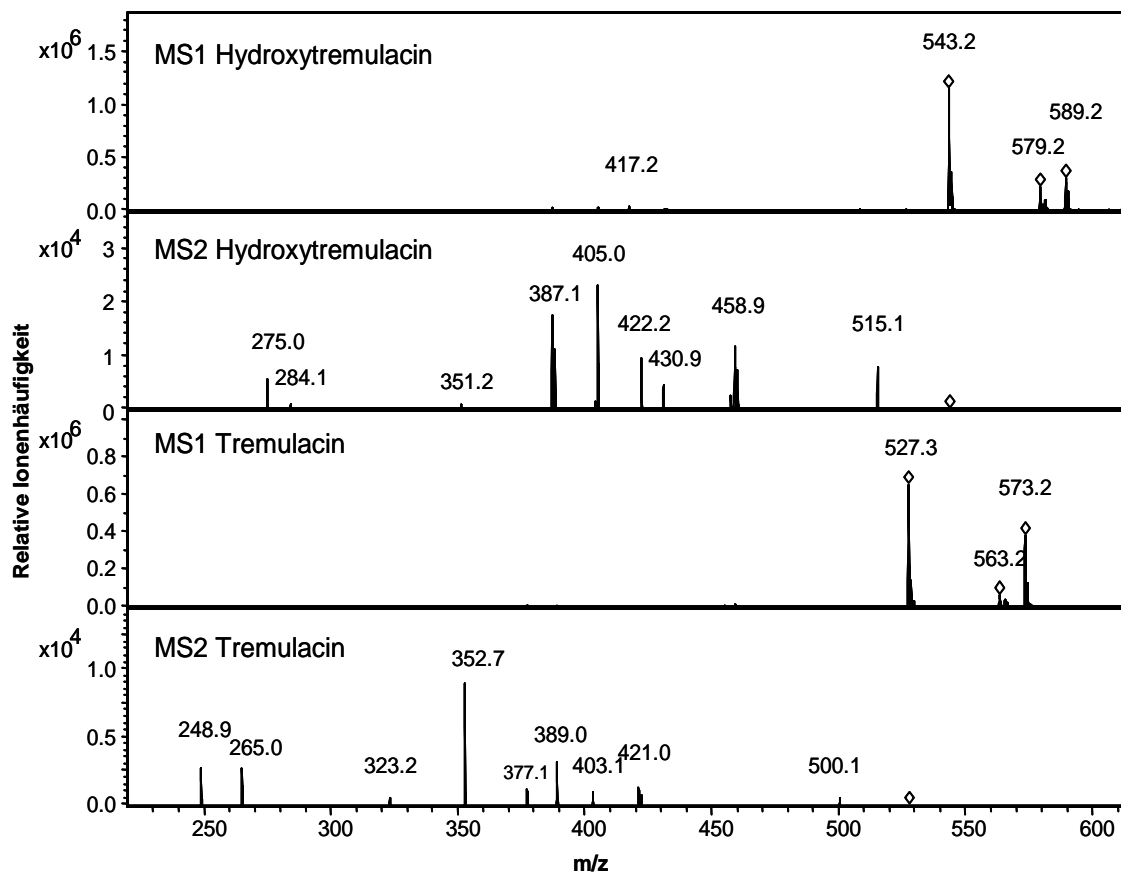


Abb. 5.8 Fragmentierungsmuster des $[M-H]^-$ -Ions von „Hydroxytremulacin“ und Tremulacin. Die Massenspektren stammen von LC-MS-Untersuchung (ESI-Iontrap) eines Methanolextraktes von *P. nigra* Blattpulver. Die MS1-Spektren zeigen die $[M-H]^-$ -Ionen, die im negativen Ionisierungsmodus erzeugt wurden. Die MS2-Spektren zeigen die Fragmentierung der $[M-H]^-$ -Ionen.

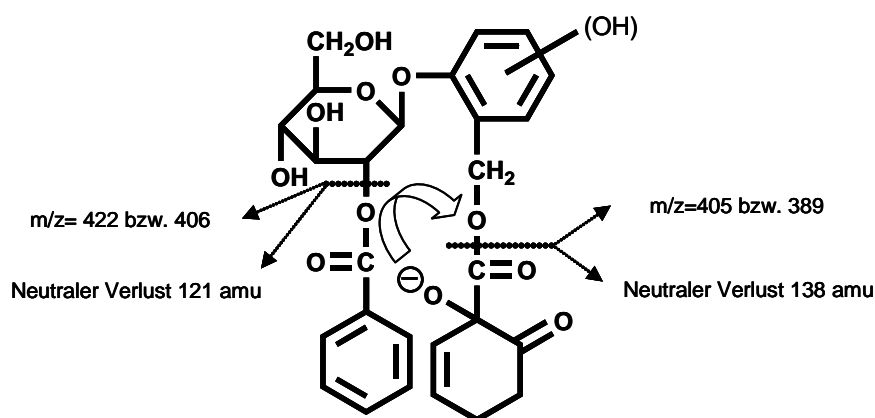


Abb. 5.9 Hypothetische Fragmentierung von „Hydroxytremulacin“ bzw. Tremulacin bei Electrospray Ionisierung (ESI) im negativen Modus. Es wurde vermutet, dass die Hydroxygruppe des 6-HCH-Restes das azideste Wasserstoffatom besitzt und deprotoniert wird. Bei der Spaltung der Esterbindungen zwischen dem Salicylring und dem 6-HCH-Rest muss die negative Ladung auf das Sauerstoffatom des Salicylates übertragen werden (runder Pfeil), um ein detektierbares Ion zu erzeugen.

5.2.4.2 Ergebnisse der PG-Analyse von *P. trichocarpa* und *P. nigra*

Die Blattextrakte von *P. nigra* enthielten Salicortin und „Hydroxytremulacin“. Bei *P. trichocarpa* wurde außerdem Tremulacin nachgewiesen. **Abb 5.10** zeigt den relativen Gehalt dieser Verbindungen in Abhängigkeit von der Spezies und der Behandlung.

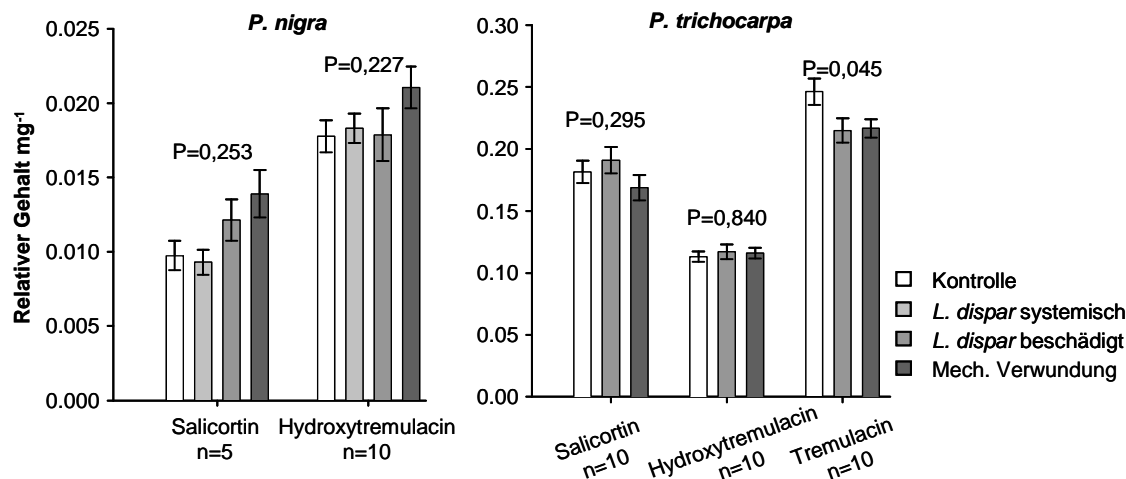


Abb. 5.10 Relativer Gehalt [mg⁻¹(TM)] der erfassten phenolischen Glycoside von *P. nigra* und *P. trichocarpa* in Abhängigkeit von der Behandlung. Im Fall von *P. nigra* wurden aufgrund der großen Blattanzahl bei der herbivoren Behandlung nicht alle Blätter beschädigt. Unbeschädigte Blätter wurden getrennt analysiert und werden als „*L. dispar* systemisch“ bezeichnet. Die P-Werte (Einweg-ANOVA, $P=0,05$) vom Vergleich der Behandlung sind in der Grafik angegeben. Unterschiedliche Achsenskalierung bei beiden Pappelarten beachten.

Die in *P. nigra* und *P. trichocarpa* beobachteten PG Salicortin und „Hydroxytremulacin“ wurden in *P. trichocarpa* in deutlich größerer Menge nachgewiesen. Beide Verbindungen zeigten bei beiden Pappelarten keine signifikanten Gehaltsveränderungen nach mechanischer Verwundung oder Raupenfraß. Im Fall von Tremulacin ergab die ANOVA bei *P. trichocarpa*, dass der Gehalt der drei Behandlungen nicht zur selben Grundgesamtheit gehört ($P=0,045$). Der Post Hoc Test ergab keine signifikanten Unterschiede, zeigte aber bei den Kontrollen einen tendenziell höheren Gehalt als bei den herbivor beschädigten Individuen ($P=0,065$).

5.2.4.3 Diskussion der PG-Analyse von *P. nigra* und *P. trichocarpa*

Unter 3.4.2 wurde erwähnt, dass die Induzierbarkeit der PG bis *dato* umstritten ist. In diesem Experiment konnte durch die kurze Induktionszeit von nur 24 h ohnehin mit keinen messbaren Konzentrationsänderungen dieser Stoffklasse gerechnet werden. Dementsprechend stimmen die Ergebnisse von Salicortin und „Hydroxytremulacin“ mit

den Erwartungen überein. Das Resultat von Tremulacin entsprach dagegen nicht der Prognose, da bei den induzierten Bäumen ein niedrigerer Gehalt festgestellt wurde. Der Abbau eines PG nach einer induzierenden Behandlung wurde bisher noch nicht beobachtet und konnte nicht plausibel erklärt werden. Mögliche Begründungen wären katabole oder anabole Reaktionen, bei denen Tremulacin verbraucht wurde, oder der Transport von den Blättern in andere Pflanzenteile. Beide Möglichkeiten wurden als unwahrscheinlich angesehen und die Beobachtung kritisch und als möglicherweise fehlerhaftes Ergebnis betrachtet.

5.2.5 Vergleich der phenolischen Glykoside von *P. nigra* und *P. trichocarpa*

PG können für Arten in der Familie der *Salicaceae* charakteristisch sein (Julkunttiitto 1989). Obwohl hier nur wenige Vertreter dieser Substanzklasse untersucht wurden, traten qualitative Unterschiede zwischen den Pappelarten auf. Salicortin und „Hydroxytremulacin“ konnten bei beiden Spezies nachgewiesen werden, Tremulacin wurde dagegen nur bei *P. trichocarpa* erfasst.

In *P. trichocarpa* wurde im Verhältnis zu *P. nigra* ein wesentlich höherer Gehalt von Salicortin und „Hydroxytremulacin“ in den Blättern beobachtet (**Abb. 5.10**). Die Ursache liegt aller Wahrscheinlichkeit nach in dem unterschiedlichen Alter der Bäume, an dem die Proben für das Experiment genommen wurden (siehe **7.1**). Der PG-Gehalt sinkt mit zunehmendem Baumalter ab (Donaldson *et al.* 2006) und verhält sich damit invers zum KT-Gehalt. Die Beobachtungen decken sich mit diesem Trend, da in den Blättern der deutlichen älteren *P. nigra* weniger PG nachgewiesen wurden.

Da Salicortin sowie Tremulacin bzw. „Hydroxytremulacin“ über den 6-Hydroxycyclohexenon-Rest verfügen und deshalb im Vergleich zu anderen PG als besonders toxisch angesehen werden können (**3.4.2**), sind sie im Hinblick auf Induzierbarkeit durch Insektenfraß besonders interessante Verbindungen. Diese Stoffe sollten als Reaktion auf einen Angriff von Herbivoren gebildet werden, falls PG überhaupt induzierbar sind. Die Frage, ob bei *P. nigra* eine Induktion der drei identifizierten PG stattfindet, sollte in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

5.3 Zeitauflösendes Experiment zur Bestimmung der induzierbaren Sekundärmetaboliten von *P. nigra*

5.3.1 Ziele und Vorgehensweise

In diesem Experiment sollte der zeitliche Verlauf der Sekundärmetaboliten von *P. nigra* nach Fraß von *L. dispar* Raupen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen beobachtet werden. Dadurch sollte überprüft werden, welche Verbindungen in einem Zeitraum von bis zu 10 Tagen induziert werden. Das vorangegangene Experiment hatte bereits gezeigt, dass sich die Emission einiger VOC innerhalb von 24 h nach Beginn eines Insektenangriffes deutlich verändern kann (5.2.2.2). Die Bäume mit Raupenbehandlung wurden in diesem Experiment für 48 h durch *L. dispar* Raupen induziert, die anschließend entfernt wurden. Mit Beginn des Raupenfraßes wurde der tageszeitliche Verlauf der VOC über 96 h im Abstand von 6 h aufgezeichnet. Der Gehalt der PG und KT wurde 96 h, 168 h und 240 h nach Beginn des Experimentes untersucht. Einerseits sollten dadurch weitere induzierbare Verbindungen gefunden werden, deren Produktion möglicherweise langsamer auf Schäden reagiert und die deshalb im Übersichtsexperiment keine qualitativen und quantitativen Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen zeigten. Andererseits sollte im Falle der VOC beobachtet werden, wie lange eine erhöhte Abgabe nach Ende des Raupenbefalls beibehalten wird. Der Ablauf des Experimentes ist detailliert unter 7.2 beschrieben.

5.3.2 Ergebnisse der VOC-Analyse

Wie in dem unter 5.2 beschriebenen Experiment wurde die emittierte Menge der volatilen Stoffe als Messgröße verwendet, wobei hier, zusätzlich zu der Behandlung, mit der Tageszeit eine weitere Variable beobachtet wurde. Bei der herbivoren Behandlung kam einem weiteren Kriterium Bedeutung zu, da die Bäume nur für die ersten 48 h der insgesamt 96 h des Experimentes dem Raupenfraß ausgesetzt wurden. Neben der Tageszeit war also der Zeitpunkt der Messung während oder nach dem Herbivorenbefall relevant. Jeder der drei genannten Faktoren hatte messbare Auswirkungen auf die Emission der volatilen Stoffe. Die Einflüsse der Behandlung und der Tageszeit können anhand der Chromatogramme in Abb 5.11 nachvollzogen werden.

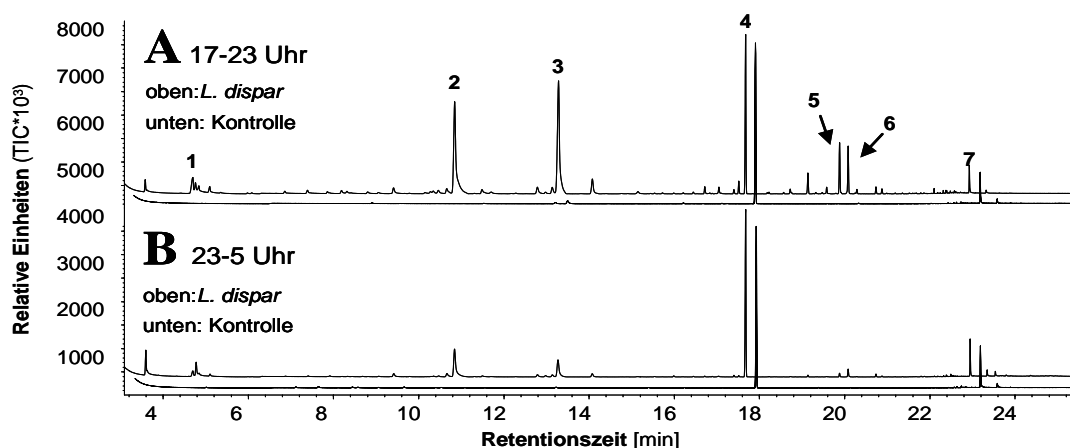


Abb. 5.11 GC/MS-Chromatogramme einer *P. nigra* mit Herbivorie und einer Kontrolle im Zeitraum von 17-23 Uhr (A) und 23-5 Uhr (B). Die Chromatogramme stammen von denselben Individuen in unmittelbar aufeinander folgenden Zeitabschnitten. Die Retentionszeit der Kontrollen wurde zur Veranschaulichung leicht versetzt. Bei der Messung waren die Bäume mit Herbivorie dem Raupenfraß bereits 24 h bzw. 30 h ausgesetzt. Die Beleuchtungsphase endete um 20 Uhr. Die Stoffe wurden während der 6 stündigen Messung auf 100 mg Super-Q in einem Glasfilter adsorbiert, mit 100 μ L Dichlormethan eluiert und das Eluat mit GC-MS (DB5-MS, TIC) analysiert. (1): (Z)-3-Hexenol (2): (*E*)- β -Ocimen, (3): DMNT, (4): Nonylacetat (IS), (5) Germacren D, (6): (*E,E*)- α -Farnesen

Die Bäume mit Herbivorie zeigten tagsüber eine starke VOC-Emission, die nachts in Abhängigkeit von der Verbindung unterschiedlich stark reduziert wurde (**Abb. 5.11**). Rückwirkungen auf die VOC-Emission durch Beginn und Ende der Herbivorie erfolgten in Abhängigkeit von der Stoffklasse unterschiedlich schnell. Bei den Kontrollen wurden viele Verbindungen unabhängig von der Tageszeit nicht, oder nur in sehr kleiner Menge nachgewiesen. Insgesamt wurde die Emission von 27 VOC untersucht, die in **Tab. 5.4** aufgeführt sind und fünf Substanzklassen zugewiesen wurden. Wie im vorangegangenen Experiment variierte die Emission der Replikate einer Behandlung stark. Statistische Tests zum Vergleich der VOC-Abgabe der beiden Behandlungen wurden nicht durchgeführt. Im Folgenden wird der zeitliche Verlauf der VOC-Emission der einzelnen Verbindungen dargestellt. Das Interesse galt dabei hauptsächlich dem Einfluss der Behandlung und der Tag-Nach-Rythmik.

Tab. 5.4 Liste der im zeitauflösenden Experiment untersuchten Volatile in fünf Substanzklassen.

<i>GLV</i>	<i>Monoterpenoide</i>	<i>Homoterpene</i>	<i>Sesquiterpenoide</i>	<i>Andere</i>
(Z)-3-Hexenal	α -Pinen	DMNT	(E)- β -Caryophyllen	Benzylalkohol
(Z)-3-Hexenol	Camphen		α -Humulen	Salicylaldehyd
(Z)-3-Hexenylacetat	Sabinen		Germacren D	Benzenethanol
(Z)-3-Henexylbenzoat	Myrcen		(E,E)- α -Farnesen	Benzylcyanid
	Limonen		δ -Cadinen	Indol
	(Z)- β -Ocimen		Nerolidol	Benzylbenzoat
	(E)- β -Ocimen			Benzylalkohol
	Linalool			
	Borneol			

Bei den von Raupen befallenen Bäumen wurde zudem die Geschwindigkeit der Reaktion auf die Herbivorie und das Entfernen der Raupen nach 48 h betrachtet. Die Emission aller untersuchten Substanzen als Funktion der Zeit ist im Anhang unter **8.1** dargestellt.

Green leaf volatiles (Graphen: siehe Anhang **Abb. 8.1**)

(Z)-3-Hexenal, (Z)-3-Hexenol, (Z)-3-Hexenylacetat, (Z)-3-Henexylbenzoat

Mit Ausnahme von (Z)-3-Hexenylacetat, das in kleiner Menge auch bei den Kontrollbäumen nachgewiesen wurde, traten die hier beobachteten GLV ausschließlich in den geschädigten Pflanzen auf. Die anschließenden Ausführungen beziehen sich daher nur auf die Emission der induzierten Pflanzen. Alle GLV reagierten schnell auf das Auftreten von Fraßschäden durch die Raupen. Bereits während der ersten 6 h des Experimentes wurde eine Induktion aller Verbindungen beobachtet. Im Gegensatz dazu ließen sich beim Zeitverlauf der Emission deutliche Differenzen feststellen. (Z)-3-Hexenal zeigte als einzige untersuchte Substanz während der Dunkelperiode eine zwei bis drei mal höhere Emission als tagsüber. Die Abgabe von (Z)-3-Hexenol wurde durch die Tageszeit augenscheinlich nicht stark beeinflusst. (Z)-3-Hexenylacetat und besonders (Z)-3-Henexylbenzoat wurden während der Lichtperiode verstärkt emittiert. Unmittelbar nach der Entfernung der Raupen konnte (Z)-3-Hexenal nur noch in marginalen Mengen nachgewiesen werden. Bei den anderen Verbindungen fiel die Emission innerhalb von 12-18 h auf das Niveau der Kontrollen ab.

Monoterpenoide (Graphen: siehe Anhang **Abb. 8.2** und **Abb. 8.3**)

α -Pinen, Camphen, Sabinen, Myrcen, Limonen, (*Z*)- β -Ocimen, (*E*)- β -Ocimen, Linalool, Borneol

Bei den neun untersuchten Monoterpenoiden konnten zwei Emissionsmuster beobachtet werden. Dem einem Muster folgten (*Z*)- β -Ocimen, (*E*)- β -Ocimen und Linalool (**Abb. 8.2**, Anhang). Die drei Verbindungen wurden von den unbeschädigten *P. nigra* kaum emittiert und in nennenswerter Menge nur bei den Bäumen mit *L. dispar* Befall nachgewiesen. Eine erkennbare Induktion wurde 12-18 h nach Versuchsbeginn festgestellt. Während der Dunkelperioden wurde die Emission im Vergleich zur Lichtperiode um rund die Hälfte verringert. Die Entfernung der Raupen zeigte zunächst keine große Wirkung auf die Emission der drei Stoffe. In den 24 h nach der Entfernung blieb die Emission auf dem Niveau des Vortages und wurde erst in der folgenden Nacht auf den Wert der Kontrollen abgesenkt. Am letzten Tag des Experimentes kam es nochmals zu einem leichten Anstieg der Abgabe.

Der zeitliche Verlauf der Emission von α -Pinen, Camphen, Limonen, Sabinen, Myrcen, Borneol und Camphen richtete sich nach dem zweiten Emissionsschema der Monoterpenoide (**Abb. 8.3**, Anhang). Diese Verbindungen wurden konstitutiv von den Kontrollbäumen emittiert. Raupenfraß führte innerhalb von 24 h nach Experimentbeginn etwa zu einer Verdopplung der Emission. Bei beiden Behandlungen wurde ein ausgeprägter Tag-Nacht-Rhythmus der Emission beobachtet. Nachts wurden die Verbindungen nicht, oder nur in sehr kleinem Maßstab emittiert. Bei den Bäumen mit *L. dispar* Befall erreichte die Emission am ersten Tag des Experimentes gegen Ende der Lichtperiode ihr Maximum. An den beiden folgenden Tagen und bei den Kontrollen wurde die stärkste Emission in der Mitte der Lichtperiode beobachtet. Die Entfernung der Raupen nach 48 h hatte keine sichtbaren Konsequenzen, sodass die raupengeschädigten Bäume bis zum Ende des Versuches etwa die doppelte Menge dieser Monoterpenoide emittierten, wie die Kontrollen.

DMNT (Graph: siehe Anhang **Abb. 8.4**)

DMNT wurde durch Raupenfraß induziert und konnte in den Kontrollen kaum nachgewiesen werden. Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf die Emission der induzierten *P. nigra*. Bei diesen wurde bereits bei der ersten Messung nach 6 h eine

erhöhte Abgabe beobachtet. Diese wurde für die Dauer des Raupenbefall kontinuierlich weiter gesteigert. Nur in den Dunkelperioden sank die Emission auf etwa ein Drittel des Wertes, der tagsüber gemessen wurde. Bereits 24 h nach der Entfernung der Raupen konnten nur noch Spuren von DMNT erfasst werden. Von allen Terpenoiden zeigte die Emission von DMNT die stärkste Korrelation mit dem Auftreten der *L. dispar* Raupen.

Sesquiterpenoide (Graphen: siehe Anhang **Abb. 8.5** und **Abb. 8.6**)

(E)- β -Caryophyllen, α -Humulen, Germacren D, *(E,E)*- α -Farnesen, δ -Cadinen, Nerolidol

Alle Sesquiterpenoide wurden durch Herbivorie induziert und von den Kontrollen nur in Spuren abgegeben. Deshalb stehen die folgenden Betrachtungen nur im Zusammenhang mit der Emission der durch Raupen befressenen Bäume. Die meisten Sesquiterpenoide wurden 18-24 h nach Versuchsbeginn verstärkt abgegeben. Die Ausnahmen bildeten δ -Cadinen und Nerolidol, die bereits nach 6 h bzw. 12-18 h eine erhöhte Emission zeigten.

Der zeitliche Verlauf der Emission von α -Humulen, *(E)*- β -Caryophyllen und Germacren D zeigte große Ähnlichkeit (**Abb. 8.5**, Anhang). Während der Dunkelperiode wurden diese drei Verbindungen kaum gebildet. Das Maximum der Emission wurde am ersten Tag des Experimentes zwischen 17 und 23 Uhr und in den beiden folgenden Tagen zwischen 11 und 17 Uhr erreicht. 42-48 h nach der Entfernung der Raupen wurde die Emission dieser Stoffe vermindert. Mit einigen Abweichungen folgten auch *(E,E)*- α -Farnesen und δ -Cadinen dem eben beschriebenen Emissionsschema (**Abb. 8.6**, Anhang). *(E,E)*- α -Farnesen wurde im Vergleich zu Humulen, *(E)*- β -Caryophyllen und Germacren D während der zweiten und dritten Dunkelperiode stärker emittiert. δ -Cadinen wurde in den ersten 30 h des Versuches in etwa konstanter Menge gefunden und folgte dann dem Muster der anderen Sesquiterpene.

Der Zeitverlauf der Emission des Alkohols Nerolidol zeigte Unterschiede zu den aliphatischen Sesquiterpenen (**Abb. 8.6**, Anhang). Die Emission wurde nachts nur geringfügig vermindert und ging innerhalb von 24-30 h nach der Entfernung der Raupen stetig auf Null zurück. Nerolidol reagierte damit von allen Sesquiterpenoiden am schnellsten auf das Ende der Herbivorie.

Andere (Graphen: siehe Anhang **Abb. 8.7** und **Abb. 8.8**)

Benzylalkohol, Salicylaldehyd, Benzenethanol, Benzylcyanid, Indol, Benzylbenzoat, Benzylalkohol

Mit Ausnahme von Benzylalkohol und Benzylaldehyd, die geringfügig konstitutiv von den Kontrollen emittiert wurden, konnten alle nicht klassifizierten Substanzen bei *P. nigra* nur nach Fraß der *L. dispar* Raupen erfasst werden. Deswegen wird in der Folge nur die Emission der Bäume mit Herbivorie betrachtet. Salicylaldehyd wurde von diesen Bäumen bereits während der ersten 6 h des Experimentes in erhöhtem Maße abgegeben. Die Emission dieser Verbindung zeigte keine Tag-Nacht-Rythmik und wurde nach der Entfernung der Raupen innerhalb von 6 h auf ein niedriges Niveau reduziert, das bis zum Ende des Versuches beibehalten wurde. Alle anderen Stoffe wurden 18-24 h nach Experimentbeginn erkennbar induziert. Die Emission zeigte eine unterschiedlich stark ausgeprägte Abhängigkeit von den Lichtverhältnissen und erreichte während der Lichtperiode in den meisten Fällen etwa den doppelten Wert der Dunkelperiode. Die Ausnahmen bildeten Benzaldehyd und Benzylbenzoat, die bei Dunkelheit kaum nachgewiesen werden konnten. 18-24 h nach dem Ende der Herbivorie wurde die Emission von Benzenethanol, Indol, Benzylcyanid kontinuierlich reduziert, sodass die zuvor beobachteten Differenzen zwischen Tag und Nacht nivelliert wurden. Die Emission von Benzaldehyd wurde ebenfalls nach 18-24 h reduziert, zeigte aber weiterhin eine starke Lichtabhängigkeit. Benzylbenzoat und Benzylalkohol wurden erst nach 36 h in verminderter Menge abgegeben.

5.3.3 Diskussion der VOC-Analyse

Das Experiment zeigte, dass Individuen von *P. nigra*, die in Klimakammern ohne Kontakt mit Schädlingen aufgezogen wurden, konstitutiv nur sehr wenige VOC emittierten. Durch Herbivorie konnte eine starke Induktion der VOC-Emission hervorgerufen werden. Im Vergleich zum Übersichtsexperiment wurde eine Reihe zusätzlicher induzierbarer Verbindungen erfasst. Zu diesen Verbindungen zählten auch vier GLV. Alle untersuchten GLV mit Ausnahme von (*Z*)-3-Hexenolbenzoat wurden bereits während der ersten 6 h des Experimentes durch den Raupenfraß induziert. Innerhalb von 6-12 h nach Ende der Herbivorie sank die Emission wieder auf das Niveau der Kontrollbäume ab. Damit korrelierte die Emission der GLV eng mit dem Auftreten der Herbivoren und zeigte zudem eine schwache Lichtabhängigkeit. Im

Vergleich dazu reagierte die Emission der meisten Terpenoide deutlich langsamer auf den Beginn und das Ende des Raupenfraßes. Die meisten Terpenoide wurde erst 18-24 h nach Eintreten der Herbivorie in deutlich größeren Mengen erfasst. Eine Verminderung der Emission konnte in den meisten Fällen erst rund 42 h nach dem Entfernen der Raupen festgestellt werden. Außerdem zeigten viele Terpenoide, anders als die GLV, einen ausgeprägten Tag-Nacht-Rhythmus, wobei viele Terpenoide nachts kaum gebildet wurden.

Die Ergebnisse des Versuches sind in weiten Teilen mit anderen Studien konsistent. Martin *et al.* (2003) stellten bei mit Methyljasmonat induzierten Fichten (*Picea abies*) in einem siebentägigen Experiment eine Tag-Nacht-Abhängigkeit der Emission von oxidierten Monoterpenen, Sesquiterpenen und von Methylsalicylat fest. Arimura *et al.* (2008) konnten an der Limabohne (*Phaseolus lunatus*) zeigen, dass (*Z*)-3-Hexenylacetat als typisches GLV bei Blattschäden sowohl tagsüber als auch nachts gebildet wird, während das Monoterpen (*E*)- β -Ocimen fast ausschließlich bei Tag emittiert wird. Ähnliche Beobachtungen wurden bei dem Sesquiterpen Germacren D gemacht, das von *P. trichocarpa x deltoides* nach Raupenfraß nahezu nur am Tag abgegeben wird (Arimura *et al.* 2004). Im Folgenden sollen die Ursachen für die beobachteten Emissionsmuster der GLV und Terpenoide bei *P. nigra* diskutiert werden.

GLV entstehen nach heutiger Kenntnis bei dem enzymatischen Abbau von Membranlipiden (3.4.1). In diesem Experiment ist die Emission von GLV damit höchst wahrscheinlich die Konsequenz aus der Beschädigung pflanzlicher Zellmembranen durch den Raupenfraß. Die hier beobachtete schnelle Induktion der Stoffgruppe wurde bereits bei anderen Pflanzenarten festgestellt. Mit Hilfe zeitlich hoch aufgelöster Messungen konnte gezeigt werden, dass die (*Z*)-3-Hexenal-Emission von *A. thaliana* in der Folge einer mechanischen Verwundung bereits nach 30-45 s ihr Maximum erreicht (D'Auria *et al.* 2007). In demselben Experiment wurde das Maximum der (*Z*)-3-Hexenol-Emission nach etwa 2,5 min und das Maximum der (*Z*)-3-Hexenolacetat-Emission nach 4,5-5,5 min beobachtet. Die Bildung von (*Z*)-3-Hexenal erfolgt enzymatisch durch die Oxidation von Linolensäure. Der Aldehyd wird reversibel durch eine Alkoholdehydrogenase zu (*Z*)-3-Hexenol umgebaut, das den Ausgangsstoff für die GLV-Ester bildet (Abb. 5.12, (D'Auria *et al.* 2007)).

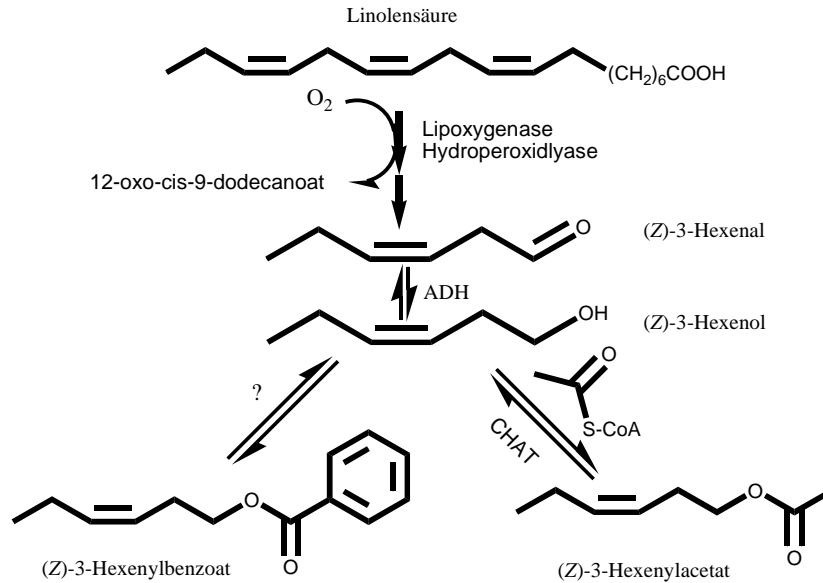


Abb. 5.12 Biosynthese der GLV-Ester über (Z)-3-Hexenal und (Z)-3-Hexenol (d’Auria *et al.* 2007). Die Ausgangsverbindung Linolensäure wird bei Herbivorie durch die Zerstörung von Zellmembranen freigesetzt. Der Abbau zu (Z)-3-Hexenal erfolgt enzymatisch unter Einwirkung von Sauerstoff. Die Reduktion von (Z)-3-Hexenal zu (Z)-3-Hexenol wird reversibel durch eine Alkoholyhydrogenase (ADH) katalysiert. Die Bildung von (Z)-3-Hexenylacetat aus (Z)-3-Hexenol und Acetyl-CoA erfolgt unter Einwirkung des Enzyms Acetyl CoA:cis-3-Hexen-1-ol Acetyl Transferase (CHAT). Der genaue Ablauf der Biosynthese von (Z)-3-Hexenylbenzoat ist bisher nicht bekannt.

Da diese Reaktionen allem Anschein nach sehr schnell ablaufen, wurde in dem hier durchgeführten Experiment ein enger zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Raupenfraß und der Abgabe von GLV beobachtet. Die nächtliche Steigerung der Emission von (Z)-3-Hexenal ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass *L. dispar* Raupen ab dem dritten Larvenstadium bevorzugt bei Dunkelheit fressen (Ebert 1994). Da die Emission von (Z)-3-Hexenal und (Z)-3-Hexenol bei Dunkelheit kaum reduziert bzw. verstärkt wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die Enzyme, die für Bildung dieser beiden Stoffe erforderlich sind, lichtunabhängig gebildet werden. Dagegen ist die Biosynthese der beiden untersuchten GLV-Ester aus (Z)-3-Hexenol nachts offensichtlich limitiert, da sich die Emission im Vergleich zur Lichtperiode etwa halbiert. Als Beschränkung für die Produktion der Ester kommen zwei Prozesse in Betracht, die ohne Lichteinstrahlung beeinträchtigt sein könnten. Zum einen könnte die Expression der Säurerest-Transferasen, die für die Übertragung des Acetat- bzw. Benzoatrestes verantwortlich sind (z.B. CHAT in **Abb 5.12**), bei Dunkelheit eingeschränkt sein. Desweiteren ist es denkbar, dass die entsprechenden Säurerest-

Substrate (z.B. Acetyl-CoA in **Abb. 5.12**) ohne Photosynthese nicht in der nötigen Menge bereitgestellt werden können.

Die Konversion von (Z)-3-Hexenal in höhere GLV ist für Pappeln möglicherweise von großer Bedeutung, da C₆-Aldehyde auch pflanzlichen Zellen schaden können (D'Auria *et al.* 2007). Die Bildung von (Z)-3-Hexenal könnte damit als spontane Reaktion aufgefasst werden, die vom Standpunkt der Pflanze aus „unbeabsichtigt“ abläuft und eine rasche Entgiftung erfordert. In diesem Fall würde die Emission des Aldehyds eine Überlastung der Alkoholdehydrogenase bedeuten, die die Reduktion zu (Z)-3-Hexenol katalysiert (**Abb. 5.12**).

Die meisten Terpenoide zeigten eine verzögerte Reaktion auf den Beginn und das Ende des Raupenfraßes und eine ausgeprägt Verringerung der Emission bei Dunkelheit. Anders als die GLV, die zumindest teilweise aus Zersetzungsprozessen entstehen, werden Terpenoide in Pflanzen mit Hilfe von Terpensynthasen aus IPP bzw. DMAPP aufgebaut (**Abb. 3.3**, (McGarvey & Croteau 1995)). Die Biosynthese ist damit an die Gegenwart der Terpensynthasen und an die Bereitstellung der Ausgangsverbindungen durch den Stoffwechsel der Pflanze gebunden. Offensichtlich nehmen die damit verbundenen Prozesse, verglichen mit den GLV, mehr Zeit in Anspruch, wodurch die Induktion zeitlich verzögert wird. Im dem hier diskutierten Experiment könnte die Induktion der Terpenoide durch das frühe Einsetzen der ersten Dunkelperiode 3 h nach Experimentbeginn zusätzlich erschwert worden sein, da alle Terpenoide über den gesamten Experimentverlauf nachts in verminderter Menge emittiert wurden. Frost *et al.* (2008) beobachteten jedoch in einem ähnlichen zeitauflösendem Experiment (Zeitauflösung: 8 h) mit *P. deltoidea x nigra*, bei dem der Raupenfraß zu Beginn einer 16 h Lichtperiode einsetzte, ebenfalls erst eine Induktion der Terpenoide nach rund 24 h.

Als Ursache für die Tag-Nacht-Rythmik der Terpenoide werden die Auswirkungen der Lichteinstrahlung auf den Stoffwechsel der Pappeln vermutet, auch wenn Einflüsse der Temperatur (tags: 22°C, nachts: 19°C) oder die Schließung der Stomata und damit verbundene Konsequenzen für Gasaustausch zwischen der Atmosphäre und dem intrazellulären Raum nicht ausgeschlossen werden können. Tatsächlich gibt es Hinweise darauf, dass die Expression der Terpensynthasen und Produktion der

Terpenvorstufen von den Lichtverhältnissen abhängt. Arimura *et al.* (2008) konnten zeigen, dass in Limabohnen das Monoterpen (*E*)- β -Ocimen vorwiegend *de novo* aus Fotoassimilaten aufgebaut wird und dass die Transkription der β -Ocimen-Synthase nur bei Lichteinstrahlung und unabhängig von der Tageszeit stattfindet. Die Bildung des Monoterpens ist während der Dunkelheit damit in doppelter Hinsicht behindert, da weder die Substrate noch die Terpensynthase zur Verfügung stehen. Bei *P. nigra* laufen offensichtlich ähnliche Prozesse ab, da die Emission einiger Terpenoide, wie z.B. Limonen oder α -Humulen nachts fast vollständig eingestellt wurde (**Abb. 8.3**, **Abb. 8.5**, Anhang). Da (*Z*)- β -Ocimen, (*E*)- β -Ocimen, DMNT, Linalool, (*E,E*)- α -Farnesen und Nerolidol aber auch nachts emittiert wurden (**Abb. 8.2**, **Abb. 8.4** und **Abb. 8.6**, Anhang), ist der limitierende Faktor bei der Produktion während der Dunkelperioden wahrscheinlich die Expression der Terpensynthesen und nicht der Mangel an Terpenvorstufen. Limonen und (*E*)- β -Ocimen werden beispielsweise mit GPP aus der gleichen Vorstufe gebildet (**Abb. 3.3**), nachts konnte jedoch nur (*E*)- β -Ocimen erfasst werden. Diese Beobachtung legt nahe, dass GPP auch bei Dunkelheit in zumindest kleineren Mengen vorhanden gewesen sein musste, die Limonensynthase im Gegensatz zur (*E*)- β -Ocimen-Synthase aber nicht exprimiert wurde.

Einige Terpenoide zeigten bei der Schwarzpappel einen sehr ähnlichen Zeitverlauf. Da es sich bei Terpensynthesen häufig um Multiproduktenzyme handelt (**Abb. 3.3**, (Bohlmann *et al.* 1998)), liegt die Vermutung nahe, dass diese Terpenoide von derselben Synthase produziert werden. Große Übereinstimmungen lagen bei den Monoterpenoiden Myrcen, Limonen und Borneol (**Abb. 8.3**, Anhang) sowie bei den Sesquiterpenen (*E*)- β -Caryophyllen, α -Humulen und Germacren D (**Abb. 8.5**, Anhang) vor. Ein nahezu identischer zeitlicher Emissionsverlauf wurde bei den beiden β -Ocimen-Konfigurationisomeren beobachtet (**Abb. 8.2**, Anhang). In der Limabohne (*Phaseolus lunatus*) ist dieselbe Terpensynthase für den Aufbau von (*E*)- β -Ocimen und (*Z*)- β -Ocimen verantwortlich (Arimura *et al.* 2008). Analogien im Emissionverhalten zeigten außerdem DMNT und Nerolidol sowie Indol und Benzylcyanid (**Abb. 8.4**, **Abb. 8.6** und **Abb. 8.8**, Anhang). Bei Versuchen mit Mais (*Zea mays* L.) wurde festgestellt, dass Nerolidol eine Vorstufe bei der DMNT-Synthese darstellt (Degenhardt & Gershenzon 2000). Die Ergebnisse des hier durchgeführten Experimentes legen vergleichbare Mechanismen in der Schwarzpappel nahe. Die Biosynthese von

Benzylcyanid ist bisher nicht erforscht, könnte aber in Beziehung zu der Indolbildung stehen, da es sich bei den beiden Stoffen um Konstitutionisomere handelt.

In der Fachliteratur wurde bereits die Frage aufgeworfen, ob die Emission von induzierbaren Volatilen zur indirekten Verteidigung mit dem Tagesrythmus von Parasitoiden oder Predatoren abgestimmt ist (Arimura *et al.* 2008). Man könnte vermuten, dass Pflanzen Volatile nur dann produzieren, wenn eine gewünschte Wirkung herbeigeführt werden kann. Das Experiment hat gezeigt, dass die Emission der meisten volatilen Verbindungen von *P. nigra* tageszeitlich schwankt und unterschiedlich schnell auf Herbivorie reagiert. Darüberhinaus wurden einige Verbindungen, wie z.B. viele Monoterpene, konstitutiv verhältnismäßig stark emittiert und mäßig induziert (**Abb. 8.3**). Für spätere Versuche sind diese Erkenntnisse von großer Bedeutung, da auf diese Weise *a priori* der optimale Zeitpunkt für die Messung einer mutmaßlichen Induktion eines bestimmten VOC abgeschätzt werden kann. So wird zum Beispiel deutlich, dass in der vorangegangenen Übersichtsanalyse durch den Versuchsablauf keine optimale Induktion der Sesquiterpene durch den Raupenfraß oder mechanische Verwundung erreicht werden konnte. Die Induktionszeit war mit rund 18 h für diese Stoffgruppe ungenügend, da die Emission langsamer auf Herbivorie reagiert und erst nach 24 h deutlich ansteigt. Außerdem könnten die beobachteten Zusammenhänge zwischen Emission und äußeren Faktoren Rückschlüsse auf die Funktion der VOC ermöglichen. Entsprechende Betrachtungen sollten im Rahmen dieser Diplomarbeit aber nicht vertieft werden.

5.3.4 Analyse der nichtflüchtigen Sekundärmetaboliten

Bei dieser Untersuchung wurden die Blätter in drei Alterklassen unterschieden. Die Zuordnung erfolgte auf der Basis der Leaf-Plastochron-Index-Konvention (LPI) (Davis *et al.* 1991), bei der das jüngste Blatt mit einer Blattlänge von 2 cm den LPI 0 zugewiesen bekommt. Das nächstältere, stammabwärts gelegene Blatt erhält den LPI 1, das übernächste den LPI 2 usw (**Abb. 5.13**). Bei diesem Experiment bildeten die Blätter mit LPI von 0 bis 5 die junge Alterklasse, mit LPI von 6 bis 11 die mittelalte und mit einem LPI von 12 bis 17 die alte Alterklasse (**Abb 5.13**). Junge Pappelblätter sind nicht vollständig entwickelt und betreiben nur eingeschränkt Photosynthese (Larson 1977; Arnold & Schultz 2002). Deshalb müssen sie Fotoassimilate von bestimmten

ausgewachsenen Blättern importieren, mit denen sie vaskulär verbunden sind (Source-Sink-Relationship). Aufgrund der Morphologie liegt in Pappeln zwischen jedem sechsten Blatt eine starke vaskuläre Verbindung und damit ein Source-Sink-Relationship vor, sodass beispielsweise LPI 0 mit LPI 5 stark verbunden ist (Abb. 5.13, (Davis *et al.* 1991; Frost *et al.* 2007)). Als Übergang von ausgewachsenen Source-Blättern zu den heranwachsenden Sink-Blättern wird bei Gattung *Populus* LPI 5 bis 6 angesehen (Larson 1977; Arnold & Schultz 2002; Frost *et al.* 2007). Die hier als mittelalt designierte Alterklasse umfasst damit die vollständig entwickelten Source-Blätter, die die Sink-Blätter der jungen Altersklasse mit Fotoassimilaten versorgen. Die Grupper der ältesten Blätter steht in keinem direkten Source-Sink-Relationship zu den jungen Blättern, da u.a. keine vaskuläre Verbindung mit den Sink-Blättern vorhanden ist. Die Bedeutung von Source-Sink-Relationships für die induzierbare Verteidigung in Sink-Blättern wurde bereits nachgewiesen (Davis *et al.* 1991; Arnold & Schultz 2002).

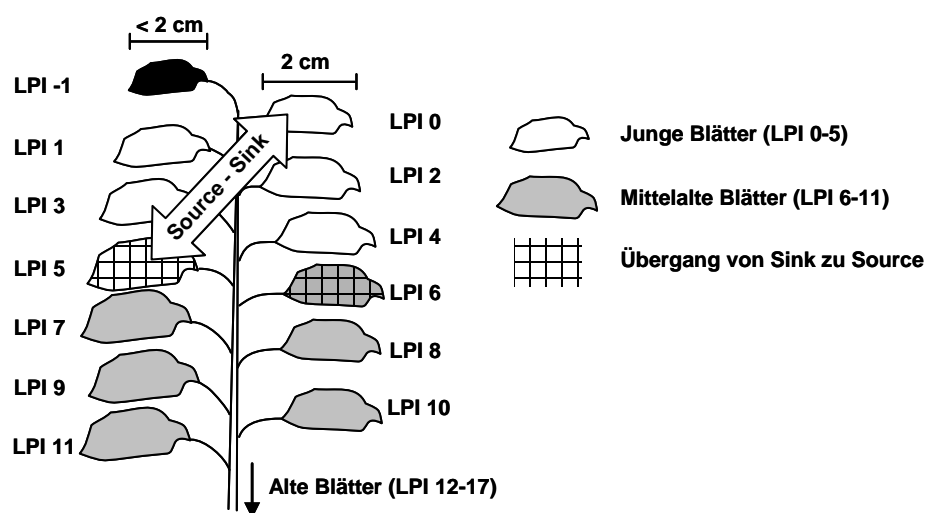


Abb. 5.13 Blattkennzeichnung nach LPI-Konvention und Einteilung der Blattaltersklassen zur Analyse der nichtflüchtigen Sekundärmetaboliten beim zeitauflösenden Experiment. Source-Sink-Relationships treten bei *Populus* zwischen zwischen jedem sechsten Blatt (dicker Pfeil zeigt Source-Sink-Relationship zwischen LPI 0 und LPI 5) von LPI 0 bis LPI 11 auf und dienen der Versorgung der jungen, nicht vollständig entwickelten Blätter. Der Übergang von Sink- zu Source-Blättern erfolgt bei LPI 5-6.

Bei der Auswertung des Experimentes wurden nur Gehalte der gleichen Altersklasse von Kontrollenbäumen und durch Raupen befallenen Bäumen verglichen. Der statistischen Analyse lag ein t-Test (zweiseitig, $P=0,05$) zugrunde. Bei den Messungen nach 7 und 10 Tagen standen keine Kontrollen zur Verfügung, deshalb wurden die

Gehalte der herbivor geschädigten Blätter von Tag 7 und Tag 10 mit dem Wert der Kontrollen von Tag 4 verglichen.

5.3.4.1 Ergebnisse der Analyse der Kondensierten Tannine (KT)

Wie aus **Abb 5.14** ersichtlich wird, wurde vier Tage nach dem Beginn der Herbivorie kein Unterschied des KT-Gehaltes zwischen den Kontrollen und den geschädigten Pflanzen beobachtet. Signifikante Steigerungen traten bei den mittelalten Blättern nach 7 und 10 Tagen sowie bei den jungen und alten Blättern nach 10 Tagen auf. Bei beiden Behandlungen wurde zu allen Messzeitpunkten in der ältesten Blattklasse der tendenziell höchste KT-Gehalt festgestellt.

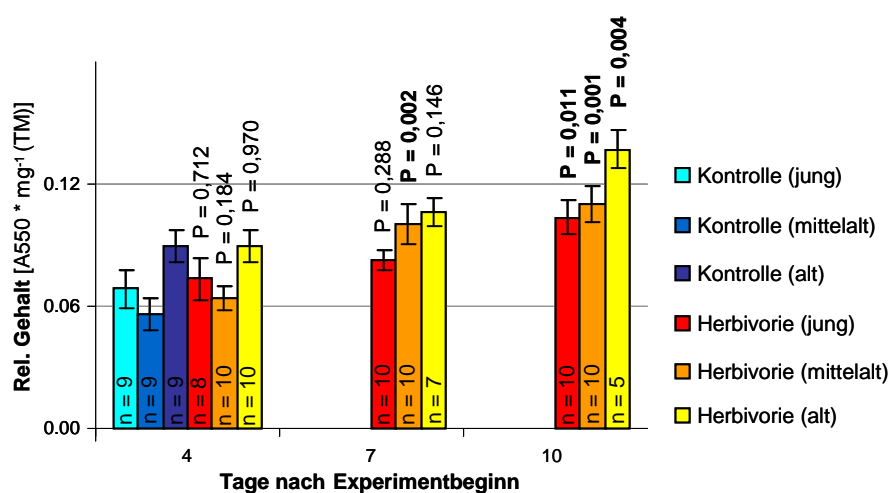


Abb. 5.14 Ergebnisse der KT-Analyse [A550 * g⁻¹(TM)] des zeitauflösenden Experimentes in Abhängigkeit vom Blattalter, der Behandlung und der Zeit nach Versuchsbeginn. Die Induktion der Bäume mit Herbivorie erfolgte mit 15 *L. dispar* Raupen während der ersten 2 Tage des Experimentes. Die Blattaltersklasse ist in der Legende in Klammern angegeben. Säulen zeigen Mittelwerte ± SE, n ist in den jeweiligen Säulen dargestellt. P-Werte bei herbivorer Behandlung zeigen das Ergebnis des t-Tests (zweiseitig, P=0,05) gegen die gleiche Blattaltersklasse der Kontrollen von Tag 4.

5.3.4.2 Diskussion der Ergebnisse der Kondensierten Tannine (KT)

Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass bei *P. nigra* mit dem BuOH/HCl-Assay 4 Tage nach der Induktion durch Raupenfraß keine messbare Änderung des KT-Gehaltes im Blattwerk nachgewiesen werden konnte. 3 Tage später wurde zumindest in den mittelalten Blättern ein Anstieg beobachtet, während nach insgesamt 10 Tagen alle untersuchten Blattaltersklassen erhöhte KT-Gehalte aufwiesen. Die Ergebnisse bestätigen zum Teil die Berichte von Peters *et al.* (2002), die ein vergleichbares

Experiment mit *P. tremuloides* durchführten. Dabei wurde der KT-Massenanteil der Blätter 0, 1, 2, 3 und 6 Tagen nach einer mechanischen Verwundung untersucht, wobei erst nach 6 Tagen ein signifikanter Anstieg beobachtet wurde. Außerdem wurde im älteren Blattwerk von *P. tremuloides* ebenfalls ein höherer KT-Gehalt als im jüngeren festgestellt (Peters & Constabel 2002).

Zusammenfassend konnte in diesem Experiment bewiesen werden, dass KT in *P. nigra* Blättern durch Raupenfraß induziert werden und diese Induktion mit dem verwendeten Analyseverfahren in einem Zeitraum von 7-10 Tagen nachgewiesen werden kann. Augenscheinlich läuft die Induktion in den Source-Blättern (**Abb. 5.14**) am schnellsten ab, die im Gegensatz zu den jungen und alten Blättern bereits an Tag 7 einen signifikant erhöhten KT-Gehalt zeigten. Die Gründe für diese Beobachtung blieben unklar. Es kann vermutet werden, dass diese Blätter aufgrund ihrer Entwicklungsstufe und ihrer licht-exponierten Position über die höchste Photosyntheserate verfügen und deshalb am schnellsten mit der Produktion von KT beginnen konnten. Allerdings bleibt es zweifelhaft, ob den mittelalten Blättern tatsächlich die meisten Ressourcen zur Verfügung stehen, da ein unbestimmter Teil des assimilierten Kohlenstoffs durch das Source-Sink-Relationship in die Altersgruppe der jungen Blätter exportiert wird (Arnold & Schultz 2002).

Das Resultat des Experimentes sollte aufgrund der fehlenden Kontrollen nach 7 und 10 Tagen Induktionszeit kritisch hinterfragt werden. Pappeln reichern im Verlaufe einer Vegetationsperiode KT in ihrem Blattwerk an (Lindroth *et al.* 1987; Osier *et al.* 2000b). Aus Platzmangel in der Klimakammer mussten Teile des Experimentes zeitversetzt durchgeführt werden. Daraus ergab sich zwischen den Kontrollen von Tag 4 und den Bäumen mit 7 bzw. 10 Tagen Induktionszeit bei der Blatternte eine reale Alterdifferenz von 7 bzw. 10 Tagen, anstatt von 3 bzw. 6 Tagen. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Steigerung des KT-Gehaltes teilweise saisonal bedingt war und nicht vollständig durch Induktion verursacht wurde. Das Ausmaß der beobachteten Gehaltsveränderungen macht jedoch eine ausschließlich altersbedingte Anreicherung der KT unwahrscheinlich.

5.3.4.3 Ergebnisse der Analyse der phenolischen Glykoside (PG)

Zusätzlich zu Salicortin und „Hydroxytremulacin“, die auch in der Übersichtsanalyse (5.2.4.1) in Blättern von *P. nigra* nachgewiesen wurden, konnte in den Blättern beim zeitauflösenden Experiment Salicin erfasst werden. Den relativen Anteil dieser drei Substanzen an der Blattdrockenmasse zeigt **Abb. 5.15**. In den alten Blättern der Kontrollen wurde im Vergleich zu den beiden anderen Alterklassen ein nur etwa halb so großer PG-Massenanteil beobachtet. Bei den durch Raupenfraß induzierten Bäumen ließen sich im Verlauf des Experimentes mit Hilfe eines t-Tests Veränderungen im Gehalt der PG gegenüber den Kontrollen feststellen. Salicin wurde 4 Tage nach Experimentbeginn in den jungen und mittelalten Blättern mit Herbivorie angereichert. Am Tag 7 und 10 wurde diese Anreicherung nicht mehr nachgewiesen, wobei am Tag 7 in den jungen Blättern sogar eine signifikante Abnahme der Salicinkonzentration beobachtet wurde. Salicortin wurde durch den Raupenfraß nicht induziert. Der Gehalt blieb in den mittelalten und alten Blättern im Verlaufe des Experimentes konstant, in der jungen Blattaltersklasse mit Herbivorie wurde nach 7 und 10 Tagen signifikant weniger Salicortin nachgewiesen. Bei „Hydroxytremulacin“ wurde am Tag 4 in den mittelalten Blättern und am Tag 10 in den alten Blättern eine signifikante Zunahme des relativen Gehaltes festgestellt. Wie bei den Kontrollen enthielt die Gruppe der ältesten Blätter bei der herbivoren Behandlung weniger PG als die Gruppe der mittelalten und jungen Blätter. Tendenziell wurde die Differenz mit zunehmender Induktionszeit jedoch verringert, sodass am Tag 10 im Vergleich zu den Kontrollen eine starke Annäherung des PG-Gehaltes der alten Blätter an den Gehalt der mittelalten und jungen Blätter beobachtet wurde.

5.3.4.4 Diskussion der Analysenergebnisse der Phenolischen Glykoside (PG)

Bei den untersuchten Vertretern der PG wurden widersprüchliche Beobachtungen gemacht. Salicin und „Hydroxytremulacin“ wurden nach 4 Tagen in den Source- und Sink-Blättern kurzzeitig induziert, anschließend jedoch wieder abgebaut oder auf andere Art verbraucht. Der Gehalt von Salicortin und „Hydroxytremulacin“ nahm in den alten Blättern nach 10 Tagen tendenziell zu. In den jungen Blättern wurde jedoch am 7 und 10 Tagen weniger Salicortin nachgewiesen.

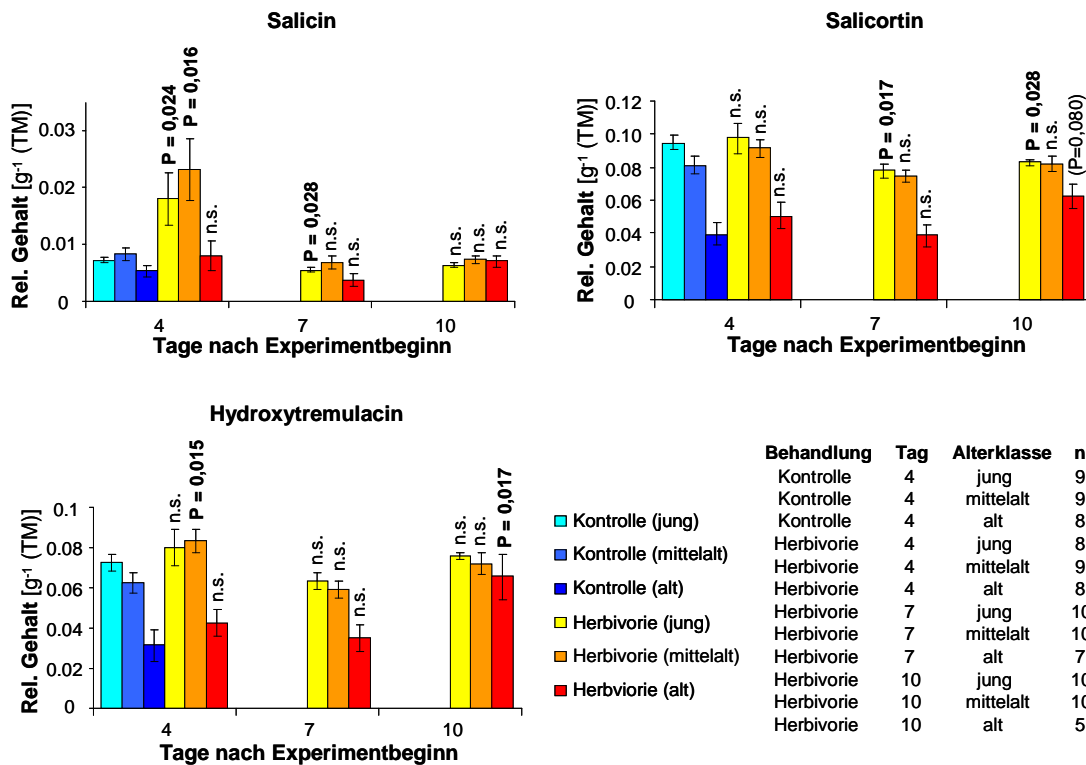


Abb. 5.15 Relativer PG-Gehalt [g⁻¹ (TM)] der *P. nigra* Blätter im zeitauflösendes Experimentes in Abhängigkeit von der Behandlung, der Blattaltersklasse und der Zeit nach Beginn der Induktion. Die Induktion der Bäume mit Herbivorie erfolgte mit *L. dispar* Raupen während der ersten 48 h des Experimentes. Balken zeigen Mittelwerte ± SE, Farben zeigen Blattaltersklasse (siehe Legende), n ist der Tabelle unten rechts zu entnehmen. Der statistische Vergleich (t-Test, zweiseitig, P=0,05) aller Bäume mit Herbivorie erfolgte gegen die gleiche Blattalterklasse der Kontrollen von Tag 4 nach Experimentbeginn. Bei nicht normalverteilten Daten Mann-Whitney Rang Summen Test. Signifikante Unterschiede sind mit P-Wert angegeben. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

Der sprunghafte Anstieg von Salicin in den jungen und mittelalten Blättern vier Tage nach Beginn des Raupenfraßes lässt zunächst auf die Induzierbarkeit der PG schließen. Es ist denkbar, dass Salicin in der Folge bei der Biosynthese höhermolekularer PG verbraucht wurde und deshalb nach 7 bzw. 10 Tagen wieder das Niveau der Kontrollen erreichte. Diese Theorie wird jedoch nicht durch den zeitlichen Verlauf von Salicortin und „Hydroxytremulacin“ gestützt, da sich der Gehalt dieser Stoffe in den jungen und mittelalten Blättern nicht änderte oder sogar abnahm. Allerdings erhöhte sich der Gehalt dieser beiden PG augenscheinlich in den alten Blättern. Es ist unwahrscheinlich, dass Salicortin und Hydroxytremulacin von den Source- und Sink-Blättern in die alten Blätter befördert wurden, da der Stofftransport in Pappeln apikal verläuft (Arimura *et al.* 2004). Insofern zeichnet sich ab, dass die PG zumindest im älteren Blattwerk, das konstitutiv schwächer mit dieser Stoffgruppe verteidigt ist, langfristig induzierbar sind.

Der Anteil der PG an der Trockenmasse junger Pappelblätter kann bis zu 30% betragen (Donaldson *et al.* 2006). Es ist denkbar, dass die enorme Menge bereits die Obergrenze darstellt und die Stoffgruppe aus diesem Grund in den jungen Blättern nicht weiter angereichert werden kann. Eine blattaltersabhängige Induzierbarkeit könnte die Erklärung für die widersprüchlichen Angaben in der Literatur über das Verhalten der PG nach Insektenfraß bieten. Möglicherweise hängt die Induktion in der Gruppe der alten Blätter aber auch damit zusammen, dass dort die meisten Fraßschäden auftraten. Der Blattflächenverlust wurde am Ende des Experimentes fotografisch dokumentiert, die Daten wurden bisher jedoch nicht ausgewertet und deshalb nicht in diese Diplomarbeit implementiert.

In der Literatur ist die Induzierbarkeit von PG in Pappeln strittig (Philippe & Bohlmann 2007). Zusammenfassend konnten in diesem Experiment Hinweise auf eine kurzzeitige Induktion von Salicin in den Soruce- und Sinkblättern, sowie auf eine langfristige Induktion von Salicortin und Hydroxytremulacin in älteren Blättern gesammelt werden. Allerdings wurde in einigen Fällen auch ein abfallender Gehalt nach Herbivorie beobachtet, sodass keine eindeutige Aussage über das Verhalten PG nach Insektenfraß getroffen werden konnte. Als problematisch sind vor allem die fehlenden Kontrollen am Tag 7 und 10 anzusehen, die als Vergleichsmaßstab für die Bäume mit Herbivorie nötig gewesen wären. Der hier durchgeführte Vergleich mit den jüngeren Kontrollen birgt einige Erschwernisse durch saisonale Effekte, da PG im Verlauf einer Vegetationsperiode abgebaut werden (Lindroth *et al.* 1987). Aus Platzmangel in der Klimakammer wurden Teile des Experimentes zeitversetzt durchgeführt, wodurch die reale Altersdifferenz zwischen den Kontrollen von Tag 4 und den Bäumen mit 7 bzw. 10 Tagen Induktionszeit 7 bzw. 10 Tage anstatt 3 bzw. 6 Tage betrug. Der jahreszeitlich bedingte Abbau der PG in diesem Zeitraum könnte eine eventuelle Induktion überlagern und eine den Abfall des Salicortingehaltes in den jungen Blättern erklären. Als Ursache für die teils widersprüchlichen Ergebnisse sollte auch das Analyseverfahren in Betracht gezogen werden, das aufgrund der großen Anzahl der Arbeitsschritte viele Möglichkeiten für zufällige und systematische Fehler birgt.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden die analytischen Voraussetzungen für die Betrachtung der nach heutigen Kenntnissen wichtigsten chemischen Verteidigungsmetaboliten der Gattung *Populus* geschaffen. Im Zuge dessen wurde ein flexibles Bauprinzip für ein vielseitig verwendbares Push-Pull-System zur VOC-Probenahme entwickelt. Darüberhinaus wurde das Verfahren zur KT-Analyse nach Porter an die vorliegenden Erfordernisse angepasst und die Leistungsfähigkeit abgesichert. Außerdem wurde in Anlehnung an die in der Literatur beschriebenen Verfahren ein Protokoll zur Analyse der PG entwickelt und validiert.

Bei den experimentellen Arbeiten wurde die Reaktion der Sekundärmetaboliten auf Blattschäden in abgeschnittenen Zweigen von *P. trichocarpa* und *P. nigra* untersucht. Dabei wurden mechanisch verwundete und durch Raupenfraß beschädigte Äste mit unbehandelten Kontrollen verglichen. Aufgrund der kurzen Induktionszeit konnte nur bei den VOC eine Reaktion auf die Schäden beobachtet werden, die im Fall von *P. nigra* schwächer als erwartet ausfiel. Bei *P. trichocarpa* wurde eine wesentlich höhere Emission und eine stärkere Induzierbarkeit der meisten VOC festgestellt. Die qualitative Analyse der Blattextrakte beider Spezies lieferte Hinweise auf ein unbekanntes PG, für das anhand der Messdaten die Strukturhypothese „Hydroxytremulacin“ formuliert wurde.

Im zweiten Experiment wurde der zeitliche Verlauf der VOC, PG und KT von *P. nigra* bei Kontrollbäumen und bei *L. dispar* geschädigten Bäumen dokumentiert. Viele VOC wurden nur nach Raupenfraß emittiert. Die Emission zeigte dabei in vielen Fällen eine Abhängigkeit von der Beleuchtung. Außerdem erfolgte die Induktion bei Eintritt der Fraßschäden und die Abnahme der Abgabe nach Ende der Fraßschäden unterschiedlich schnell. Die beobachteten Emissionsmuster konnten zumindest teilweise anhand der heutigen Kenntnisse über die VOC-Biosynthese erklärt werden. Bei den kondensierten Tanninen wurde eine deutliche Induktion innerhalb von zehn Tagen beobachtet. Allerdings wurden die Erkenntnisse des Experimentes durch die Grenzen des Analyseverfahrens und die teilweise fehlenden Kontrollen limitiert. Die PG zeigten, mit Ausnahme von Salicin nach vier Tagen, nur in den älteren Blättern in einem Zeitraum

von etwa zehn Tagen eine Tendenz zur Induzierbarkeit. In den jungen Blättern wurden nur wenige Anzeichen für eine Anreicherung nach Herbivorie gefunden. Leider wurde auch die Aussagekraft dieser Beobachtungen durch fehlende Kontrollmessungen eingeschränkt.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte der Grundstein für die weitere Erforschung der zwischenpflanzlichen Kommunikation bei *P. nigra* gelegt werden. Die chemische Verteidigung der Schwarzpappel wurde weitestgehend skizziert und bei allen betrachteten Stoffklassen Anzeichen für eine Induzierbarkeit gefunden. Zukünftige Experimente sollten sich auf die Induktion der PG und KT durch Priming konzentrieren, da die Abläufe bei den VOC durch einen Artikel, der im Verlaufe dieser Diplomarbeit veröffentlicht wurde, bereits ansatzweise charakterisiert wurden (Frost *et al.* 2008). Wie die Ergebnisse der hier durchgeführten Experimente zeigen, ist Priming bei den PG und KT wahrscheinlich wesentlich wichtiger, da diese im Vergleich zu den VOC nach Fraßschäden deutlich langsamer angereichert werden. Den nächsten Schritt könnte ein Laborexperiment darstellen, bei dem das Verhalten der PG und KT in Pappeln nach der Begasung mit dem VOC-Bouquet induzierter Artgenossen untersucht wird.

Für die weiterführenden Betrachtungen sollten die analytischen Methoden verfeinert und absolute Bestimmungen ermöglicht werden. Für die VOC bedeutet das die Absicherung der Strukturzuweisung, eine Überprüfung der Wiederfindungsraten in den Probenahmesystem und eine Kalibration für den massenselektiven Detektor. Bei den kondensierten Tanninen sollten die systematischen und zufälligen Fehler des Verfahrens eingehender betrachtet werden. Darüberhinaus bedürfen quantitative Angaben auch hier einer Kalibration mit einem Standard, dessen Struktur möglichst der von kondensierten Tanninen in *P. nigra* gleicht. Die Strukturen der erfassten PG sollte durch Isolierung mit präparativer HPLC und NMR-Analysen aufgeklärt werden. Mit den isolierten Stoffen könnte anschließend kalibriert werden. Das übergeordnete Ziel bleibt weiterhin die Beobachtung von Priming unter Freilandbedingungen und möglichst ohne manipulative Maßnahmen.

7 Experimenteller Teil

7.1 Ablauf des Übersichtsanalyse (5.2)

Das Experiment wurde mit abgeschnittenen Ästen von Bäumen aus dem Freiland durchgeführt. Die *P. nigra* Proben stammten von einem ausgewachsenen Baum (geschätztes Alter: 50-70 Jahre) auf dem Sportforum in Jena (50°54'41,53''N, 11°35'01,86''E). Äste von *P. trichocarpa* (Klon: Muhle Larsen) wurden auf der Energieholzplantage der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft in Dornburg von jungen, ca. 5 Jahre alten Bäumen abgeschnitten. Zweige der beiden Baumarten wurden jeweils am Vormittag geschnitten und die Schnittfläche umgehend bis zum Ende des Experimentes unter Wasser getaucht. Nach dem Transport ins Labor wurden alle Äste auf 25 cm Länge gekürzt und in der 12 h dauernden Induktionsphase in einer Klimakammer den jeweiligen Behandlungen unterzogen. Die Bedingungen in der Klimakammer können Abschnitt 7.3 entnommen werden. Die mechanische Verwundung wurde durch eine Lochzange verursacht, indem Löcher im Durchmesser von 5 mm in die Blätter gestanzt wurden. Jedes Blatt der *P. trichocarpa* Zweige wurde zu Beginn und am Ende der Induktionsphase mit je 2 Löchern verwundet. Die Blätter von *P. nigra* waren kleiner und wurden zu beiden Zeitpunkten mit nur einem Loch versehen. Die herbivore Behandlung bestand aus 10 *L. dispar* Raupen im 4-5. Larvenstadium. Nach der Induktionsphase wurde eine sechs Stunden dauernde VOC-Probenahme in Push-Systemen (7.4.2) durchgeführt. Da nur 20 Push-Systeme zur Verfügung standen, wurde das Experiment in vier Durchgänge unterteilt. Pro Durchgang wurde eine Pappelart mit jeweils 5 Replikaten jeder Behandlung gemessen. Der Luftfluss betrug bei allen Systemen $1,5 \text{ L min}^{-1}$. Um tageszeitliche Schwankungen der VOC-Emission zu vermeiden, begann die Probenahme zwischen 10 und 11 Uhr vormittags. In der Auswertung wurden nur Volatile berücksichtigt, die bei mindestens einer Behandlung in sieben von zehn Replikaten nachgewiesen wurden. Im Anschluss an die VOC-Probenahme wurden alle Blätter zur Analyse der Blatinhaltsstoffe wie unter 7.6 beschrieben geerntet. Bei den *P. nigra* mit *L. dispar* Behandlung wurden nicht

alle Blätter durch die Raupen verwundet. Beschädigte und unbeschädigte Blätter wurden getrennt analysiert.

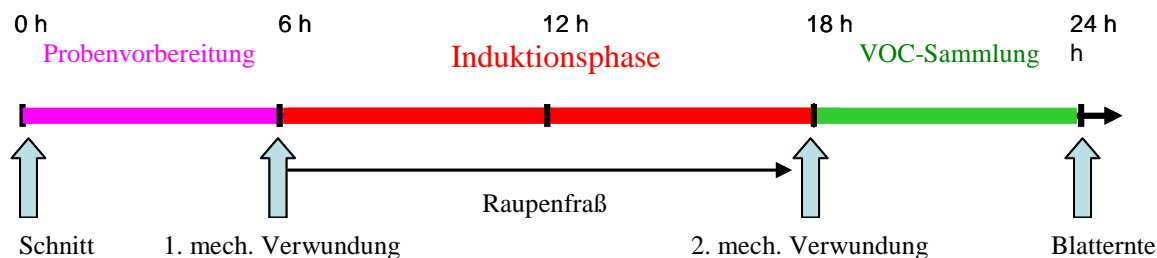


Abb. 7.1 Zeitlicher Ablauf der Übersichtsanalyse mit Zweigen von *P. nigra* und *P. trichocarpa*.

7.2 Ablauf der zeitauflösenden Experimentes (5.3)

Die VOC-Probenahme wurde mit jungen Schwarzpappeln (Klon: Leipzig, Aufzucht siehe 7.3.1) in einer Klimakammer mit einer 14:10 h:h Fotoperiode und Nachtphasen von 20:00 bis 6:00 Uhr durchgeführt (weitere äußere Bedingungen: siehe 7.3.1). Die Pappeln hatten zu diesem Zeitpunkt eine Größe von etwa 35 cm und wurden für die Dauer des Experimentes regelmäßig gewässert. Die VOC-Probenahmesysteme wurden für das Experiment nach der unter 7.4.3 Bauweise hergestellt. Der Durchmesser der zylindrischen Systeme betrug 26 cm, die Höhe 50 cm. Die Luftflüsse bei jedem System betragen $2,5 \text{ L min}^{-1}$ (Zufluss) und $1,5 \text{ L min}^{-1}$ (Absaugung). Das Volumen eines Probenahmesystems belief sich auf rund 25 L, sodass die Luft bei jeder VOC-Probenahme mehr als 30-mal ausgetauscht wurde. Es wurden zehn *L. dispar* befallene Bäume und ebenso viele Kontrollen gemessen. Das Experiment wurde um 17:00 Uhr mit gestartet. Die VOC-Probenahmen erfolgten über einen Zeitraum von je 6 h, sodass über die Experimentdauer von 96 h pro Individuum 16 VOC-Messungen durchgeführt wurden. Die Herbivorie begann mit Experimentbeginn durch 15 *L. dispar* Raupen, die 48 h später entfernt wurden. Nach Ende der VOC-Probenahme wurden die Blätter für weitere Analysen wie unter 7.6 beschrieben geerntet. Dabei wurden drei Blattaltersklassen auf der Basis der LPI-Konvention unterschieden (Abb. 5.13 (Davis 1991)). Das jüngste Blatt, das als Probe genommen wurde, war vollständig entrollt und hatte eine Blattlänge von mindestens 2 cm ohne Stiel (LPI 0 Blatt). Ausgehend von

diesem Blatt wurden stammabwärts je 6 Blätter als Mischprobe geerntet und bildeten eine Alterklasse. Ältere Blätter als LPI 17 wurden verworfen, sodass ein Baum in der Regel drei Blattproben lieferte (LPI 0-5, 6-11, 12-17).

Vier Tage nach Abschluss der VOC-Messung wurden in der gleichen Klimakammer 20 weitere Bäume für 48 h induziert. Das Blattwerk von je zehn Bäumen wurde sieben und zehn Tage nach Beginn der Induktion geerntet und der Gehalt der PG und KT analysiert. Bei diesem Teil des Experimentes wurden keine Kontrollen gemessen.

7.3 Anzucht der Versuchsorganismen

7.3.1 Kultivierung der Pappeln und Klimaparameter

Die Pappeln (Klon: Leipzig) wurden aus Steckhölzern der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt (Hann. Münden <http://www.nw-fva.de>) angezogen. Dazu wurden 2 L Rosentöpfe mit einem entsprechenden Volumen Substrat verwendet. Das Substrat bestand aus 2 Teilen Tonsubstrat (Klasmann-Deilmann, Geste-Groß Hesepe, Deutschland), 2 Teilen Goldhumus und einem Teil Sand (Korngröße: 0,4-1,2 mm). Die Aufzucht fand in einer Klimakammer mit einer 14:10 h:h Fotoperiode statt. Tagsüber herrschten 22 °C, 70 % Luftfeuchte und eine Lichtintensität von $175 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, nachts 19 °C und 70 % Luftfeuchte. Das Licht wurde durch Lampen vom Typ Sublux Ace® NH360FLX (EYE Lighting Int., Mentor, OH, USA) erzeugt. Die Bäume wurden nach Bedarf gewässert und gedüngt. Die Schädlingskontrolle erfolgte soweit möglich biologisch. Nur bei kritischen Populationen von Schadinsekten wurde das Insektizid CONSERVE (Wirkstoff: Spinosad) eingesetzt.

Experimentelle Arbeiten wurden in einer separaten Klimakammer verrichtet. Die Bedingungen in dieser Klimakammer waren bis auf das Licht identisch zur Anzuchtammer. Die Pflanzen wurden hier durch Clean-Ace® MT 4000L/BH Lampen (EYE Lighting Int., Mentor, Ohio, USA) mit einer Lichtintensität von $140 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ bestrahlt.

7.3.2 Aufzucht von *Lymantria dispar*

Die in den Experimenten verwendeten Raupen wurden aus Eiern der Northern Research Station (USDA Forest Service, Hamden CT, USA) oder Eiern aus einer

Freilandsammlung in Deutschland aus dem Jahr 2007 aufgezogen. Sie wurden bis zur Verwendung bei °4C gelagert. Zum Schlüpfen wurden die Eier auf Raumtemperatur erwärmt. Die geschlüpften Raupen wurden in Petrischalen oder Plastikboxen unter Laborbedingungen gehalten und mit Gypsy Moth Wheat Germ Diet (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) ernährt. In den Experimenten wurden Raupen ab dem 4. Larvenstadium genutzt. Unmittelbar vor Experimentbeginn wurden die Raupen für 24h ohne Nahrung gehalten.

7.4 Probenahme der volatilen Stoffe

7.4.1 Allgemeines zur Probenahme von VOC

Für Headspaceanalysen von Pflanzen existieren unterschiedliche Probenahmetechniken, die auf demselben Grundprinzip aufbauen (Tholl *et al.* 2006). Im Allgemeinen wird das Untersuchungsobjekt in einem Behältnis von der umgebenden Atmosphäre separiert und die von ihm in das Behältnis abgegebenen flüchtigen Stoffe an einem Adsorbens gebunden. Anschließend werden die Analyten desorbiert und analysiert.

7.4.2 Probenahme im Push-System

Bei der Charakterisierung der Sekundärmetaboliten von *P. nigra* und *P. trichocarpa* (siehe 5.2) wurde zur Probenahme der VOC ein Push-System eingesetzt. Bei dieser Probenahmetechnik wird das Versuchsobjekt für gewöhnlich in einem Glasbehältnis hermetisch abgeriegelt. Durch das System wird Luft gedrückt, die die vom Versuchsobjekt emittierten Volatile aufnimmt. Beim Verlassen des Systems passiert die Luft ein Adsorbens, an dem die Volatile abgeschieden werden. Der Aufbau ist in **Abb. 7.2** dargestellt. Als Behältnis zur Probenahme dienten in dieser Diplomarbeit 3000 mL Planflaschbecher (Duran Group GmbH, Mainz, Deutschland) mit zugehörigem 4x NS 29/32 Deckel. Das Untersuchungsobjekt wurde in dem System platziert und der Becher mit dem Deckel verschlossen. Dazu wurde die Schliffverbindung zwischen Becher und Deckel mit einem Teflon-O-ring und einem Schnellspanner abgedichtet. Der mittig gelegene NS 29/32 im Deckel des Gefäßes diente der Luftzufuhr. Die Verbindung zwischen Deckel und Luftzuleitung bildete ein selbstangefertigter, durchbohrter PEEK-Stopfen mit einer IQS-Steckverschraubung (Jenpneumatik & Schlauchtechnik, Jena,

Deutschland). Ein weiterer NS 29/32 im Deckel wurde als Luftausgang genutzt und mit einem ebenfalls selbstangefertigten, durchbohrten PEEK-Stopfen verschlossen, der gleichzeitig als Halterung für das Adsorbens (7.5.1) diente. Der Stopfen war so konstruiert, dass die Luft beim Entweichen das Adsorbens passieren musste. Die beiden verbleibenden NS 29/32 Ausgänge des Deckels wurden mit Glasstopfen verschlossen. Alle Stopfen wurden mit Schliffklemmen gesichert. Sämtliche Komponenten, die während eines Experimentes mit dem Innenraum des Systemes in Kontakt kamen, wurden vor der Durchführung gründlich mit Aceton gereinigt.

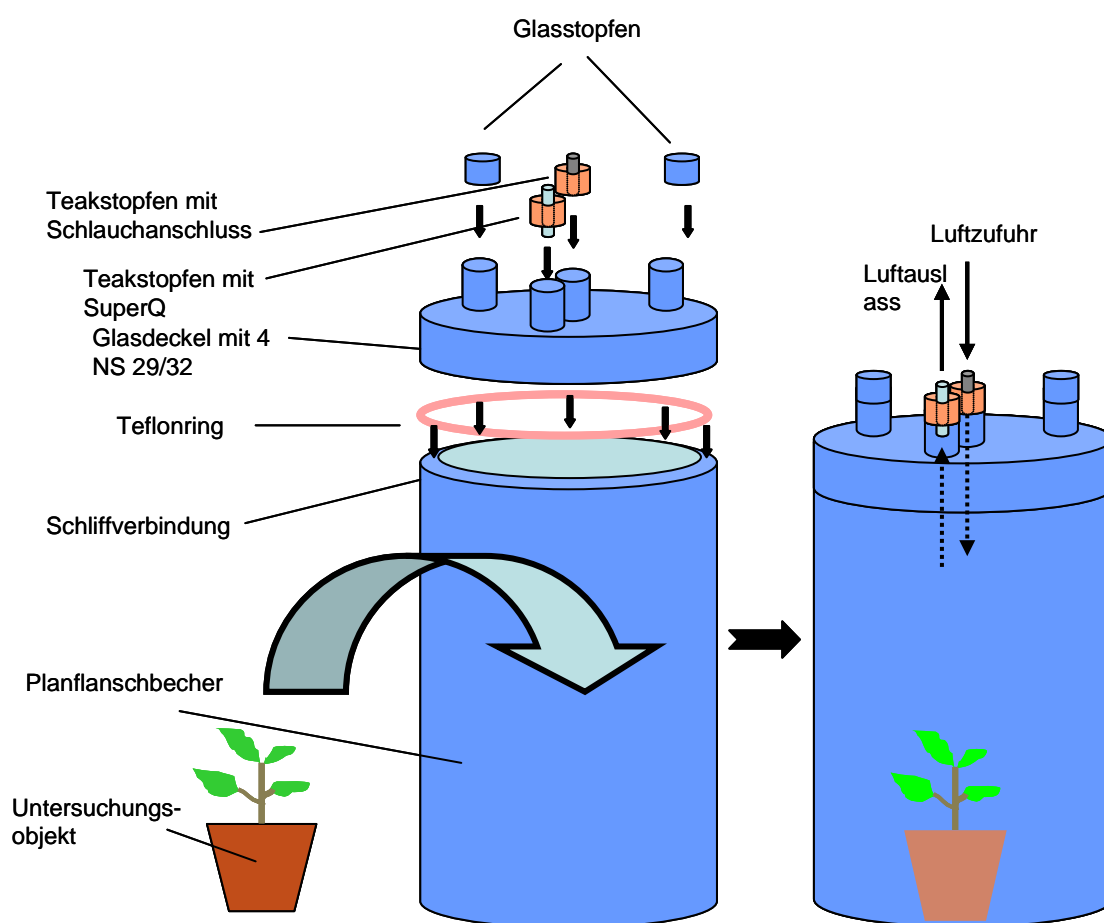


Abb. 7.2 Schematische Darstellung des Push-Probenahmesystems.

7.4.3 Probenahme im Push-Pull-System

Für die im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführten zeitauflösende Messungen von VOC an Bäumen (siehe 5.3) musste ein neues Probenahmesystem konzipiert und gebaut

werden, da die etablierten Systeme die Erfordernisse für eine solches Experiment nicht erfüllen konnten. In erster Linie musste das System der Größe eines jungen Baumes angepasst sein und sollte eine störungsarme und repräsentative Messung zu jedem beliebigen Zeitpunkt ermöglichen. Gleichzeitig mussten innerhalb des Systems über mehrere Tage hinweg physiologische Bedingungen für Pflanze und Tier gewährleistet sein. Außerdem war eine einfache Konstruktion in größeren Stückzahlen und eine spätere Verwendung des Bauprinzips im Freiland wünschenswert. Von den gängigen Techniken konnte nur ein Push-Pull-System diesen Ansprüchen genügen. Bei dieser Methode wird in das Behältnis, in dem sich das Untersuchungsobjekt befindet, Luft hinein geblasen und gleichzeitig eine kleinere Menge heraus gezogen. Die abgezogene Luft wird über das Adsorbens geleitet, an dem die Analyten abgeschieden werden. Die überschüssige Luft verlässt das System durch kleinere Lecks und verhindert, dass Kontaminationen aus der umgebenden Atmosphäre eindringen können. Daraus ergibt sich der eigentlich Vorteil des Systems: die Anforderungen an die Beschaffenheit der Systembegrenzung sind gering. Das macht den Einsatz von Folien möglich, wodurch die Ausmaße des Systems fast beliebig gewählt werden können. Der Nachteil der Push-Pull-Methode ist die Voraussetzung einer genauen Flusskontrolle. Durch Lecks verlassen auch Analytmoleküle das System. Das Verhältnis von eingeleiteter zu abgesaugter Luft muss bekannt sein, um den systematischen Fehler durch den Analytverlust korrigieren zu können.

Der Aufbau des Push-Pull-Systems, welcher im Rahmen dieser Diplomarbeit etabliert wurde, ist in **Abb. 7.3** dargestellt. Die Außenwandung des Systems bildete eine 36µm starke PET-Folie (Strohmeier & Ernst, Rhede-Wiedenbrück, Deutschland). PET-Folie wurde bereits in anderen Studien eingesetzt (Tollsten & Muller 1996; Heil & Silva Bueno 2007) und auf ihre Eignung bei Headspaceanalysen getestet (Stewart-Jones & Poppy 2006). Bei der unbehandelten Folie wurden Ausgasungen von Aldehyden und Weichmachern festgestellt, die aber durch mehrstündiges Ausheizen der Folie bei 80 °C weitestgehend minimiert werden konnten. Aus der Folie wurden mit Hilfe eines Folienschweißgerätes Zylinder hergestellt, die die Wandung des Systems darstellten. Die Höhe und der Durchmesser des Folienzylinders konnte der Größe des Untersuchungsobjektes angepasst werden. Als Deckelplatte kam eine 6 mm starke, runde Plexiglasscheibe zum Einsatz, in die zwei Steckverschraubungen zur Luftzu- und

abfuhr eingelassen waren. Die Platte diente zur Formgebung der Folie und gewährleistete eine robuste Verbindung zwischen den luftleitenden Schläuchen und dem Probenahmesystem. Sie hatte den identischen Durchmesser wie der Folienzylinder und wurde auf der systemzugewandten Seite mit PET-Folie abgeklebt, um das Plexiglas vom Innenraum des Systems zu separieren. Folienzylinder und Deckelplatte wurden vor den Experimenten zur Thermodesorption von flüchtigen Verunreinigungen bei 80°C für min. 1 h ausgeheizt. Da weder das Plexiglas noch die Folie vollkommen lichtdurchlässig waren, war die Lichtintensität im Inneren um ca. 30% geringer als in der Umgebung.

Beim Aufstellen des Systems (**Abb. 7.3**) wurde das eine Ende des PET-Folienzylinders über die Deckelplatte gestülpt und mit einem Kabelbinder fixiert. Die Versuchspflanze wurde durch das andere Ende in den PET-Folienzylinder eingeführt und dessen unteres Ende durch einen Strick möglichst dicht mit dem Topf oder dem Stamm der Pflanze verbunden. Die Frischluft wurde innerhalb des Systems durch einen perforierten Teflonschlauch verteilt. Die Luftabsaugung geschah nach demselben Prinzip. Durch die Löcher in den Schläuchen sollte eine gleichmäßige Luftdurchmischung erreicht und eine punktförmige Probenahme vermieden werden. Die abgesaugt Luft wurde außerhalb des Systems durch eine Patrone geleitet, in dem sich das Adsorbens befand. Die eigentliche Probenahme konnte dadurch extern durchgeführt werden, wodurch alle Messungen ohne Eingriff in das System begonnen und beendet werden konnten. Die Flüsse in und aus dem System wurden dessen Volumen angepasst, wobei stets mehr Luft eingeleitet als abgesaugt wurde. Die Flüsse wurden so gewählt, dass im Verlauf eines Experimentes das gesamte Gasvolumen mehrfach ausgetauscht wurde. Vor Messbeginn wurde das System bei eingestellten Flüssen für mindestens eine Stunde equilibriert.

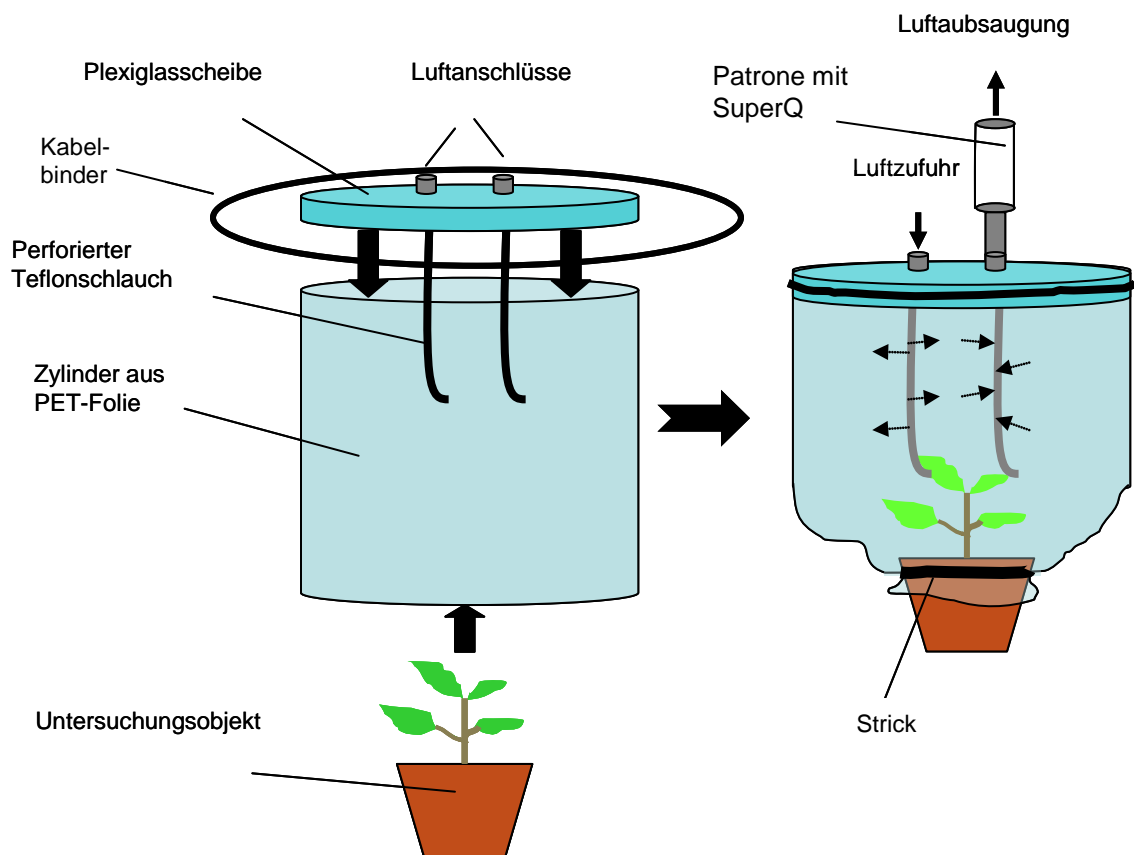


Abb. 7.3 Schematischer Aufbau des Push-Pull-Probenahmesystems

7.4.4 Lufttransport und Flusskontrolle

Als Druckluftquelle diente das hauseigene Druckluftsystem. Falls ein Vakuum benötigt wurde, wurde dieses durch einen Konverter aus der Druckluft erzeugt. Die Druckluft wurde durch einen Aktivkohlefilter von Unreinheiten befreit. Da bei allen Experimenten mit einer großen Zahl von Replikaten gearbeitet wurde, standen nicht genug Gaswaschflaschen zum Anfeuchten der Luft zur Verfügung. Auf eine Anfeuchtung der Luft musste verzichtet werden. Aus diesem Grund war die eingeleitete Luft mit einer Luftfeuchte von etwa 30% relativ trocken. Als Luftleitungen wurden Teflonschläuche mit 6 mm (Druckluft) und 4 mm (Vakuum) Innendurchmesser verwendet. Die Verbindung zwischen Schläuchen und Probenahmesystemen bildeten IQS-Steckverschraubungen. Zur Flussregulierung dienten Drosseln. Die Messung des Flusses erfolgte diskontinuierlich mit einem Flowmeter zwischen Drossel und Probenahmesystem. Die für den Lufttransport und die Flusskontrolle verwendeten

Gerätschaften wurden von Jenpneumatik & Schlauchtechnik GmbH (Jena, Deutschland) bezogen.

7.5 Analyse der volatilen Stoffe

7.5.1 Adsorbens und Elution

Als Adsorbens wurden 100 mg SuperQ in Glasfiltern (ARS, Gainesville, Florida, USA) eingesetzt. SuperQ ist ein Polymer aus Divinyl- und Ethylvinylbenzen; die Adsorption beruht hauptsächlich auf der Ausbildung von van-der-Waals-Kräften zwischen Adsorbat und Adsorbens. Kurzkettige Verbindungen wie Ethylen konnten deshalb nicht untersucht werden. Vor den Experimenten wurden die Filter zweimal mit je 1 mL Dichlormethan gereinigt und in Alufolie eingewickelt aufbewahrt. Die Elution der Analyten nach dem Experiment erfolgte mit Dichlormethan, das 10 ng/ μ L Nonylacetat als internen Standard enthielt. Das verwendete Volumen des Elutionsmittels wurde der erwarteten Analytmenge angepasst und betrug 100 oder 200 μ L. Mit dem Eluat wurden qualitative und quantitative Analysen durchgeführt.

7.5.2 GC/MS-Analyse

Die Bestandteile des Eluats wurden mit einem Gaschromatographen Modell HP 6890 von Hewlett Packard getrennt. Als Säulen wurden eine DB-5MS (Wicom GmbH, Heppenheim, Deutschland) und eine Rtx®-200 MS (Restek GmbH, Bad Homburg, Deutschland) von je 30 m Länge, 250 μ m Innendurchmesser und 0,25 μ m Filmdicke eingesetzt. Zur massenspektrometrischen Analyse war der Gaschromatograph an einen Quadrupol massenselektiven Detektor (Hewlett-Packard MSD 5973) gekoppelt. Das Ofenprogramm der verwendeten Methode wurde im Verlaufe dieser Diplomarbeit optimiert. Die Ofenparameter der finalen Methode sind **Tab. 7.1** zu entnehmen. Alle weiteren Betriebsparameter zeigt **Tab. 7.2**.

Tab. 7.1 Ofenparameter der GC/MS-Methode

Temperaturgradient °C/min	Zieltemperatur °C	Temperaturhaltedauer min	Verstrichene Zeit min
	50	3	3
4	95	0	14,25
15	145	0	17,58
10	180	0	21,08
100	300	3	25,28
			Σ 25,28

Tab. 7.2: Geräteparameter der GC/MS-Methode

Parameter	Einstellung
Injektionsvolumen	2µL splitlos
Injektortemperatur	230°C
Trägergas, Fluss	Helium, 1L/min
Transferlinientemperatur	230°C
Temperatur der Ionenquelle	230°C
Quadrupoltemperatur	150°C
Ionisierungsenergie	70 eV
gescannter Massenbereich	40-550 m/z
Solvenzverzögerung	3 min

7.5.3 Substanzidentifizierung

Die Auswertung der Massenspektren erfolgte mit der Software MSD Chemstation Build 75 26-Aug-03 „Enhanced Data analysis“ von Hewlett Packard. Die Substanzen wurden durch Abgleich mit den Spektrendatenbanken „Wiley275“ und „NIST98“ identifiziert. Enantiomere konnten durch das angewendete Analyseverfahren nicht unterschieden werden.

7.5.4 Peakflächenbestimmung

Die Peakflächen wurden softwaregestützt mit „Data analysis“ berechnet. Zur Quantifizierung wurden die Peakflächen des *Total Ion Current* oder ausgewählter Analytfragmente (SIM-Modus, *Selected Ion Monitoring*) bezogen auf den internen Standard verwendet. Bei der Konvertierung der Rohdaten in Tabellenform wurde außerdem das hauseigene Programm „Datatrans“ verwendet.

7.5.5 Berechnung der relativen Emission

Bei der Übersichtsanalyse wurde die relative Emission auf der Basis der TIC-Flächen nach folgender Formel berechnet:

$$rel.Emission = \frac{TIC - Fläche_{Analyt}}{TIC - Fläche_{IS} * Blattrockenmasse[g]}$$

Beim zeitauflösenden Experiment wurde die relative Emission auf der Basis der Flächen analytabhängiger extrahierter Ionenspuren (SIM) anstelle der TIC-Flächen berechnet.

$$rel.Emission = \frac{SIM - Fläche_{Analyt}}{SIM - Fläche_{IS} * Blattrockenmasse[g]}$$

Die Ionenspuren, die bei den jeweiligen Analyten genutzt wurden, sind unter **8.2** aufgeführt.

7.6 Probenahme für die Bestimmung der Blatinhaltsstoffe

Die Blätter wurden unmittelbar nach dem Ende eines Experimentes abgeschnitten und die Mittelrippe mit einem Skalpell entfernt. Das Blattmaterial ohne Mittelrippe wurde in eine 50 mL Sarstedtröhre überführt und gewogen (Frischgewicht). In einigen Fällen wurde zur Probenreduzierung nur das Material auf einer Seite der Mittelrippe als Probe verwendet. Die Sarstedtröhre mit Probe wurde in flüssigen Stickstoff schockgefroren und für 48 h bei -36 °C im Vakuum gefriergetrocknet. Nach dem Wägen der getrockneten Probe (Trockengewicht) wurde das Blattmaterial mit einer Kugelmühle (Paint Shaker, Fluid Managment, Sassenheim, Niederlande) zu Pulver gemahlen und bis zur weiteren Verwendung dunkel und bei -20 °C gelagert.

7.7 Bestimmung der kondensierten Tannine

7.7.1 Grundlagen des angewendeten Analyseverfahrens nach Porter

Das Verfahren nach Porter beruht auf der oxidativen Spaltung des Tanninpolymers unter sauren Bedingungen und anschließender photometrischer Bestimmung der monomeren Anthocyanidin-Kationen (**Abb. 7.2**).

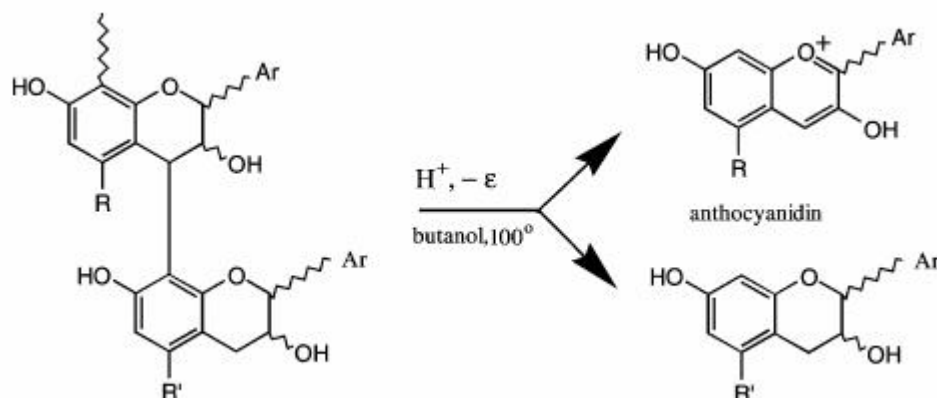


Abb. 7.2 Ablauf der oxidativ-sauren Spaltung kondensierter Tannine (aus Schofield *et al.* 2001).

Zur Spaltung wird die Probe mit einer Butanol-Salzsäure-Lösung, die katalytische Mengen Eisen(III)-enthält, auf 95°C erhitzt. Aus diesem Grund ist das Verfahren auch als BuOH/HCl-Assay bekannt. Problematisch ist, dass sich die Extinktionskoeffizienten der Anthocyanidin-Kationen in Abhängigkeit von den Resten unterscheiden (Porter *et al.* 1986; Schofield *et al.* 2001). Diese Reste können zwischen Pflanzenarten variieren (Ayres *et al.* 1997). Quantitative Analysen sind daher nur möglich, wenn zuvor aus der betreffenden Pflanze eine Standardsubstanz isoliert wurde. Eine solche Reinsubstanz stand für beide untersuchten Pappelarten nicht zur Verfügung. Deshalb wurde in dieser Diplomarbeit das Analyseverfahren in abgeänderter Form zur relativen KT-Bestimmung in Pappelblättern eingesetzt.

7.7.2 Probenpräparation der kondensierten Tannine

Kondensierte Tannine wurden mit einer modifizierten Form der Methode nach Porter (Porter *et al.* 1986) analysiert. In einer 15 mL Sarstedtröhre (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) wurden 4-6 mg des Blattpulver mit 5 mL des

Aufschlussreagenz vermischt und die Suspension nach kräftigem Schütteln für 40 min auf 95°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch zentrifugiert und der Überstand spektrophotometrisch untersucht. Dieselbe Prozedur wurde mit neuem Blattpulver für die Blindwertmessung wiederholt, wobei aber das Blindwertreagenz statt des Aufschlussreagenz zugegeben wurde.

Aufschlussreagenz: 0,278 g $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
 27 mL 37%ige HCl
 13 mL H_2O
 460 mL Butanol

Blindwertreagenz: 40 mL H_2O
 460 mL Butanol

7.7.3 UV/VIS-Messung und Berechnung des relativen Gehaltes

Die Messung erfolgte in 1,5 mL halbmikro Einmalküvetten aus Polymethylmethacrylat (Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland) bei 1 cm Weglänge und einer Wellenlänge von 550 nm. Bei $A_{550} > 1$ wurde die Probe mit dem Aufschlussreagenz verdünnt. Als Spektrometer wurde ein Spectronic® 20 Genesys™ (Spectronic Instruments, Garforth, UK) genutzt. Der relative Gehalt der KT wurde nach folgender Formel berechnet.

$$\text{rel.Gehalt} = \frac{A_{550}(\text{Probe})}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} [\text{mg}]} - \frac{A_{550}(\text{Blindwert})}{\text{Einwaage}_{\text{Blindwert}} [\text{mg}]}$$

7.8 Bestimmung der phenolischen Glykoside

7.8.1 Probenpräparation der phenolischen Glykoside

4-6 mg des Blattpulver wurden in einen 1,5 mL Eppendorftube eingewogen und 500 μ L Methanol zugegeben. Das Methanol enthielt 50 μ L/L 1,3-Dimethoxybenzen als internen Standard und wurde bei 4°C gelagert. Die Suspension wurde 5 min bei 200 rpm geschüttelt, anschließend 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Der feste Rückstand wurde zwei weitere male in derselben Weise behandelt. Die vereinigten Extrakte wurden nochmals zentrifugiert und zur Lagerung in ein 1,5 mL Glasgefäß überführt und bei -20°C aufbewahrt. Die Analyse erfolgte flüssigkeitschromatographisch.

Bei allen Schritten wurde auf möglichst wasserfreies Arbeiten geachtet. Tiefgekühlte Extrakte oder Lösungsmittel wurden erst nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur geöffnet.

7.8.2 HPLC/DAD-Methode zur Quantifizierung der Phenolischen Glykoside

Die Chromatogramme wurden mit einem Agilent 1100 (Agilent Technologies GmbH, Böblingen, Deutschland) HPLC/DAD-Gerät aufgenommen. Dabei wurde eine Gradientenelution angewendet, deren Parameter in **Tab. 7.3** wiedergegeben sind. Unmittelbar vor der Injektion auf die Säule wurde der Probe durch ein automatisches Mischprogramm Wasser zugesetzt. Von dem Gemisch aus Wasser und Probe wurden 15 μ L injiziert. Als Säule kam eine NUCLEODUR[®] Sphinx RP 250 mm x 4,6 mm x 5 μ m (Macherey – Nagel GmbH und Co. KG, Deutschland) mit einer SecurityGuard C18 4 x 3,0 mm Vorsäule (Phenomex, Torrance, USA) zum Einsatz. Zur Quantifizierung der PG wurden die Peakflächen der UV-Spur bei 200 nm verwendet.

Tab. 7.3: Gradient der mobilen Phase. Der Fluss betrug 1mL/min

Zeit min	% Solvenz A 0.2% (v:v) Ameisensäure	% Solvenz B Acetonitril
0.0	14	86
22.0	58	42
22.1	100	0
25.0	100	0
25.1	14	86
30.0	14	86

7.8.3 Peakflächenbestimmung und Berechnung des relativen Gehaltes

Die Peakflächen wurden mit Hilfe der Software „HP Chemstation for LC“ (Rev. A.06.01 [406]) berechnet. Allerdings konnte die vollautomatische Integration nicht genutzt werden, da die Basislinienerkennung als zu schlecht befunden wurde. Deshalb wurde für jeden Messtag eine Integrationsmethode erstellt, bei der Integrationsgrenzen und Basislinie visuell festgelegt und dem Programm vorgegeben wurden. Bei der Transformation der Rohdaten in Tabellenform wurde das hauseigene Programm „Datatrans“ verwendet. Der relative Gehalt wurde nach folgender Formel berechnet:

$$rel.Gehalt = \frac{Fläche(Analyt)_{200nm}}{Fläche(IS)_{200nm} * Einwaage[mg]}$$

7.8.4 HPLC/MS-Methode zur Substanzidentifikation

Die Methode war identisch zur HPLC/DAD-Methode, nur dass hier im Anschluss an die chromatographische Trennung zusätzlich zum Diodenarray-Detektor ein Esquire 6000 ESI-Ion-Trap Massenspektrometer (Bruker Daltonics GmbH, Deutschland) eingesetzt wurde. Die Analyten wurden sowohl im positiven als auch im negativen Modus gemessen. Die verwendeten Parameter der Ionenfalle zeigt **Tab. 7.4**.

Tab. 7.4: Methodenparameter der Ionenfalle

Parameter	Wert (pos. Modus)	Wert (neg. Modus)
Skimmer Voltage	-60 V	60 V
Capillary Exit Voltage	113.5 V	-121 V
Capillary Voltage	-4000 V	4000 V
nebulizer pressure	35 psi	35 psi
drying gas	11 L/min	11 L/min
Dry Temp	330 °C	330 °C

7.9 Datenauswertung

Zur statistischen Datenauswertung wurde Excel[®] 2003 (Microsoft, USA) und Sigmaplot 2.03 (Aspire Software Int., USA) genutzt. Kalibrierungen wurden mit dem Excelmakro DIN-Test 2003 durchgeführt. Zur Datendarstellung dienten Excel[®] 2003 und Sigmaplot2001 for Windows 7.0 (Aspire Software Int., USA).

8 Anhang

8.1 Rel. Emission der VOC von *P. nigra* im zeitauflösenden Experiment als Funktion der Zeit

Jeder Datenpunkt wird in den Grafiken in der zeitlichen Mitte der 6 h dauernden Messungen gezeigt. So ist der erste Datenpunkt bei 3 h das Ergebnis der VOC-Probenahme zwischen 0-6 h. Fehlerbalken zeigen SE. Die Sterne an Zeitachse zeigen die Dauer des Raupenbefalles an. Strukturformeln sind neben den Graphen gezeigt.

GLV

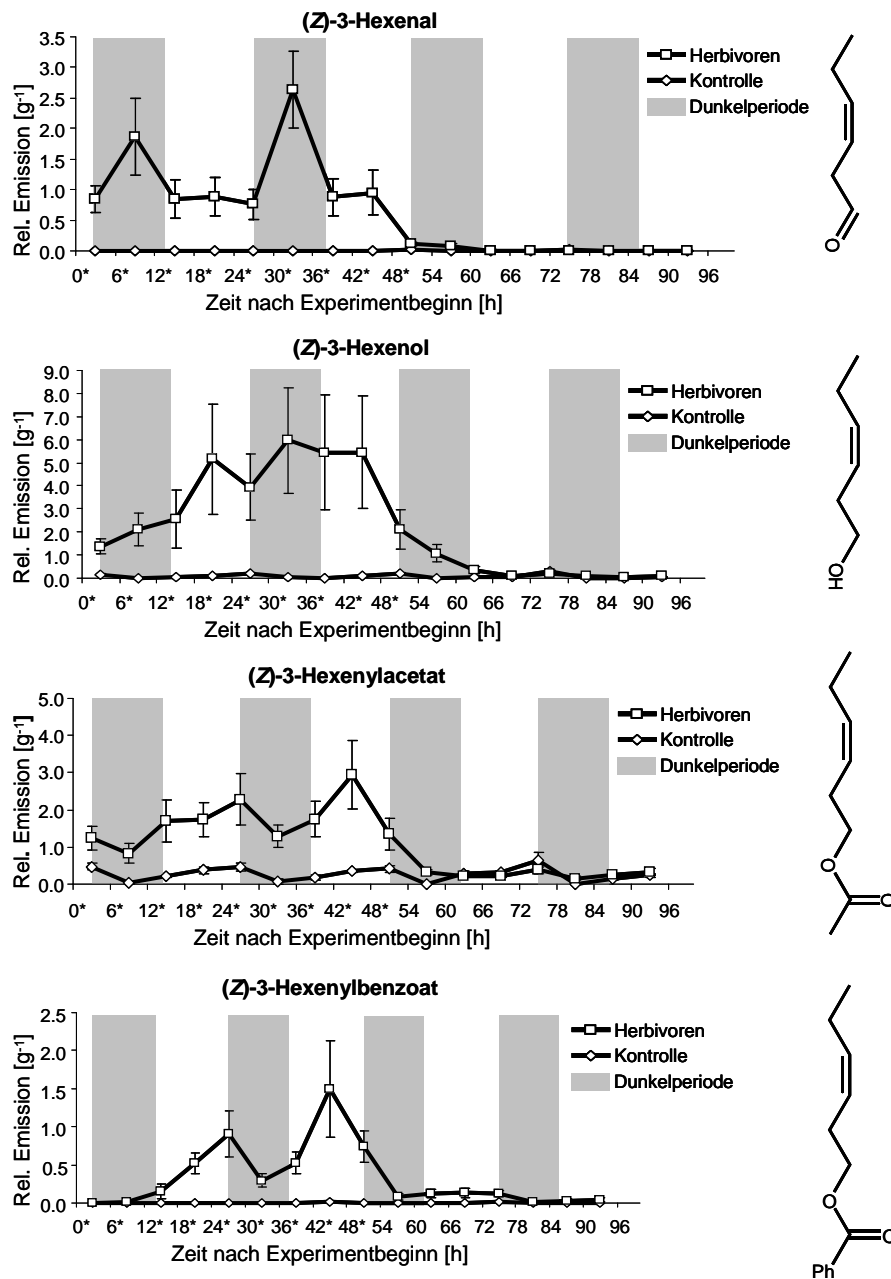


Abb. 8.1 Zeitverlauf der Emission der GLV im zeitauflösenden Experiment.

Monoterpenoide

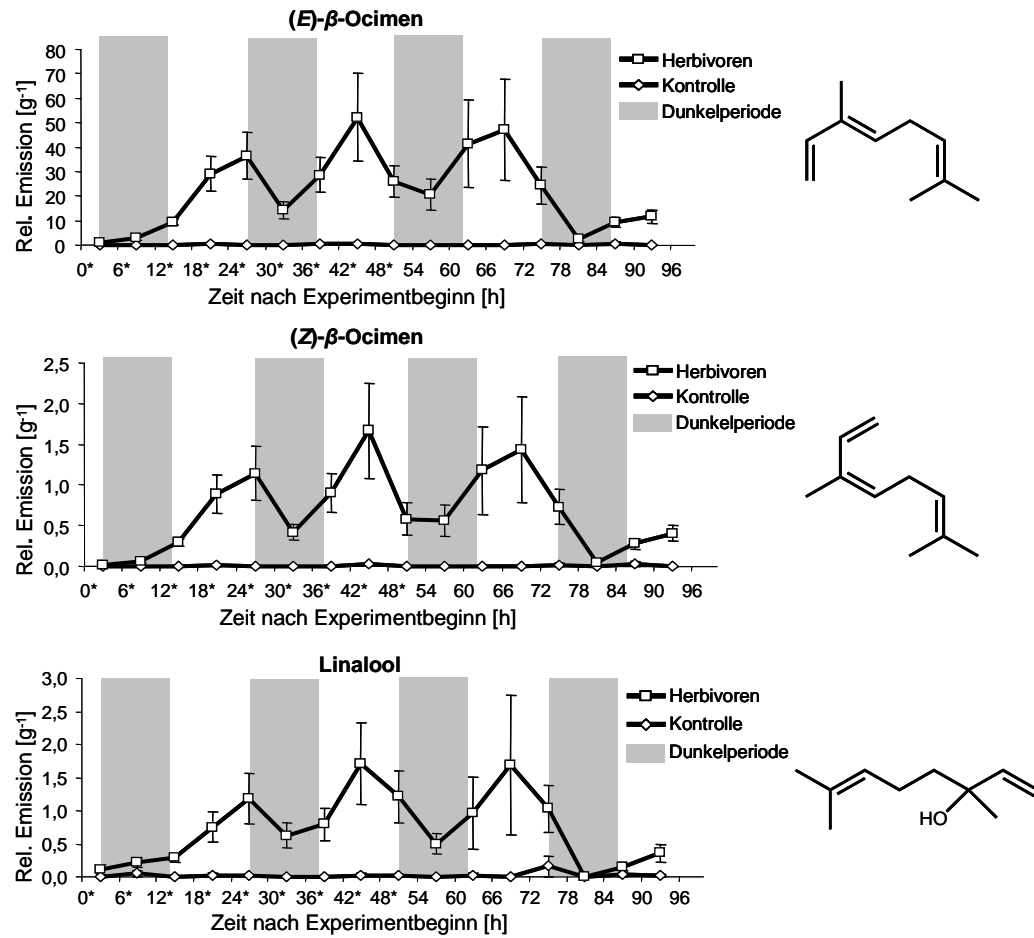


Abb. 8.2 Zeitverlauf der Emission der Monoterpenoide mit Emissionsmuster 1 im zeitauflösenden Experiment

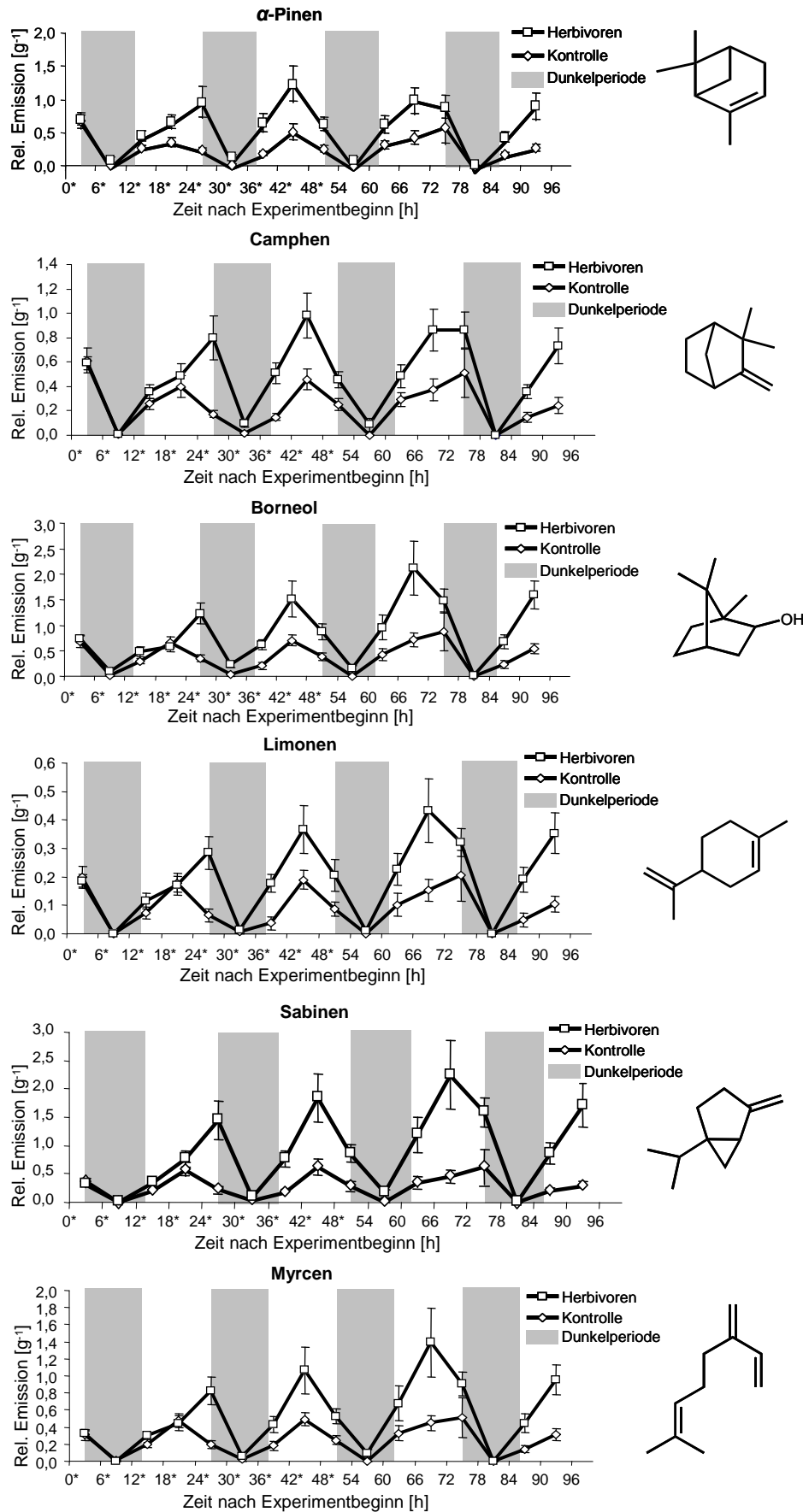


Abb. 8.3 Zeitverlauf der Emission der Monoterpenoide mit Emissionsmuster 2 im zeitauflösenden Experiment.

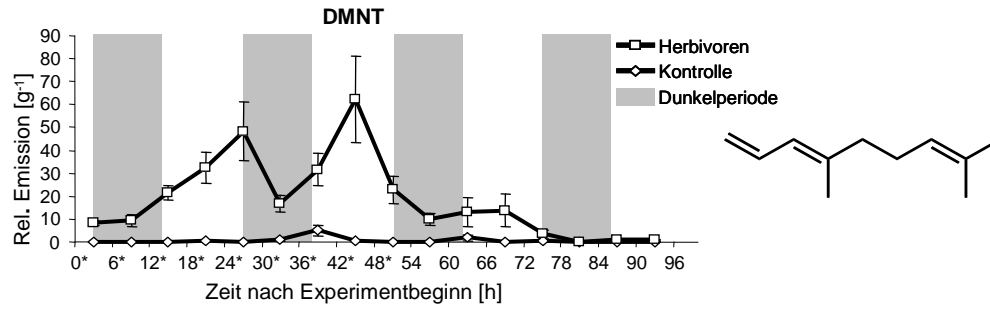
DMNT

Abb. 8.4 Zeitverlauf der Emission von DMNT im zeitauflösenden Experiment.

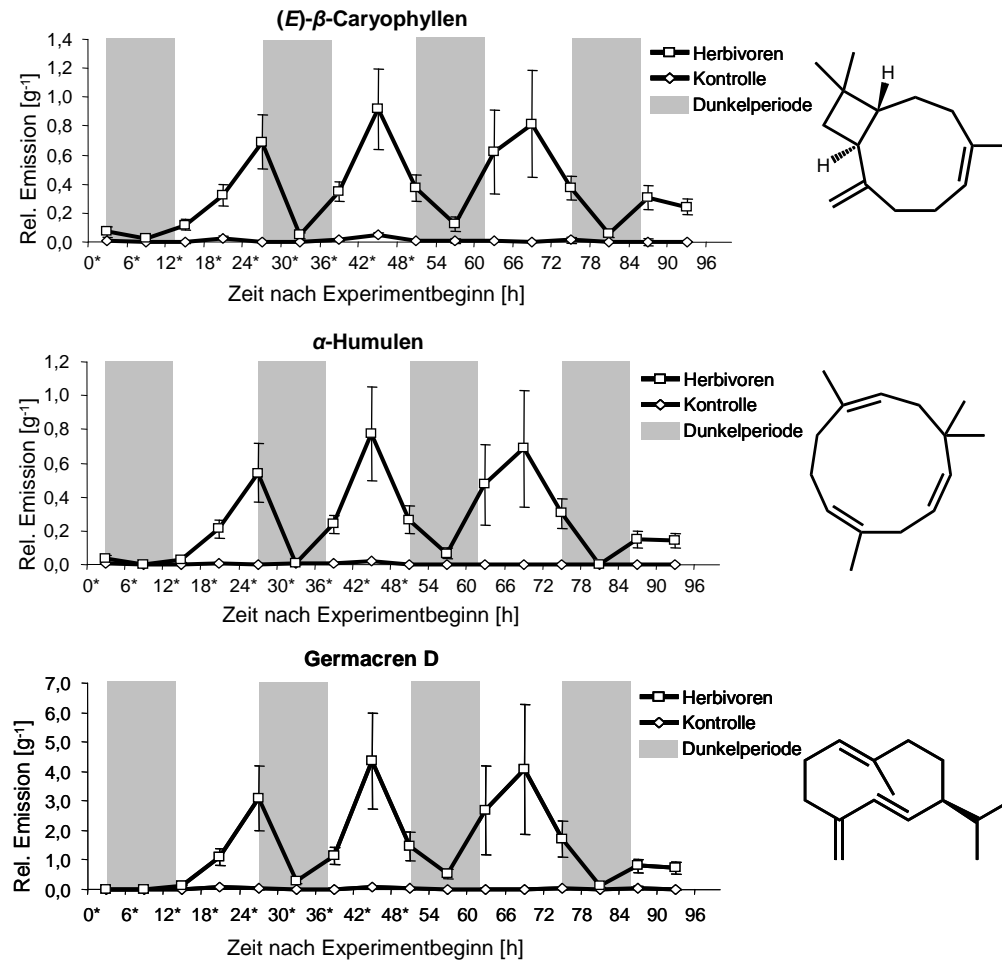
Sesquiterpenoide

Abb. 8.5 Zeitverlauf der Emission der Sesquiterpenoide mit Emissionsmuster 1 im zeitauflösenden Experiment.

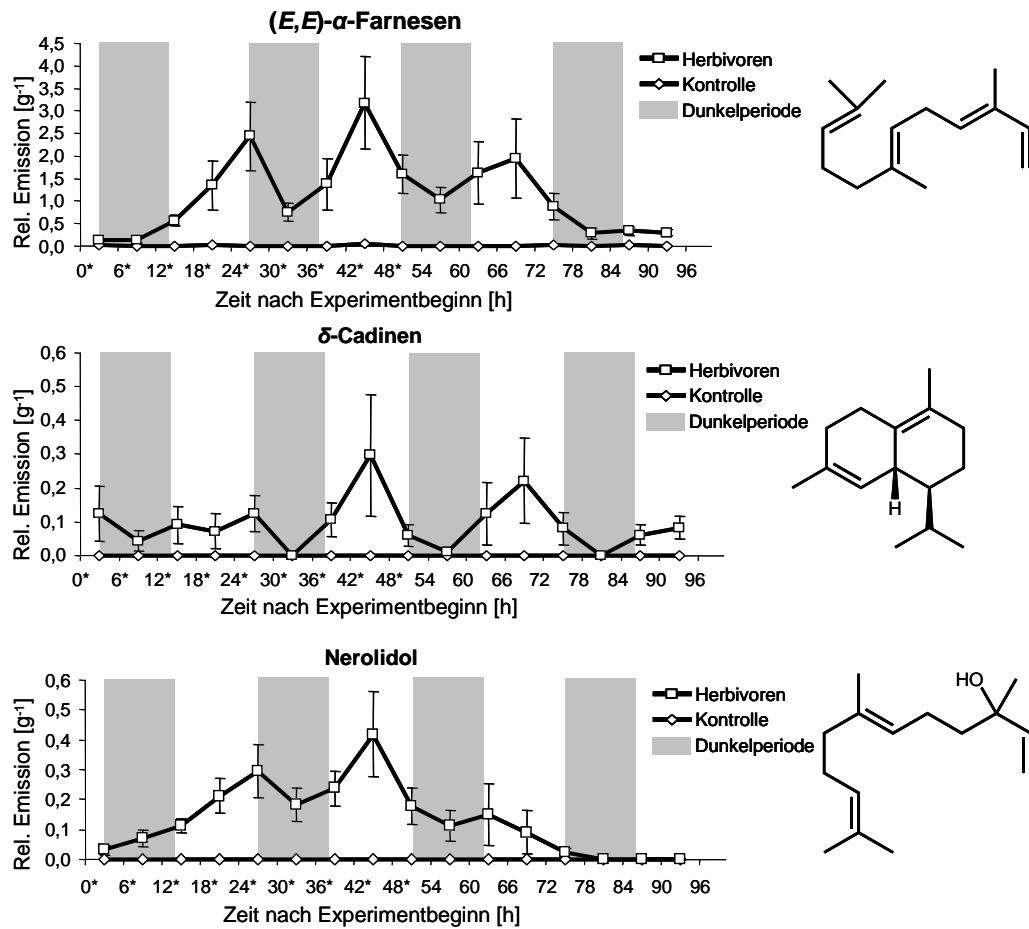


Abb. 8.6 Zeitverlauf der Emission der Sesquiterpenoide mit eigenem Emissionsmuster im zeitauflösenden Experiment.

Andere

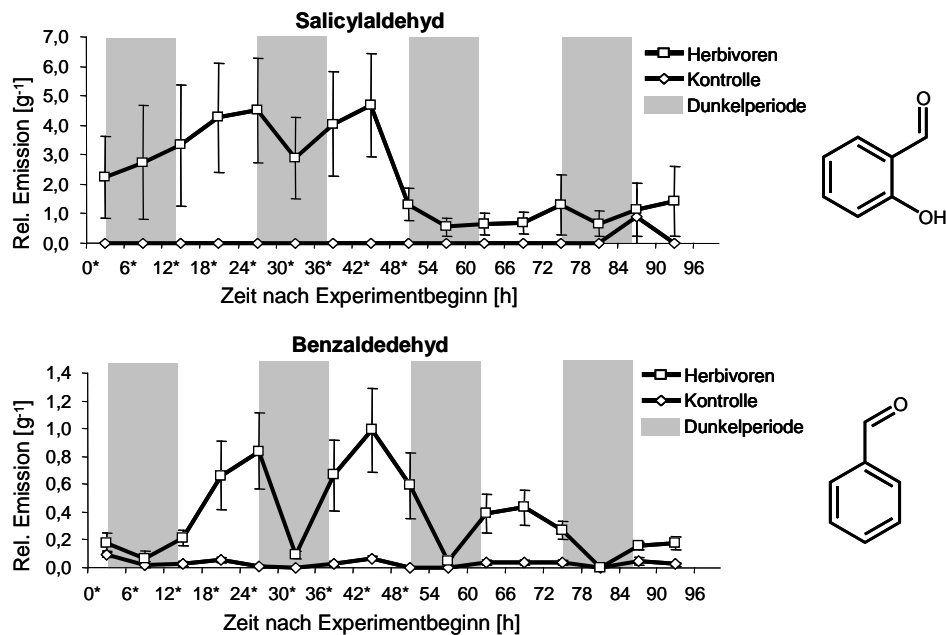


Abb. 8.7 Zeitverlauf der Emission der der nicht klassifizierten Substanzen zeitauflösenden Experiment.

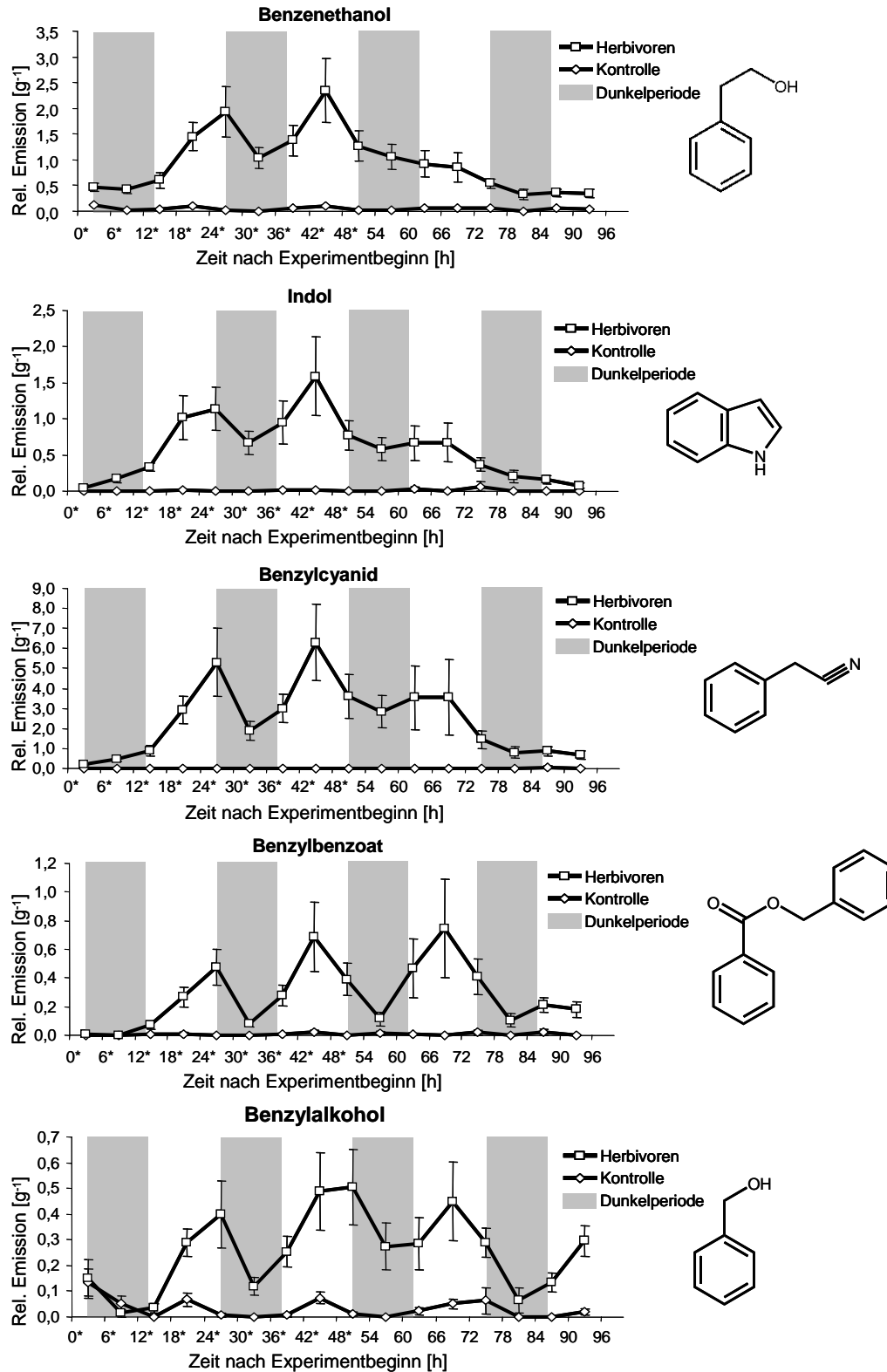


Abb. 8.8 Zeitverlauf der Emission der nicht klassifizierten Substanzen zeitauflösenden Experiment (Fortsetzung).

8.2 Tabelle der verwendeten Ionenspuren zur Berechnung der relativen Emission im zeitauflösenden Experiment

<i>GLV</i>	<i>m/z</i>	<i>Monoterpene</i>	<i>m/z</i>	<i>Homoterpene</i>	<i>m/z</i>
(Z)-3-Hexenal	69	α -Pinen	93	DMNT	69
(Z)-3-Hexenol	67	Camphen	121		
(Z)-3-Hexenylacetat	82	Sabinen	93		
(Z)-3-Henexylbenzoat	105	Myrcen	93		
		Limonen	68		
		(Z)- β -Ocimen	93		
		(E)- β -Ocimen	93		
		Linalool	71		
		Borneol	95		
<i>Sesquiterpene</i>	<i>m/z</i>	<i>Andere</i>	<i>m/z</i>		
(E)- β -Caryophyllen	93	Benzylalkohol	107		
α -Humulen	93	Salicylaldehyd	122		
Germacren D	161	Benzenethanol	92		
(E,E)- α -Farnesen	93	Benzylcyanid	117		
δ -Cadinen	134	Indol	117		
Nerolidol	93	Benzylbenzoat	105		
		Benzaldehyd	106		

9 Literatur

- Archbold D.D. & Hamilton-Kemp T.R. (2000) Surface disinfection of berry crops with the natural volatile (E)-2-hexenal. *International Multidisciplinary Conference on Integrated View of Fruit & Vegetable Quality*, 268-272
- Arimura G., Huber D.P.W. & Bohlmann J. (2004) Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (-)-germacrene D synthase, PtdTPS1. *Plant Journal*, 37, 603-616
- Arimura G.I., Kopke S., Kunert M., Volpe V., David A., Brand P., Dabrowska P., Maffei M.E. & Boland W. (2008) Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves: IV. Diurnal and nocturnal damage differentially initiate plant volatile emission. *Plant Physiology*, 146, 965-973
- Arnold T.M. & Schultz J.C. (2002) Induced sink strength as a prerequisite for induced tannin biosynthesis in developing leaves of *Populus*. *Oecologia*, 130, 585-593
- Ayres M.P., Clausen T.P., MacLean S.F., Redman A.M. & Reichardt P.B. (1997) Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology*, 78, 1696-1712
- Barbehenn R.V., Jones C.P., Yip L., Tran L. & Constabel C.P. (2007) Limited impact of elevated levels of polyphenol oxidase on tree-feeding caterpillars: assessing individual plant defenses with transgenic poplar. *Oecologia*, 154, 129-140
- Bingaman B.R. & Hart E.R. (1993) Clonal and Leaf Age Variation in *Populus* Phenolic Glycosides, Implications for Host Selection by *Chrysomela-Scripta* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 22, 397-403
- Bohlmann J., Meyer-Gauen G. & Croteau R. (1998) Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 4126-4133
- Chen M.S. (2008) Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science*, 15, 101-114
- Clausen T.P., Reichardt P.B., Bryant J.P., Werner R.A., Post K. & Frisby K. (1989) Chemical-Model for Short-Term Induction in Quaking Aspen (*Populus-Tremuloides*) Foliage against Herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 15, 2335-2346
- Constabel (2005) molecular biology and biochemistry of induced insect defence in *Populus*. In: *recent advances in phytochemistry* (ed. Romeo), pp. 120-143. Elsevier
- Constabel C.P., Yip L., Patton J.J. & Christopher M.E. (2000) Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology*, 124, 285-295
- Coyle, Nebeker, Hart & Mattson (2005) Biology and Management of insect pests in North American intensively managed hardwood forest systems. *Ann. Rev. Entomol.*, 1-29

- D'Auria J.C., Pichersky E., Schaub A., Hansel A. & Gershenzon J. (2007) Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 49, 194-207
- Davis J.M., Gordon M.P. & Smit B.A. (1991) Assimilate Movement Dictates Remote Sites of Wound-Induced Gene-Expression in Poplar Leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 2393-2396
- de Groot P., Grant G.G., Poland T.M., Scharbach R., Buchan L., Nott R.W., Macdonald L. & Pitt D. (2008) Electrophysiological response and attraction of emerald ash borer to green leaf volatiles (GLVs) emitted by host foliage. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 1170-1179
- Degenhardt J. & Gershenzon J. (2000) Demonstration and characterization of (E)-nerolidol synthase from maize: a herbivore-inducible terpene synthase participating in (3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene biosynthesis. *Planta*, 210, 815-822
- DeLoach B.L. (2008) Aphid-induced changes in plant quality protect cotton from more damaging herbivores. In: *93rd ESA Annual Meeting*, Milwaukee
- Dethier V.G., Browne L.B. & Smith C.N. (1960) The Designation of Chemicals in Terms of the Responses They Elicit from Insects. *Journal of Economic Entomology*, 53, 134-136
- Donaldson J.R., Stevens M.T., Barnhill H.R. & Lindroth R.L. (2006) Age-related shifts in leaf chemistry of clonal aspen (*Populus tremuloides*). *Journal of Chemical Ecology*, 32, 1415-1429
- Ebert (1994) *Nachtfalter II*. In: *Die Schmetterlinge Baden-Württembergs*, pp. 452-461. Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart
- Eckenwalder (1996) Systematics and evolution of *Populus*. in *NRC Research press, Ottawa. 2001*, 331-382
- Emani C., Garcia J.M., Lopata-Finch E., Pozo M.J., Uribe P., Kim D.J., Sunilkumar G., Cook D.R., Kenerley C.M. & Rathore K.S. (2003) Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. *Plant Biotechnology Journal*, 1, 321-336
- Fajvan M.A., Rentch J. & Gottschalk K. (2008) The effects of thinning and gypsy moth defoliation on wood volume growth in oaks. *Trees-Structure and Function*, 22, 257-268
- Fatouros N.E., Broekgaarden C., Bukovinszky Kiss G., van Loon J.J.A., Mumm R., Huigens M.E., Dicke M. & Hilker M. (2008) Male-derived butterfly anti-aphrodisiac mediates induced indirect plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 10033-10038
- Fatouros N.E., Huigens M.E., van Loon J.J.A., Dicke M. & Hilker M. (2005) Chemical communication - Butterfly anti-aphrodisiac lures parasitic wasps. *Nature*, 433, 704-704
- Fields M.J. & Orians C.M. (2006) Specificity of phenolic glycoside induction in willow seedlings (*Salix sericea*) in response to herbivory. *Journal of Chemical Ecology*, 32, 2647-2656

- Frost C.J., Appel M., Carlson J.E., De Moraes C.M., Mescher M.C. & Schultz J.C. (2007) Within-plant signalling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signalling and primes responses against herbivores. *Ecology Letters*, 10, 490-498
- Frost C.J., Mescher M.C., Dervinis C., Davis J.M., Carlson J.E. & De Moraes C.M. (2008) Priming defense genes and metabolites in hybrid poplar by the green leaf volatile cis-3-hexenyl acetate. *New Phytologist*, 180, 722-733
- Hagermann E., Zhao Y. & Johnson S. (1997) Methods of Determination of Condensed and Hydrolyzable Tannins. In: *Antinutrients and Phytochemical in Food* (ed. Shahadi F), pp. 209-222. American Chemical Society, Washington DC
- Hamilton-Kemp T.R., Archbold D.D., Langlois B.E. & Collins R.W. (1998) Antifungal activity of E-2-hexenal on strawberries and grapes. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 216, 033-AGFD
- Havill N.P. & Raffa K.F. (2000) Compound effects of induced plant responses on insect herbivores and parasitoids: implications for tritrophic interactions. *Ecological Entomology*, 25, 171-179
- Heil M. (2004a) Direct defense or ecological costs: Responses of herbivorous beetles to volatiles released by wild lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Journal of Chemical Ecology*, 30, 1289-1295
- Heil M. (2004b) Induction of two indirect defences benefits Lima bean (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae) in nature. *Journal of Ecology*, 92, 527-536
- Heil M. (2008) Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*, 178, 41-61
- 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 of the United States of America*, 104, 5467-5472
- Holopainen J.K. (2004) Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in Plant Science*, 9, 529-533
- Hwang S.Y. & Lindroth R.L. (1997) Clonal variation in foliar chemistry of aspen: Effects on gypsy moths and forest tent caterpillars. *Oecologia*, 111, 99-108
- Ishiwari H., Suzuki T. & Maeda T. (2007) Essential compounds in herbivore-induced plant volatiles that attract the predatory mite *Neoseiulus womersleyi*. *Journal of Chemical Ecology*, 33, 1670-1681
- Julkunen-Tiitto R. & Sorsa S. (2001) Testing the effects of drying methods on willow flavonoids, tannins, and salicylates. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 779-789
- Julkunen-Tiitto R. (1986) A Chemotaxonomic Survey of Phenolics in Leaves of Northern Salicaceae Species. *Phytochemistry*, 25, 663-667
- Julkunen-Tiitto R. (1989) Phenolic Constituents of *Salix* - a Chemotaxonomic Survey of Further Finnish Species. *Phytochemistry*, 28, 2115-2125
- Kessler A. & Baldwin I.T. (2001) Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291, 2141-2144
- Kessler A., Halitschke R. & Baldwin I.T. (2004) Silencing the jasmonate cascade: Induced plant defenses and insect populations. *Science*, 305, 665-668

- Köllner T.G. (2004) Molekulare und genetische Aspekte der Biosynthese von komplexen Sesquiterpengemischen in Mais. In: *Biologisch-Pharmazeutische Fakultät*. Friedrich Schiller Universität, Jena
- Köllner T.G., Held M., Lenk C., Hiltbold I., Turlings T.C.J., Gershenzon J. & Degenhardt J. (2008) A maize (E)-beta-caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. *Plant Cell*, 20, 482-494
- Kost C. & Heil M. (2005) Increased availability of extrafloral nectar reduces herbivory in Lima bean plants (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae). *Basic and Applied Ecology*, 6, 237-248
- Larson P.R. (1977) Phyllotactic Transitions in Vascular System of *Populus-Deltoides* Bartr as Determined by C-14 Labeling. *Planta*, 134, 241-249
- Li W.Z., Yuan G.H., Sheng C.F. & Guo X.R. (2005) Active compounds in *Populus nigra* L. wilted leaves responsible for attracting *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lep., Noctuidae) and new agarose formulation. *Journal of Applied Entomology*, 129, 557-562
- Lindroth R.L., Hsia M.T.S. & Scriber J.M. (1987) Seasonal Patterns in the Phytochemistry of 3 *Populus* Species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 15, 681-686
- Lindroth R.L. & Hwang S.Y. (1996) Clonal variation in foliar chemistry of quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx). *Biochemical Systematics and Ecology*, 24, 357-364
- Martin D.M., Gershenzon J. & Bohlmann J. (2003) Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. *Plant Physiology*, 132, 1586-1599
- McGarvey D.J. & Croteau R. (1995) Terpenoid Metabolism. *Plant Cell*, 7, 1015-1026
- Muller C. & Hilker M. (2000) The effect of a green leaf volatile on host plant finding by larvae of a herbivorous insect. *Naturwissenschaften*, 87, 216-219
- Onufrieva K.S., Brewster C.C., Thorpe K.W., Sharov A.A., Leonard D.S., Reardon R.C., Mastro V.C., Sellers P. & Roberts E.A. (2008) Effects of the 3M (TM) MEC Sprayable Pheromone (R) formulation on gypsy moth mating success. *Journal of Applied Entomology*, 132, 461-468
- Osier T.L., Hwang S.Y. & Lindroth R.L. (2000a) Effects of phytochemical variation in quaking aspen *Populus tremuloides* clones on gypsy moth *Lymantria dispar* performance in the field and laboratory. *Ecological Entomology*, 25, 197-207
- Osier T.L., Hwang S.Y. & Lindroth R.L. (2000b) Within- and between-year variation in early season phytochemistry of quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx.) clones. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 197-208
- Osier T.L. & Lindroth R.L. (2004) Long-term effects of defoliation on quaking aspen in relation to genotype and nutrient availability: plant growth, phytochemistry and insect performance. *Oecologia*, 139, 55-65
- Peters D.J. & Constabel C.P. (2002) Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant Journal*, 32, 701-712

- Philippe R.N. & Bohlmann J. (2007) Poplar defense against insect herbivores. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 85, 1111-1126
- Porter L.J., Hrstich L.N. & Chan B.G. (1986) The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidin. *Phytochemistry*, 25, 223-230
- Sato K., Krist S. & Buchbauer G. (2007) Antimicrobial effect of vapours of geraniol, (R)-(-)-linalool, terpineol, gamma-terpinene and 1,8-cineole on airborne microbes using an airwasher. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 435-437
- Schofield P., Mbugua D.M. & Pell A.N. (2001) Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 21-40
- Schoonhoven L. (2006) *Insect-Plant biology*. 2 edn. Oxford University Press, USA, Oxford, New York.
- Smulders M.J.M., Beringen R., Volosyanchuk R., Broeck A.V., van der Schoot J., Arens P. & Vosman B. (2008) Natural hybridisation between *Populus nigra* L. and *P. x canadensis* Moench. Hybrid offspring competes for niches along the Rhine river in the Netherlands. *Tree Genetics & Genomes*, 4, 663-675
- Stevens M.T. & Lindroth R.L. (2005) Induced resistance in the indeterminate growth of aspen (*Populus tremuloides*). *Oecologia*, 145, 298-306
- Stewart-Jones A. & Poppy G.M. (2006) Comparison of glass vessels and plastic bags for enclosing living plant parts for headspace analysis. *Journal of Chemical Ecology*, 32, 845-864
- Takabayashi J. & Dicke M. (1996) Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trends in Plant Science*, 1, 109-113
- Tholl D., Boland W., Hansel A., Loreto F., Rose U.S.R. & Schnitzler J.P. (2006) Practical approaches to plant volatile analysis. *Plant Journal*, 45, 540-560
- Tollsten L. & Muller P.M. (1996) Volatile organic compounds emitted from beech leaves. *Phytochemistry*, 43, 759-762
- Tsai C.J., Harding S.A., Tschaplinski T.J., Lindroth R.L. & Yuan Y.N. (2006) Genome-wide analysis of the structural genes regulating defense phenylpropanoid metabolism in *Populus*. *New Phytologist*, 172, 47-62
- Turlings T.C.J., Tumilson J.H. & Lewis W.J. (1990) Exploitation of Herbivore-Induced Plant Odors by Host-Seeking Parasitic Wasps. *Science*, 250, 1251-1253
- Tuskan G.A., DiFazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A., Schein J., Sterck L., Aerts A., Bhalerao R.R., Bhalerao R.P., Blaudez D., Boerjan W., Brun A., Brunner A., Busov V., Campbell M., Carlson J., Chalot M., Chapman J., Chen G.L., Cooper D., Coutinho P.M., Couturier J., Covert S., Cronk Q., Cunningham R., Davis J., Degroeve S., Dejardin A., Depamphilis C., Detter J., Dirks B., Dubchak I., Duplessis S., Ehling J., Ellis B., Gendler K., Goodstein D., Gribskov M., Grimwood J., Groover A., Gunter L., Hamberger B., Heinze B., Helariutta Y., Henrissat B., Holligan D., Holt R., Huang W., Islam-Faridi N., Jones S., Jones-Rhoades M., Jorgensen R., Joshi C., Kangasjarvi J., Karlsson J., Kelleher C., Kirkpatrick R., Kirst M., Kohler A., Kalluri U., Larimer F., Leebens-Mack J., Leple J.C., Locascio P., Lou Y., Lucas S., Martin F., Montanini B., Napoli C., Nelson D.R., Nelson C., Nieminen K., Nilsson O., Pereda V., Peter G., Philippe R., Pilate G., Poliakov A., Razumovskaya J., Richardson P., Rinaldi C., Ritland

- K., Rouze P., Ryaboy D., Schmutz J., Schrader J., Segerman B., Shin H., Siddiqui A., Sterky F., Terry A., Tsai C.J., Uberbacher E., Unneberg P., Vahala J., Wall K., Wessler S., Yang G., Yin T., Douglas C., Marra M., Sandberg G., Van de Peer Y. & Rokhsar D. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313, 1596-1604
- Wang J.H. & Constabel C.P. (2004) Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta*, 220, 87-96
- Waterman & Mole (1994) *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. 1994 edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Whittle A., Lenhart S. & White K.A.J. (2008) Optimal control of gypsy moth populations. *Bulletin of Mathematical Biology*, 70, 398-411