

1 Einleitung

1.1 Interaktionen eines Organismus mit seiner Umwelt: Chemische Ökologie

Ein charakteristisches Merkmal aller lebenden Organismen ist die Fähigkeit zum Informationsaustausch mit ihrer Umwelt. Die von einem Organismus ausgesendeten oder empfangenen Nachrichten dienen der Erhaltung der eigenen Art. Sie helfen, Nahrungsquellen zu erschließen, einen fortpflanzungsfähigen Partner zu finden oder Gefahren abzuwehren. Neben den teilweise bereits gut verstandenen Energieflüssen und Stoffkreisläufen existiert im Netzwerk eines ökologischen Systems daher immer auch ein kontinuierlicher Transfer von Signalen. Neben audiovisuellen oder mechanisch gestützten Kommunikationsvorgängen kommt den chemischen Signalen in der Natur eine besondere Bedeutung zu. Evolutiv gesehen stellt die Übertragung chemisch kodierter Information in Form von Molekülen die ursprüngliche Art der Signalweitergabe dar.^[1] Die Entschlüsselung dieser „chemischen Sprachen“, die dem Kommunikationsnetzwerk in einem Ökosystem als Grundlage dient, ist die Aufgabe der Chemischen Ökologie.^[2] Forschung in diesem interdisziplinären Feld beinhaltet die Synthese und Identifizierung von Infochemikalien, die Aufklärung der beteiligten Rezeptorstrukturen und des zugrundeliegenden endogenen Signaltransduktionsweges sowie die Evaluierung der ökologischen Konsequenzen des betrachteten Informationsaustauschs.

Die chemische Struktur von Signalmolekülen reicht von einfachen Kohlenwasserstoffen bis hin zu hochkomplexen Terpenoid-, Alkaloid- oder Polyketidkomponenten.^[3] Auch höhermolekulare Peptide sind als Informationsträger bekannt.^[4] Die physikalischen Eigenschaften dieser Moleküle haben sich im Verlauf der Evolution ihrer Funktion und Art der Signalübertragung angepasst. Für eine erfolgreiche Informationsübermittlung in aquatischen Systemen ist z.B. eine ausreichende Wasserlöslichkeit und Hydrolysebeständigkeit erforderlich. Andere Ökosysteme stellen besondere Anforderungen an Flüchtigkeit oder Persistenz der Verbindungen. Die als Spurfolge- und Alarmpheromone von Ameisen eingesetzten einfachen Kohlenwasserstoffe (z.B. Undecan, Tridecan)^[5, 6] erfüllen durch ihre hohe Stabilität (= hohe Persistenz) und

geringe Flüchtigkeit die geforderten Eigenschaften auf elegante Weise. Wegen der im allgemeinen erforderlichen Spezifität einer Informationsübermittlung ist das Auftreten eines bestimmten Signalmoleküls häufig auf nur wenige Arten beschränkt. Daher sind die informationstragenden Verbindungen in fast allen Fällen Produkte des Sekundärstoffwechsels eines betrachteten Organismus. Im Gegensatz zu den nur wenige Hundert Verbindungen umfassenden primären Naturstoffen, die praktisch ubiquitär auftreten, stellt das Profil aus vielen Tausend Sekundärmetaboliten einen Fingerabdruck der betrachteten Spezies dar. Damit potenziert sich der mögliche Informationsgehalt von Sekundärmetaboliten gegenüber primären Naturstoffen um mehrere Größenordnungen. Im Gegensatz zu Pflanzen werden benötigte Sekundärstoffe bei Tieren häufig nicht selbst biosynthetisiert, sondern mit der Nahrung aufgenommen, transformiert und gespeichert. So sequestrieren viele herbivore Insekten die von ihrer Wirtspflanze produzierten Toxine (z.B. Cardenolide^[7]) und verwenden sie als Wehrchemikalien gegen Vögel und andere Fraßfeinde.

Die artenreiche Welt der höheren Pflanzen beinhaltet einen riesigen Pool an Sekundärstoffen. Da Pflanzen praktisch keine organischen Verbindungen aufnehmen, sind sie auch in ihrem Sekundärmetabolismus weitestgehend autotroph. Neben regulativen Aufgaben im Primärstoffwechsel des Produzenten haben viele pflanzliche Sekundärstoffe eine Bedeutung als Signalträger. Dabei sind sowohl Funktionen zur Inter- und Intraspezieskommunikation als auch zur Vermittlung der Abwehr gegen Schadorganismen von großer ökologischer Relevanz. Diese Verbindungen stellen daher einen Schwerpunkt chemisch ökologischer Forschung dar. Ein besseres Verständnis ihrer Funktion kann signifikant zur Aufklärung des komplexen Netzwerks pflanzlicher Kommunikations- und Verteidigungsmechanismen beitragen.

1.2 Pflanzlicher Sekundärstoffwechsel: Kommunikation und Abwehr

Pflanzen sind in ihren natürlichen Habitaten zahlreichen widrigen biotischen und abiotischen Einflüssen ausgesetzt. Da ihnen als ortsfesten Organismen ein Ausweichen im Raum versagt ist, mußten sie im Laufe der Evolution leistungsfähige und differenzierte Strategien entwickeln, um das ökologische Gleichgewicht der Kräfte zwischen Pflanzen und ihren Fraßfeinden erfolgreich aufrechtzuerhalten. Die Ausbildung von mechanischen Barrieren (Stacheln, Dornen, Wachsschichten, Trichome und Drüsenhaare^[8]) stellt immer nur einen Teil der konstitutiven Präventivmaßnahmen

gegen Fraßschäden dar. Dagegen ist die chemische Verteidigung einer Pflanze nicht notwendigerweise konstitutiv, sondern wird unter Umständen erst infolge eines realen Befalls induziert. Im Gegensatz zur permanenten Produktion von Toxinen und Wehrchemikalien^[9-11] ist die induzierte chemische Verteidigung wesentlich ressourcenschonender und vermeidet Überproduktion nicht benötigter Verbindungen. Die induzierte chemische Verteidigung geht mit einer spezifischen Anschaltung sekundärmetabolischer Vorgänge einher, die nach Erkennung schädlings-assoziiierter Biomoleküle (sog. „Elicitoren“ der pflanzlichen Abwehr) eingeleitet werden. Eines der am besten untersuchten Systeme dieser Art ist die Induktion der Biosynthese des Neurotoxins Nikotin in *Nicotiana sylvestris* (Tabak) nach Herbivorie, mechanischer Schädigung oder Applikation des Phytohormons Jasmonsäure.^[12] Eine andere Pflanze mit ausgeprägter induzierter Verteidigung ist die Baumwolle (*Gossypium hirsutum*). Befall von vorgeschädigten Blättern durch *Helicoverpa zea* führt zu einer signifikanten Wachstumsreduktion der Larven. Die deutlichsten Änderungen im Sekundärmetabolismus der befallenen Baumwollpflanze liegen in einem massiven Anstieg der Konzentration toxischer Phenolderivate und einer Erhöhung der Aktivität oxidativer Enzyme.^[13] In der Sonnenblume (*Helianthus annuus*) kommt es infolge von Schwermetallstreß zu einer 56fachen Cumarin-Induktion^[14] und in Blattlaus-befallener Gerste akkumulieren Proteinase-Inhibitoren (PI-Proteine)^[15]. Die induzierte chemische Verteidigung ist jedoch nicht nur von terrestrischen Pflanzen bekannt. So produzieren Diatomeen (unicellulare See- und Süßwasseralgen) innerhalb weniger Minuten nach Zellschädigung große Mengen $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigte Dienale. Diese reaktiven Michaelakzeptoren wirken fraßhemmend auf Copepoden und reduzieren deren Fekundität.^[16] Neben den vielfältigen *direkten* induzierten chemischen Verteidigungsmechanismen, die immer zur Erhöhung der endogenen Konzentration von Wehrchemikalien führen, existieren auch Strategien zur *indirekten* induzierten Abwehr. Diese Reaktionen werden im allgemeinen über Einschaltung höherer trophischer Ebenen vermittelt. Durch Anlocken von natürlichen Feinden des attackierenden Schädlings kommt es zur indirekten Reduktion von Herbivorie und zu einem Nutzen für die befallene Pflanze. Von besonderer Bedeutung in diesem Zusammenhang ist die fraß- oder infektionsinduzierte Freisetzung von flüchtigen Verbindungen. Diese Duftstoffe können carnivoren Insekten oder Parasiten den Weg zu ihren Beutetieren bzw. Wirten weisen (Abb. 1). Durch Spinnmilben (*Tetranychus urticae*) befallene Limabohnen

(*Phaseolus lunatus*) emittieren nach nur wenigen Stunden ein recht komplexes Gemisch verschiedenster flüchtiger Komponenten.^[17] Unter diesen induzierten und *de novo* biosynthetisierten Verbindungen befinden sich Aromaten wie Methylsalicylat und Indol, aber auch Fettsäure-abgeleitete Komponenten wie Hexenylacetat. Den größten Teil des Duftstoffgemisches stellen jedoch Terpene und Terpenoide wie Linalool, Ocimen oder Caryophyllen. Das freigesetzte Bouquet ist hochattraktiv für carnivore Raubmilben (*Phytoseilus persimilis*), die als blinde Predatoren auf diese Weise zu ihrer Beute finden.^[18] Ein weiteres tritrophisches System ähnlicher Art wird von Schmetterlingslarven (z.B. *Spodoptera* spp.), Mais (Limabohnen, Baumwolle, Tomate) und parasitischen Wespen (*Cotesia marginiventris*) gebildet. Auch hier induziert ein Schädlingsbefall die massive Emission *de novo* synthetisierter Duftstoffe durch die attackierte Pflanze.^[19] Auf der Suche nach geeigneten Wirten für ihre Larven steuern die Wespen gezielt die Quelle der Duftstoffe an. Sie injizieren Eier in die Körper der lebenden Raupen, welche im folgenden als Nahrungsquelle für die sich entwickelnden Wespenlarven dienen.^[20]

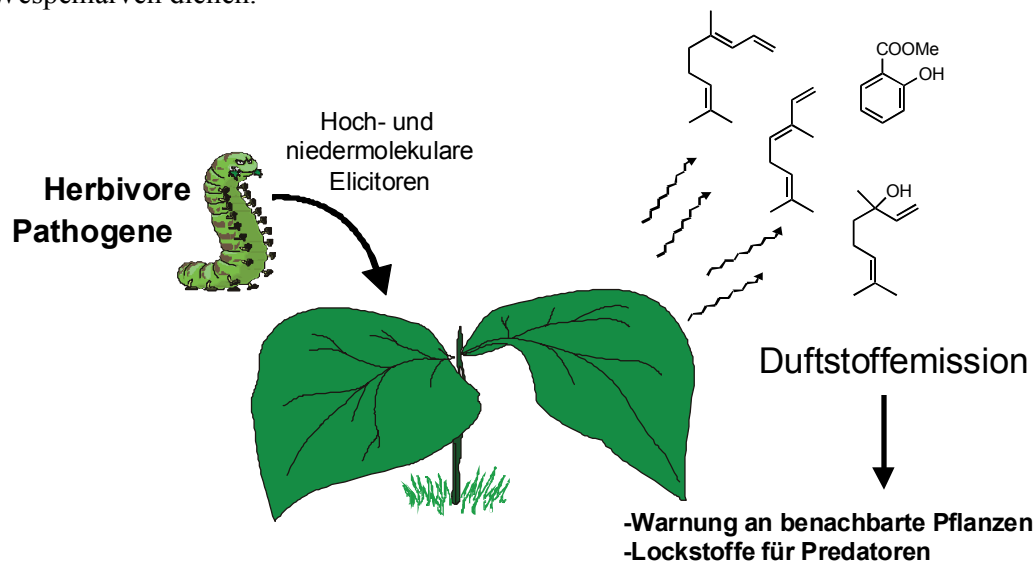


Abb. 1: Ein Befall durch Schädlinge oder Pathogene löst bei Pflanzen häufig die Emission von Duftstoffen aus. Diese wirken attraktiv auf natürliche Feinde der Herbivoren und werden als Mediatoren der interplantlichen Kommunikation diskutiert.

J THALER konnte kürzlich zeigen, daß eine Induktion der Duftstoffbiosynthese bei Tomaten in einem landwirtschaftlichen Feld tatsächlich zu deutlich erhöhter Parasitierung von Herbivoren führt, was in einer Reduktion der Fraßschädigung und damit einem Nutzen für die Pflanzen resultiert.^[21] Induzierte Pflanzendüfte dienen jedoch nicht allein

der indirekten Verteidigung durch „Rekrutierung von Predatoren“^[22]. Die Duftstoffe können als flüchtige Verbindungen ganz allgemein über größere Distanzen andere Organismen vom physiologisch/ökologischen Status einer Pflanze unterrichten („Infomone“) und damit unter Umständen eine Kommunikation zwischen den ortsfesten Pflanzen ermöglichen. Einige induziert freigesetzte Verbindungen, wie Ethylen^[23], Methyljasmonat^[24, 25], *cis*-Jasmon^[26] oder Methylsalicylat^[27] scheinen tatsächlich in der Lage zu sein, in benachbarten gesunden Pflanzen prophylaktisch Verteidigungs- und Resistenzgene zu aktivieren.

Zur Erklärung der selektiven und spezifischen Induktion von direkten und indirekten Verteidigungsmechanismen muß eine Pflanze über hochdifferenzierte endogene stoffliche Signalschienen („Signaltransducer“) verfügen, die nach Reizperzeption die Signale aufnehmen, prozessieren und in Genexpression umsetzen können. Diese Aufgaben werden zu einem großen Teil von pflanzlichen Hormonen („Phytohormonen“) wahrgenommen, deren Lokalisation, Konzentration und Interaktionen schließlich eine gezielte Genexpression bewirken.

1.3 Die Rolle von Phytohormonen bei der pflanzlichen Abwehr

Reaktionen höherer Pflanzen auf Veränderungen in ihrem ökologischen Umfeld (Schädlings- oder Pathogenbefall, oder abiotischer Stress wie Dürre, Salz- und Schwermetalleinwirkungen) werden fast immer durch Phytohormonsignalkaskaden initiiert. Die Hormone und ihre Biosynthesewege wirken als Signaltransducer bei der Reizübermittlung von der Erkennung eines „Problems“ zur resultierenden Aktivierung der Genexpression. Die hormonell eingeleitete Genexpression bewirkt die Ausbildung der beobachteten Reaktionen wie Duftstoffbiosynthese oder Akkumulation verschiedener Toxine. Das klassische Konzept der Tierphysiologie charakterisiert ein Hormon als eine Substanz, die in einer speziellen Drüse synthetisiert und von dort in Blut oder Lymphe zu einem anderen Körperteil transportiert wird. Dort beeinflußt es in extrem niedrigen Konzentrationen (oft genügen wenige Moleküle für die Initiation sekundärmetabolischer Änderungen) einen spezifischen physiologischen Prozess. Bei Pflanzen hingegen kann nicht immer zwischen Bildungs- und Wirkort unterschieden werden. Pflanzenhormone wirken außerdem weniger spezifisch und können abhängig von Organ oder Gewebe und seinem physiologischen Zustand ein breites Spektrum von Antworten hervorrufen.

Häufig interagieren mehrere Hormone und ihre Signalschienen, so daß letztlich nicht die absolute Konzentration der einzelnen Stoffe, sondern ihre relativen Mengenverhältnisse am Ort entwicklungsbestimmend sind.^[28] Zu den Pflanzenhormonen zählen heute wenigstens sieben Verbindungsklassen: Auxine, Gibberelline, Cytokinine, Abscisinsäure, Ethylen (Ethen), Salicylsäure und Jasmonsäure^[28, 29]. Wie im tierischen Organismus beeinflussen die Hormone Wachstums- und Entwicklungsprozesse der Pflanzen. Sie steuern z.B. die Fruchtreifung, Wurzelbildung, Chlorophyllauf- und -abbau und induzieren oder inhibieren die Seneszenz von Blättern und Blüten. Für die Induktion sekundärmetabolischer Veränderungen als Reaktion auf Schädlings- oder Pathogenbefall sind unter anderem Jasmonsäure, Salicylsäure, Ethylen sowie Abscisinsäure und Auxine von besonderer Bedeutung (Abb. 2).

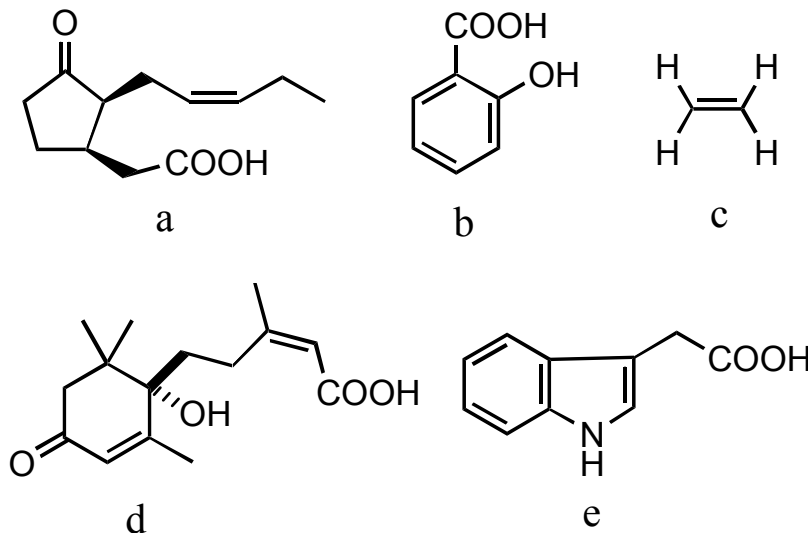


Abb. 2: Jasmonsäure (a), Salicylsäure (b), Ethylen (c), Abscisinsäure (d) und Auxin (Indolessigsäure) (e) tragen zur Induktion von Verteidigungsmechanismen höherer Pflanzen bei.

Attackierende Schädlinge oder Phytopathogene können über eingebrachte Elicitoren und Toxine effektiv in den Hormonhaushalt von Pflanzen eingreifen. Dies äußert sich in veränderten Syntheseraten oder Abbaureaktionen einzelner Hormone, Kompartimentierungseffekten, Bindung oder Freisetzung von Hormonmolekülen aus Konjugaten oder in veränderten Transporteigenschaften.

Jasmonsäure (JA) und die Octadecanoidsignalkaskade

Jasmonsäure wurde 1962 in Kulturen von *Lasiodiplodia theobromae* entdeckt^[30], jedoch erst vor wenigen Jahren als Phytohormon erkannt^[31]. Neben ihrer Beteiligung an

Wachstums und Alterungsprozessen^[32-35] kommt der Jasmonsäure eine bedeutende Funktion bei der Induktion der pflanzlichen Abwehr gegen Fraßfeinde und Mikroorganismen zu. Von JA insbesondere nach Gewebeverletzung und Befall durch gewebescheidende Organismen ausgelöste metabolische Änderungen werden unter dem Begriff der „Wundantwort“ zusammengefasst.^[36, 37] Die Biosynthese der JA verläuft über den Octadecanoid-Signalweg^[38, 39]. Der gegenwärtige Kenntnisstand zur Octadecanoid-vermittelten induzierten Abwehr ist in Abb. 3 zusammengefasst.^[40]

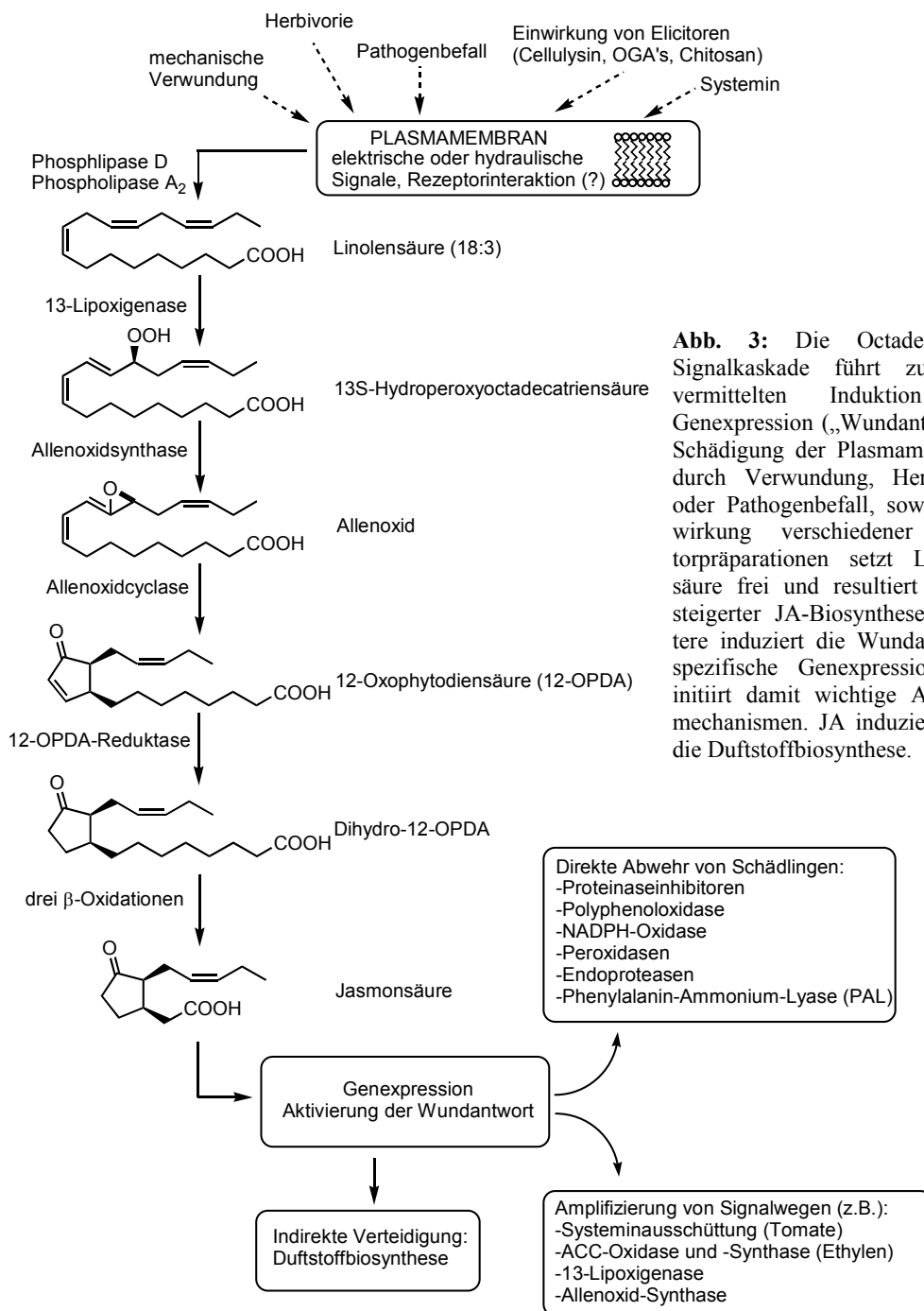


Abb. 3: Die Octadecanoid-Signalkaskade führt zur JA-vermittelten Induktion der Genexpression („Wundantwort“). Schädigung der Plasmamembran durch Verwundung, Herbivorie oder Pathogenbefall, sowie Einwirkung verschiedener Elicitorpräparationen setzt Linolensäure frei und resultiert in gesteigerter JA-Biosynthese. Letztere induziert die Wundantwort-spezifische Genexpression und initiiert damit wichtige Abwehrmechanismen. JA induziert auch die Duftstoffbiosynthese.

Nach Reizperzeption (Gewebeschädigung und/oder Einwirkung spezifischer Elicitoren) kommt es zur Lipase-katalysierten Freisetzung der dreifach ungesättigten C₁₈-Fettsäure Linolensäure aus der Plasmamembran. Lipoxigenase-vermittelte Hydroperoxidierung, Dehydrierung zum Allenoxid und Cyclisierung führen über verschiedene Octadecanoid-Intermediate zur Bildung der 12-Oxophytodiensäure (12-OPDA). Diese stellt das zentrale Element des Biosyntheseweges dar. Anschließende Reduktion und β -Oxidation führt zur Freisetzung von Jasmonsäure. Die infolge Herbivorie oder Pathogenbefall, nach Einbringen spezifischer Elicitoren oder nach rein mechanischer Verwundung erfolgende Hochregulation des Octadecanoidweges zieht eine rasche Erhöhung der Konzentration aller Intermediate und der Jasmonsäure nach sich. Die gebildete JA induziert im weiteren Verlauf artspezifische direkte und indirekte Verteidigungsmechanismen der Pflanze. So werden als Fraßhemmer Proteinaseinhibitor-gene verstärkt exprimiert^[37] oder im Tabak die Produktionsrate des Neurotoxins Nikotin vervielfacht^[12]. Die Induktion von Polyphenoloxidasen hat eine Erhöhung der Konzentration toxischer Produkte zur Folge.^[41] Alle genannten Effekte lassen sich auch durch exogene Applikation von JA induzieren. Der Octadecanoidweg steht in permanenter Interaktion mit anderen Phytohormonen und ihren Signalschienen. So aktiviert Abscisinsäure frühe Schritte dieses Signalweges^[42-44], während für Salicylsäure eine inhibitorische Wechselwirkung mit dem Octadecanoidweg berichtet wird^[40]. Der Einfluß des Ethylens ist komplexer. Es ist essentiell für die Initiation der JA-vermittelten Wundantwort^[45], inhibiert jedoch die JA-induzierte Nikotinbiosynthese^[46]. Indolelessig-säure (Auxin) wirkt über einen unbekanntem Mechanismus als Negativregulator der Wundantwort wahrscheinlich ebenfalls antagonistisch zum Jasmonatweg.^[47] Neben der Jasmonsäure sind auch einigen Octadecanoiden eigenständige Funktionen als Signalstoffe zugeordnet worden. So ist 12-OPDA ein deutlich stärkerer Induktor der Rankenspiralisierung (Mechanotransduktion) als JA.^[48] Zum vollständigen Verständnis der Linolensäure-abgeleiteten Octadecanoid-Signalschiene ist es notwendig, auch diese eventuell JA-unabhängig agierenden Signale zu berücksichtigen. Der Octadecanoidweg stellt jedoch nur einen kleinen Ausschnitt des verzweigten Linolensäuremetabolismus dar. Neben den Octadecanoiden existiert eine Vielzahl anderer LOX-katalysiert aus Linolensäure entstehender sogenannter Oxylipine.^[49] Das Bild verkompliziert sich nochmals, wenn man auch diese Verbindungen als potentielle Mediatoren der pflanzlichen Abwehr in Betracht zieht (vergl. Kap. 3.4).^[50]

Neben der oben erwähnten direkten Verteidigung vermittelt JA auch die Induktion von indirekten Abwehrmechanismen. So aktiviert Jasmonsäure in vielen Pflanzen die Biosynthese und Freisetzung von Duftstoffen, welche als Lockstoffe für carnivore Insekten dienen können (vergl. Kap.1.2). Die Limabohne (*Phaseolus lunatus*) reagiert nach exogener Jasmonatapplikation bereits wenige Stunden später mit der Freisetzung eines komplexen Gemisches an flüchtigen Verbindungen (Abb. 4).^[51]

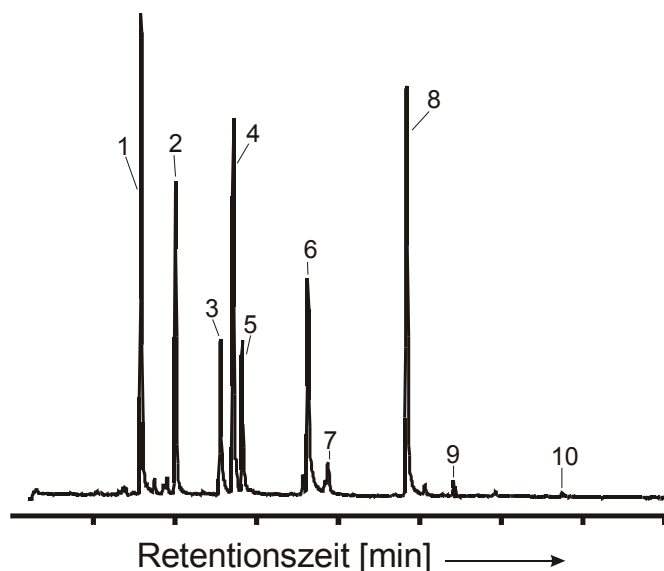


Abb. 4: Gaschromatographisches Profil der nach Jasmonatbehandlung (1mM) von Limabohnen freigesetzten Duftstoffmischung. Identifizierung von Verbindungen: (1) Hexenylacetat, (2) Ocimen, (3) Linalool, (4) DMNT, (5) C₁₀H₁₄ (Monoterpen), (6) C₁₀H₁₆O, (7) Valeriansäurehexenylester, (8) interner Standard (n-Bromdecan), (9) Caryophyllen, (10) TMTT.

Unter den emittierten Duftstoffen sind aromatische Komponenten (Methylsalicylat, Indol), Fettsäure-abgeleitete sog. „green leaf volatiles“ (Hexenyl-Verbindungen) und Produkte des Mevalonat-abhängigen und –unabhängigen Terpenstoffwechsels^[52] (Linalool, Ocimen, Caryophyllen). Auch die beiden Sesqui- und Diterpen-abgeleiteten^[53] Homoterpene 4,8-Dimethylnona-1,3,7-trien (DMNT) und 4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen (TMTT) sind insbesondere nach Induktion der Limabohne mit dem Phytotoxin Coronatin (aus *Pseudomonas*-Stämmen,^[54]), aber auch nach Befall durch Spinnmilben im Duftstoffgemisch vertreten^[17]. Das aus dem phytopathogenen Pilz *Trichoderma viride* als rohe Cellulasemischung isolierbare „Cellulysin“ eliciert in höheren Pflanzen ebenfalls die Duftstoffbiosynthese.^[55] In der Limabohne entspricht das durch Cellulysinbehandlung induzierte Duftstoffgemisch dem nach JA-Inkubation. Bereits wenige Minuten nach Cellulysinapplikation beobachtet man einen massiven

Anstieg endogen synthetisierter JA, deren Gehalt bei ca. 40 min ein transientes Maximum durchläuft und dann wieder absinkt (Abb. 5A). Mechanisch verletzte Limabohnen (Kontrolle nach Abschneiden der Blätter) zeigen demgegenüber eine deutlich reduzierte JA-Induktion, die allerdings der gleichen Kinetik folgt (Abb. 5B).^[56]

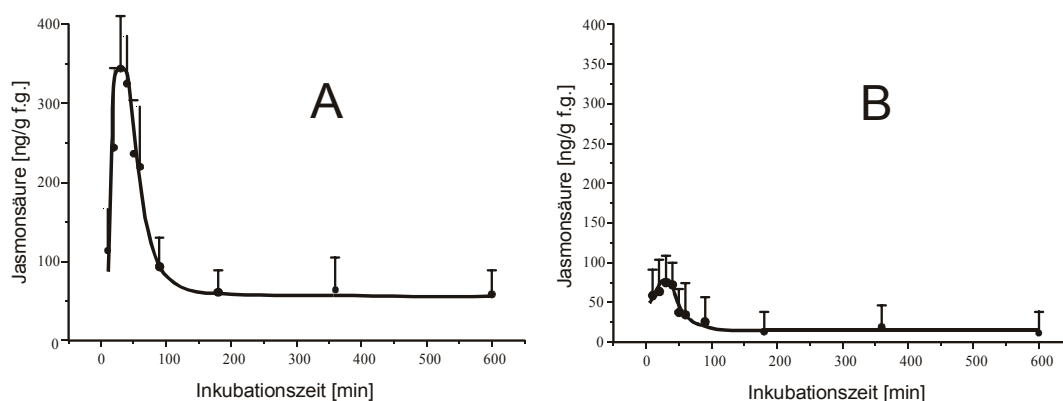


Abb. 5: (A) Behandlung von Limabohnen mit Cellulysin (50 µg/ml) führt zu einer raschen Aktivierung der JA-Biosynthese (7-10fache Induktion nach 40 min). (B) Reine mechanische Verwundung (Abschneiden der Blätter am Stiel) bewirkt -bei identischer Kinetik- eine Verdopplung des endogenen JA-Gehalts innerhalb weniger Minuten.

Behandlung von Limabohnen mit dem Proteinelicitor Cellulysin aktiviert also den Octadecanoidweg und induziert die Duftstoffbiosynthese in *P. lunatus* via JA-vermittelter Genexpression.

Der aus dem Lipidstoffwechsel abgeleiteten Jasmonsäure kommt bei der Initiierung und Koordination pflanzlicher Verteidigungsreaktionen eine zentrale Bedeutung zu. In zum Teil bisher unverstandenem Wechselspiel mit anderen Phytohormonen und Lipidsignalen bewirkt ihre spezifische Induktion die Modulation der Expression einer Vielzahl von Genen, die an der pflanzlichen Abwehr beteiligt sind^[57].

Salicylsäure (SA) und der Phenylpropanoidweg

Die pharmakologischen Eigenschaften der Salicylsäure sind weit besser dokumentiert als ihre regulatorische Rolle im Sekundärstoffwechsel höherer Pflanzen. Erste Hinweise auf eine Signalfunktion der Salicylsäure bei Pflanzen stammen von Studien zu Thermogenesereaktionen der Lilie *Sauromatum guttatum*^[58]. Die bei dieser Spezies im Verlauf der Blütenbildung beobachtete Temperaturerhöhung um bis zu 15 °C wird

effektiv von Salicylsäure induziert. Allgemein wirkt Salicylsäure seneszenzinhibierend und begünstigt die Blütenbildung.^[59] Zusatz löslicher Aspirintabletten zum Wasser von Schnittblumen erhält letztere länger frisch und verlängert die Blütezeit.^[57] Diese Eigenschaft der SA ist möglicherweise auf eine Inhibition der Umwandlung von Aminocyclopropan-carbonsäure (ACC) zum seneszenzinduzierenden Ethylen zurückzuführen.^[60] Die Biosynthese der Salicylsäure verläuft über den Phenylpropanoidweg, ist jedoch noch nicht völlig aufgeklärt (Abb. 6).

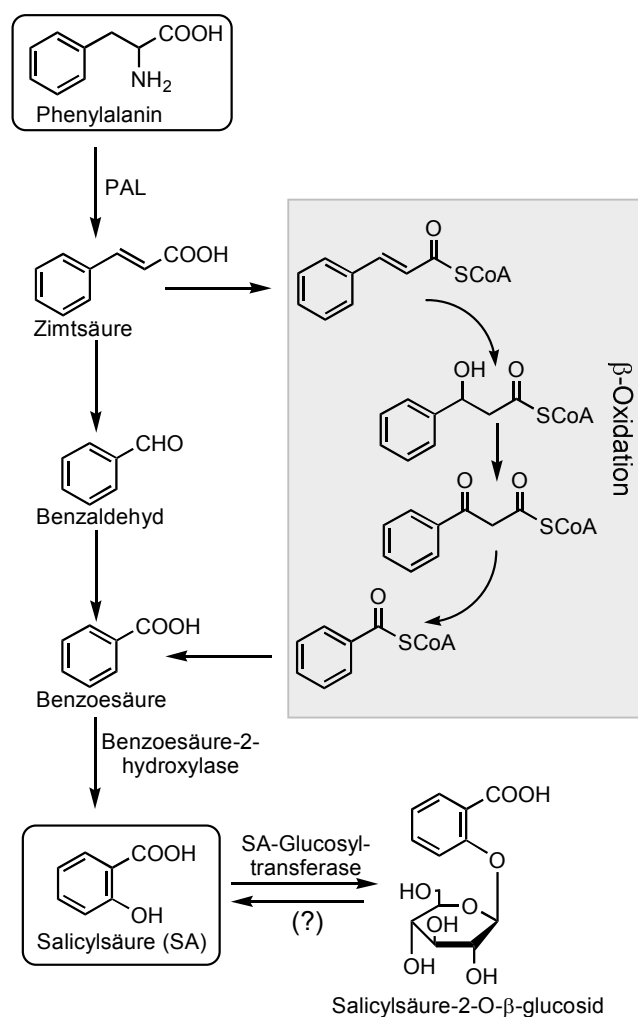


Abb. 6: Phenylpropanoidweg zur Biosynthese der Salicylsäure. Den ersten Schritt stellt die PAL-katalysierte Desaminierung von Phenylalanin zu Zimtsäure dar. Die folgenden Schritte sind nicht mit Sicherheit bekannt. Unter Retroaldolbedingungen kann es über Benzaldehyd als Intermediat zur Bildung von Benzoessäure kommen. Eine andere Möglichkeit besteht in β -oxidativem Abbau der Zimtsäure zur Benzoessäure (grauer Kasten). Dieser Mechanismus ist z.B. für den starken Anstieg endogener SA-Konzentrationen im Tabak nach Infektion mit Tabak-Mosaikvirus (TMV) verantwortlich.^[57] Den letzten Schritt stellt die ortho-Hydroxylierung von Benzoessäure dar. Die freigesetzte Salicylsäure wird zum großen Teil mit Zuckerbausteinen konjugiert

Der erste Schritt ist die durch Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) katalysierte Umsetzung von Phenylalanin zu Zimtsäure. Danach wird sowohl eine Retroaldolreaktion unter intermediärer Bildung von Benzaldehyd als auch ein β -oxidativer Abbau der Zimtsäure zu Benzoessäure diskutiert. Im letzten Schritt wird Benzoessäure enzymatisch ortho-hydroxyliert. Neuere Untersuchungen von JARVIS et al. deuten zumindest in

Gurke (*Cucumis sativus*) und Tabak (*Nicotiana attenuata*) auf eine Bevorzugung der betaoxidativen Route hin.^[61] Ein Großteil der gebildeten Salicylsäure liegt im pflanzlichen Gewebe jedoch nicht frei, sondern in Form von glucosidischen Konjugaten vor. Ob diese Konjugation der Initiierung von Abbauprozessen oder eher der reinen Speicherung (bei Bedarf schnelle Freisetzung von SA aus Konjugaten?) dient, ist bislang ungeklärt.^[62]

Neben ihrer seneszenzinhibierenden Eigenschaften kommt der Salicylsäure eine bedeutende Rolle bei der pflanzlichen Abwehr, insbesondere von Pathogenen und Mikroorganismen, zu. So scheint SA mit der „hypersensitive response (HR) -Reaktion“ assoziiert zu sein.^[63] Diese Reaktion führt durch gezielte Apoptose zu Gewebnekrosen rund um mykotische, virale oder bakterielle Infektionsherde und unterbindet die weitere Ausbreitung der Pathogene. Der lokalisierte Zelltod geht häufig mit der Initiation sekundärmetabolischer Vorgänge auch in entfernten völlig gesunden Teilen der befallenen Pflanze einher. Diese Vorgänge bewirken innerhalb weniger Wochen eine Erhöhung der Resistenz gegen mikrobielle Sekundärinfektionen und werden unter dem Begriff „systemic acquired resistance“ (SAR) zusammengefaßt.^[64] Im Verlauf der systemischen Reaktion kommt es zur Produktion von Chitinasen, Glucanasen, lytischen Enzymen und zur Expression von sogenannten pathogenassoziierten Proteinen (PR-Proteine, „pathogenesis related proteins“).^[65, 66] Ein Hauptcharakteristikum der SAR ist ihre Unspezifität. So induziert eine Initialinfektion durch ein Bakterium (*Pseudomonas fluorescens*) in *Raphanus sativus* (Rettich) die systemische Resistenz gegen diverse andere fungale und bakterielle Pathogene.^[67] Außer durch Pathogeninfektionen läßt sich die SAR-Reaktion auch durch exogene Applikation von Salicylsäure initiieren. So exprimieren Tabakpflanzen nach Behandlung mit SA, Acetylsalicylsäure (AcSA) oder Methylsalicylat (MeSA) das gleiche Muster an PR-Proteinen wie nach einer TMV-Infektion und zeigen wenig später eine deutlich gesteigerte Pathogenresistenz.^[57] Infolge einer Infektion durch TMV erhöht sich der endogene SA-Pool in resistenten, nicht aber in suszeptiblen Tabak-Kultivaren um ca. den Faktor 40.^[57] Überprüfung dieser Effekte an anderen Pflanzen und unter Verwendung unterschiedlicher Pathogene zeigen die Universalität des Konzepts. Eine SA-Behandlung induziert die systemische Resistenz, und Pathogenbefall geht mit Erhöhung endogener SA-Konzentrationen einher, in deren Verlauf es zur Ausbildung der HR- und SAR-Reaktionen kommt. SA-defiziente Mutanten von *Nicotiana sylvestris* sind nicht zur Initiierung der SAR in der Lage.^[68]

Salicylsäure stellt also ein notwendiges regulatorisches Element bei der Pathogenabwehr dar. Ihre genaue Funktion ist jedoch noch ungeklärt. Während man lange Zeit davon ausging, daß SA identisch mit dem zur Induktion von Resistenz in entfernten Teilen einer Pflanze notwendigen Phloem-mobilen Signal ist^[69], deuten neuere Studien eher darauf hin, daß SA nicht das primär transportierte Signal darstellt.^[29] Nach gegenwärtigem Kenntnisstand induziert eine lokale Initialinfektion die Produktion eines bislang unidentifizierten mobilen Signals, das in entferntere Gewebeabschnitte transportiert wird und dort die für die Ausbildung der SAR erforderliche SA-Akkumulation induziert^[57]. Als solches Signal wird z.B. das aus SA durch Methylierung entstehende Methylsalicylat (MeSA) diskutiert. Als flüchtige Verbindung induziert MeSA die Expression von PR-Proteinen sowohl in entfernten gesunden Abschnitten der befallenen Pflanze, als auch in benachbarten nichtinfizierten Pflanzen.^[27] Weitgehende Übereinstimmung herrscht in der Literatur über die Beobachtung, daß Salicylsäure mit der Jasmonat-vermittelten Wundantwort negativ interferiert.^[70] Eine ausgeprägte Induktion der SAR gegen Pathogene bewirkt im Gegenzug häufig eine Erhöhung der Suszeptibilität der Pflanze gegenüber Herbivorie.^[71] Daher und wegen der zur Aufrechterhaltung entsprechender metabolischer Vorgänge stetig verbrauchten Ressourcen kann eine konstitutive SAR-Induktion (z.B. durch permanente SA-Applikation) für eine Pflanzenpopulation auch negative Folgen haben.^[72]

Zusammengefaßt spielt Salicylsäure eine Schlüsselrolle bei der endogenen Signaltransduktion, die zur Aktivierung von PR-Proteinen, der SAR und der HR-Reaktion führt. Die Aufklärung ihrer genauen Funktion bedarf allerdings weiterer Studien.

Ethylen (Ethen) – die allgemeine Stessantwort

Kenntnisse über die Beteiligung von Ethylen an pflanzenphysiologischen Vorgängen reichen bis ins späte 19. Jahrhundert zurück.^[57] Kein anderes Pflanzenhormon bewirkt eine derartige Vielzahl von Effekten wie das Ethylen. Es wirkt sowohl als endogenes Signal wie auch als gasförmiger Informationsträger zur Kommunikation über weite Distanzen. Dabei beeinflußt es Wachstum und Entwicklung der betreffenden Pflanzen und übt Effekte auf Saatkeimung, Wurzel- und Sproßwachstum sowie Entwicklung von Blüten aus. Ethylenexposition beschleunigt die Seneszenz von Blättern und induziert die Fruchtreifung. Es wird von Pflanzen als „Stressmetabolit“ infolge Einwirkung fast aller

denkbarer biotischer oder abiotischer Streßfaktoren verstärkt emittiert.^[73] Dazu zählen unter anderem mechanische Verwundung, Extremtemperaturen, Trockenstreß, osmotischer Streß und Schwermetallexposition. Ethylen wird biosynthetisch aus Aminocyclopropancarbonsäure (ACC) unter Beteiligung zweier Schlüsselenzyme, der ACC-Synthase und der ACC-Oxidase, hergestellt.^[74] Die intermediär auftretende ACC hat ihren Ursprung im Methionin-Cyclus (Abb. 7).

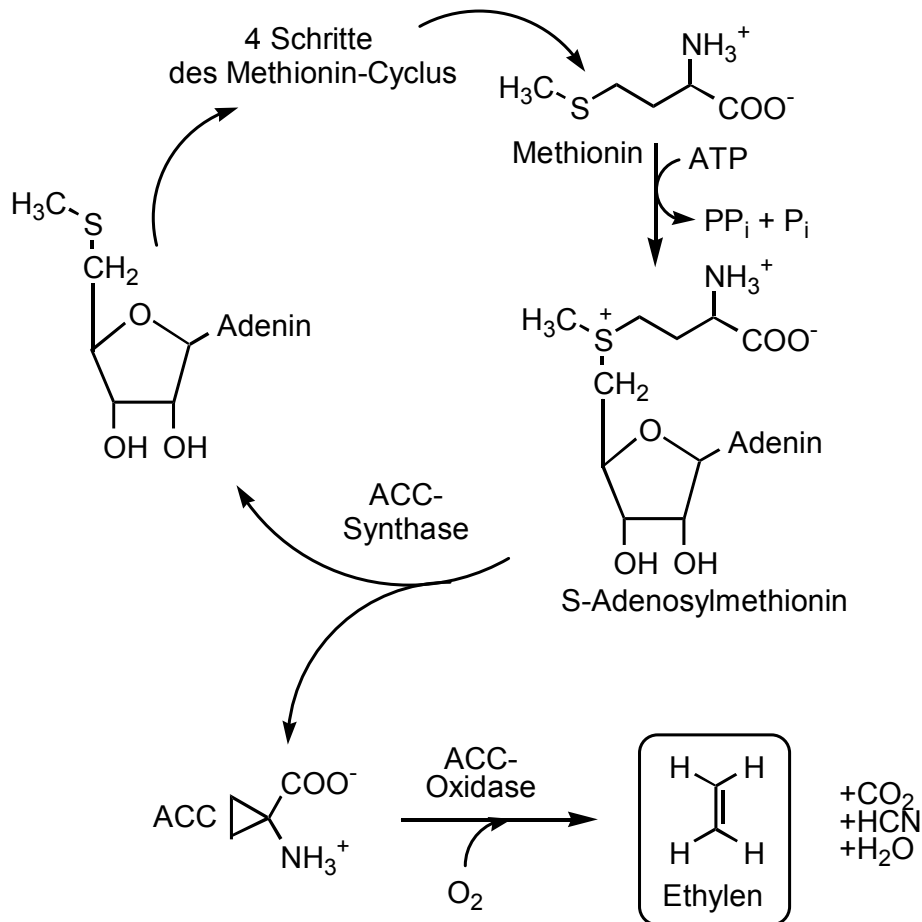


Abb. 7: Biosynthese des Ethylens. Das aus dem Methionin-Cyclus stammende *S*-Adenosylmethionin wird von der ACC-Synthase unter Bildung von Methylthioadenosin und ACC gespalten. Unter Sauerstoffeinwirkung entsteht aus Aminocyclopropylcarbonsäure ACC-Oxidase-katalysiert Ethylen.

Pathogeninfektionen oder Befall durch Schadinsekten stellen Streßsituationen für die Pflanze dar, die normalerweise mit einer verstärkten Emission von Ethylen einhergehen. Das freigesetzte Ethylen trägt zur Modulation von Abwehrreaktionen bei. Es reduziert z.B. die Resistenz von *A. thaliana* gegen den generalistischen Schädling *Spodoptera littoralis*, hat jedoch keinen Einfluß auf die Resistenz gegen den Spezialisten *Plutella*

xylostella.^[75] Auch die Induktion der Ethylenemission kann im Kontext der vielschichtigen Verteidigungsmechanismen einer Pflanze nicht isoliert betrachtet werden. In vielen Fällen wird ein Zusammenwirken der Ethylen- und JA-Signalkaskaden gefunden. Dabei treten häufig synergistische Wechselwirkungen auf. So induziert der Proteinelicitor Cellulysin in der Limabohne neben der massiven Hochregulation der Octadecanoidsignalkaskade auch die Ethylenbiosynthese.^[55] In *A. thaliana* führt die synergistische Wechselwirkung zwischen den beiden Phytohormonen JA und Ethylen zur Induktion einer systemischen Resistenz gegen ein breites Spektrum von Pathogenen, welche sich deutlich von der SA-vermittelten SAR unterscheidet und als induzierte systemische Resistenz (ISR) bezeichnet wird.^[76] Salicylsäure übt zumeist einen inhibitorischen Effekt, nicht nur auf die JA-, sondern auch auf die Ethylenbiosynthese aus.^[57]

Zusammenfassung

Als Antwort auf biotische und abiotische Einflüsse reagieren Pflanzen mit einer zum Teil massiven Änderung ihres Hormonhaushalts. Infolge Herbivorie oder Pathogenbefall kommt es zur Inhibition oder Induktion der verschiedenen hormonellen Signalschienen, was sich in drastisch veränderten endogenen Konzentrationen der beteiligten Phytohormone wie Jasmonsäure, Salicylsäure oder Ethylen aber auch von Auxin, Abscisinsäure und einer Vielzahl bisher unidentifizierter Signalmoleküle niederschlagen kann. Ansätze zum Verständnis der Funktionen einzelner Phytohormone und ihrer Interaktionen sind gelegt. Die differenzierten Reaktionen einzelner Pflanzenarten auf spezielle adverse Einflüsse, sowie das Gesamtbild der sich ergebenden Interaktionen zwischen den Signalträgern sind jedoch keineswegs verstanden und eröffnen ein weites Feld interdisziplinärer Forschung.

2 Aufgabenstellung

Pflanzen besitzen kein Immunsystem, das gegen eindringende Fremdstoffe und Pathogene schützt. Dennoch sind sie in der Lage, über die reizspezifische Induktion eines Apparates aus ineinander verschachtelten und intensiv interagierenden Signalstoffen (Phytohormone) und ihren biosynthetischen Transduktionsschienen, hochgradig selektiv auf einen Befall durch Schädlinge oder Mikroorganismen zu reagieren. Die Gesamtheit der eingeleiteten Abwehrmechanismen sind immer charakteristisch für die betrachtete Art. Unter den Nutzpflanzen gehören die indirekten Verteidigungsstrategien der Limabohne *Phaseolus lunatus* zu den faszinierendsten. Auf eine Vielzahl von Elicitoren sowie auf unterschiedliche Arten der Herbivorie reagiert die Limabohne mit einer stark differenzierten *de novo* Synthese und Freisetzung von Duftstoffen. Behandlung von Limabohnen mit Cellulysin, einer rohen Cellulase aus *T. viride* induziert die Emission einer komplexen Mischung vorwiegend aromatischer und terpenoider Duftstoffe, deren Zusammensetzung sich nicht vom freigesetzten Bouquet nach JA-Induktion unterscheidet (vergl. Abb. 4). Im Gegensatz dazu bewirkt die Applikation von Linolensäure und Aminosäurekonjugaten der Linolensäure die Emission eines reduzierten Duftmusters, das lediglich zwei Homoterpene enthält (DMNT und TMTT, vergl. Abb. 8).^[77]

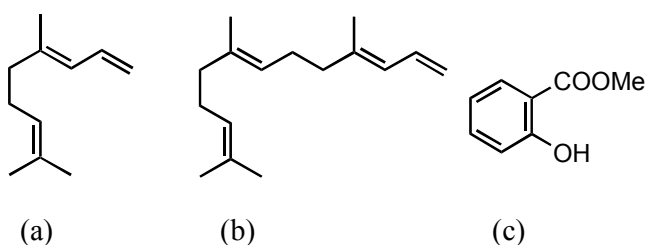


Abb. 8: Alamethicinbehandlung hat bei der Limabohne die Freisetzung eines charakteristischen reduzierten Duftstoffgemisches zur Folge. Es werden lediglich die beiden Homoterpene DMNT (a) und TMTT (b) sowie Methylsalicylat (c) emittiert.

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde von J ENGELBERTH das Ionenkanal-bildende Peptid Alamethicin (ALA), aus dem pflanzenparasitären Pilz *Trichoderma viride*, als potenter Induktor der Duftproduktion höherer Pflanzen entdeckt.

Interessanterweise induziert ALA in der Limabohne ein ähnlich reduziertes Duftmuster wie die vorgenannten Linolensäurederivate, zeigt aber eine vielfach höhere Aktivität. Neben den beiden Homoterpenen DMNT und TMTT werden ALA-induziert allerdings auch große Mengen Methylsalicylat (MeSA) freigesetzt (s. Abb. 8). Verwandte Verbindungen mit ebenfalls membrandepolarisierenden Eigenschaften (elektrisches Signal (?)) erwiesen sich als ähnlich aktiv.

Das komponentenreichste Duftgemisch wird bei der Limabohne durch Befall mit Schmetterlingslarven oder nach Inkubation mit dem Phytotoxin Coronatin^[78] beobachtet. In diesen Fällen wird das vollständige Spektrum sowohl JA- als auch ALA-responsiver Duftstoffe freigesetzt.

Über die Signaltransduktion zwischen Reizperzeption und beobachteter Duftemission ist für die einzelnen Arten der Elicitierung nur wenig bekannt. Die Induktion der Duftstoffbiosynthese ist jedoch häufig eng assoziiert mit dem Octadecanoidweg und der Jasmonsäure.^[51] So konnte bereits gezeigt werden, daß eine Behandlung der Limabohne mit dem Proteinelicitor Cellulysin einen raschen und transienten Anstieg der Produktion endogener Jasmonsäure bewirkt (s. Abb. 5). Allerdings ist zur Erklärung der differentiellen Duftinduktion bei der Limabohne die Beteiligung weiterer Signalstoffe und eine komplexe Verschaltung ihrer hormonellen Signalschienen anzunehmen. Die Entschlüsselung des Netzwerkes von endogenen Signalträgern, die bei der Limabohne die Induktion der Duftstoffbiosynthese beeinflussen, ist eine zentrale Aufgabe der vorliegenden Arbeit.

Nur eine rigorose zeitliche Quantifizierung möglichst vieler Phytohormone erlaubt gezielte Aussagen über den Einfluß einzelner Elicitoren, Herbivoren oder Pathogene auf das pflanzliche Signalgeschehen. Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher analytische Verfahren etabliert werden, die es gestatten, auf möglichst einfache Weise eine größere Zahl endogener pflanzlicher Signalträger zu bestimmen. Dazu zählen Jasmonsäure, Salicylsäure, 12-Oxophytodiensäure, Abscisinsäure, Auxin und Ethylen. Zur Erhöhung der Vergleichbarkeit der Aussagen ist es weiterhin wünschenswert, möglichst viele Phytohormone simultan quantifizieren zu können. Für die Bestimmung der endogenen Signalstoffe ist eine geeignete Extraktion und Probenvorbereitung sowie eine instrumentelle Routineanalytik zu entwickeln. Zur Quantifizierung des Ethylens als gasförmiges Signal sollte in Kooperation mit F KÜHNEMANN vom Institut für

Angewandte Physik der Universität Bonn die Photoakustikspektroskopie (PAS)^[79] zum Einsatz kommen.

Deutliche Unterschiede in der Duftproduktion werden bei *P. lunatus* zwischen einer Induktion mit dem kanalbildenden Peptaibol Alamethicin (Emission lediglich dreier Verbindungen) und einer Induktion durch Befall der Pflanzen mit Schmetterlingslarven (z.B. *Spodoptera* spp.) beobachtet. Es war daher anzunehmen, daß sich auch die eingeleiteten Signalkaskaden in den beiden Fällen charakteristisch unterscheiden. Dieser Fragestellung sollte mit Hilfe einer zu etablierenden Phytohormonanalytik nachgegangen werden. Es waren also zunächst Kinetiken der Ausschüttung endogener Signalstoffe wie JA, SA oder Ethylen während der Inkubation von Limabohnenpflanzen mit dem kanalbildenden Peptaibol Alamethicin aufzunehmen. Die erhaltenen Daten sollten später mit Ergebnissen aus entsprechenden Phytohormonquantifizierungen während Herbivorie in Beziehung gesetzt werden.

Ein Charakteristikum der Induktion von *P. lunatus* mit Alamethicin ist die Freisetzung großer Mengen an Methylsalicylat. Geht man davon aus, daß das emittierte MeSA durch Methylierung der freien Säure entsteht, so ist im Verlauf der Alamethicinbehandlung eine deutliche Induktion der SA-Biosynthese zu erwarten. Es ist literaturbekannt, daß Salicylsäure mit der Jasmonatbiosynthese negativ interferieren kann.^[70] Daher sollte in diesem Zusammenhang ein besonderes Augenmerk auf eine eventuell zu beobachtende SA-bedingte Inhibition des Octadecanoidweges gelegt werden, was das Auftreten des JA-untypischen reduzierten ALA-Duftmusters erklären könnte ('SA/JA-Cross Talk').

Aufgrund dieses beobachteten Duftmusters ist nicht anzunehmen, daß Jasmonsäure eine zentrale Rolle bei der ALA-induzierten Duftstoffproduktion spielt. Daher sollte wenigstens ein anderer endogener Signalträger existieren, dem diese Funktion zuzuschreiben ist. Da eine Inkubation mit Linolensäure bei *P. lunatus* ein ähnlich reduziertes Duftstoffgemisch induziert, ist es naheliegend, daß es sich bei dem gesuchten Signalstoff um ein anderes Linolensäure-abgeleitetes Oxylipin handeln könnte. Um Hinweise auf derartige Signalsubstanzen mit entsprechend charakteristisch elicitierenden Eigenschaften zu erhalten, sollte der Lipoxigenase-katalysierte Linolensäurestoffwechsel der Limabohne untersucht werden. Dazu gehört sowohl die Analytik der endogenen Oxylipine als auch die Synthese aussichtsreicher Kandidaten.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte die Beteiligung von Phytohormonen an der Signaltransduktion der Limabohne nach Befall durch verschiedene Schadinsekten

bestimmt werden. Durch Aufnahme zeitlicher Kinetiken der Mengen an produzierter JA, SA und Ethylen infolge Befall durch unterschiedliche Herbivorenarten und Vergleich mit entsprechenden für ALA und Cellulysin gewonnenen Daten ist ein tieferes Verständnis der endogenen hormonellen Signalschienen und ihrer Interaktionen zu erwarten.

Vor einiger Zeit wurde aus der Arbeitsgruppe um J TURLINSON über die Isolierung eines neuen Elicitors der Duftstoffbiosynthese höherer Pflanzen berichtet.^[22] Aus dem Salivarsekret von *Spodoptera*-Raupen isolierten ALBORN et al. das Volicitin (*N*-(17-Hydroxylinolenoyl)-L-glutamin) und beschrieben es als hochaktiven Faktor bei der Induktion der Duftstoffbiosynthese von Maispflanzen. In unserer Arbeitsgruppe wurden durch T KRUMM bereits Aminosäurekonjugate der Linolensäure, hauptsächlich mit Gln und Ile, synthetisiert und eine geringe Aktivität zur Induktion der Duftstoffbiosynthese an der Limabohne gefunden.^[77] Genau wie durch Behandlung von Limabohnen mit Linolensäure bewirkt auch die Inkubation mit Aminosäurekonjugaten der Linolensäure lediglich die Emission der beiden Homoterpene DMNT und TMTT. Es blieb daher zu klären, ob die Konjugate *per se* aktiv sind und daher eigenständige Elicitoren darstellen, oder ob die nach Hydrolyse freigesetzte Linolensäure bzw. aus ihr gebildete Oxylipine, für die elicitierenden Eigenschaften verantwortlich sind. Dazu war es notwendig, hydrolysestabile Analoga der genannten Aminosäurekonjugate darzustellen und auf ihre Fähigkeit zur Induktion der Duftstoffbiosynthese an der Limabohne zu überprüfen. Auch das Volicitin selbst sollte auf sein Duftinduktionspotential getestet werden. Es war zu klären, ob Volicitin ein aktiverer Elicitor als die bereits getesteten Konjugate ist und ob es sich in anderen Pflanzen ebenfalls als genereller Elicitor erweist.

In einem Kooperationsprojekt mit M HEIL von der Universität Würzburg sollten Untersuchungen zur Beteiligung von Jasmonsäure an der Produktion extrafloralen Nektars (EFN) durchgeführt werden. EFN wird von vielen Pflanzenarten auf ihren Blättern produziert und dient Ameisen und anderen Raubinsekten als Nahrung.^[80] Letztere verteidigen ihre Nektarquelle effektiv gegen Schadinsekten, was zu einer deutlichen Reduktion der Herbivorie und damit zu einem Nutzen für die betroffene Pflanze führt.^[81] HEIL konnte unter Feldbedingungen zeigen, daß sich nicht nur durch mechanische Verwundung des Blattgewebes oder Herbivorie, sondern auch durch exogene Applikation von Jasmonsäure die EFN-Produktion der südostasiatischen

Ameisenpflanze *Macaranga tanarius* vervielfacht. Es war deshalb zu klären, ob es sich bei der induzierten EFN-Produktion tatsächlich um eine über den Octadecanoidweg vermittelte indirekte Abwehrreaktion handelt, die im Gegensatz zu flüchtigen Verbindungen extrafloralen Nektar als Lockstoff zur Rekrutierung carnivorere Insekten nutzt. Durch zeitliche Quantifizierung von Jasmonsäure mit und ohne Inhibition des Octadecanoidweges und Bestimmung der jeweils produzierten EFN-Mengen sollte die Bedeutung dieses Signalweges bei der Initiation der EFN-Produktion herausgearbeitet werden.

Zusammenfassend waren folgende Aufgaben zu bearbeiten:

- (1) Etablierung von analytischen Verfahren, um eine möglichst große Zahl endogener pflanzlicher Signalstoffe quantitativ zu erfassen.
- (2) Anwendung dieser Methoden, um das nach Behandlung von Limabohnen mit dem Pathogen-abgeleiteten Elicitor Alamethicin (ALA) induzierte Signalgeschehen zu charakterisieren.
- (3) Analyse und Synthese von Linolensäure-abgeleiteten Oxylipinen, auf der Suche nach charakteristisch ALA-responsiven Lipidsignalen.
- (4) Anwendung der etablierten Phytohormonanalytik zur Aufklärung der in der Limabohne nach Herbivorie induzierten Signalschienen.
- (5) Charakterisierung der elicitierenden Wirkung von Linolensäurederivaten.
- (6) Evaluierung der Beteiligung von JA an der Induktion der EFN-Produktion bei *M. tanarius*.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Analytik und Quantifizierung endogener pflanzlicher Signalstoffe

3.1.1 Einleitung

Aus phytochemischer Sicht können Pflanzenhormone als nur in Spuren auftretende Sekundärmetaboliten aufgefaßt werden. Pflanzen produzieren eine große Vielzahl unterschiedlichster Sekundärstoffe. Als Konsequenz stellen Gewebeextrakte, die immer als Startpunkt der Phytohormonanalytik anzusehen sind, eine komplexe Multi-komponentenmischung dar. Diese Tatsache erschwert eine akkurate qualitative und quantitative Analyse von pflanzlichen Signalstoffen. Dennoch hält die moderne instrumentelle Analytik heute eine Reihe verschiedener Möglichkeiten bereit, mit denen man in Verbindung mit effizienter Probenvorbereitung fast alle gewünschten Spurenkomponenten aus der pflanzlichen Gewebematrix isolieren und zum Teil mehrere Analyten simultan quantifizieren kann.^[82] Die meisten im Rahmen dieser Arbeit angewendeten und etablierten Quantifizierungen bedienen sich zur Probenvorbereitung der Festphasenextraktion und zur Analytik der kombinierten GC-(SIM)-MS. Ein zugesetzter, dem jeweiligen Analyten möglichst ähnlicher deuterierter Standard ermöglicht, nach Vergleich der jeweiligen Peakflächenverhältnisse Analyt/Standard mit zuvor aufgenommenen Eichgeraden, die exakte Quantifizierung des gewünschten Signalstoffs.

3.1.2 Analytik der Jasmonsäure (JA)

Jasmonsäure bewirkt die Modulation der Expression einer Vielzahl von Genen, die an der pflanzlichen Entwicklung und Verteidigung beteiligt sind.^[57] Viele Effekte, an deren Auslösung Jasmonsäure beteiligt ist, gehen mit einer raschen Veränderung ihrer endogenen Konzentration einher. So beobachtet man nach Zusatz von Methyljasmonat zu Zellkulturen von *Glycine max* einen starken Anstieg der Konzentration von mRNA, die normalerweise in Folge einer Verwundung transkribiert wird.^[83] Eine 10µM Exposition von *T. cuspidata* Zellkulturen führt zu einer deutlich gesteigerten endogenen Taxolproduktion.^[84] Eine große Zahl von Autoren berichtet über einen raschen, im Verlauf

weniger Minuten erfolgenden Anstieg des Gehaltes an endogener JA als Reaktion auf Verwundung von Blattgewebe.^[83, 85, 86]

Zur Untersuchung der Beteiligung von Jasmonsäure und verwandten Verbindungen an pflanzlichen Signalketten wurden daher bereits verschiedene Quantifizierungsverfahren für endogene Jasmonsäure entwickelt. Eine Möglichkeit ist der Einsatz immunologischer Methoden wie RIA (*radioimmuno-assay*)^[87] oder ELISA^[85], vorausgesetzt ein entsprechender radioaktiv markierter Standard bzw. monoklonaler Antikörper ist verfügbar. Durch einen ELISA wurde beispielsweise der erste Hinweis auf eine JA-Beteiligung an der durch den fungalen Elicitor Cellulysin induzierten Duftemission bei *P. lunatus* erbracht.^[55] Ein Nachteil dieser immunologischen Methoden ist die häufig nicht ausreichende Spezifität des Antikörpers. So werden im oben genannten ELISA zur JA-Detektion nach Cellulysinbehandlung außer Jasmonsäure auch ihre Aminosäurekonjugate erfaßt.

Die meisten übrigen Methoden zur Jasmonsäurequantifizierung nutzen eine Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS-Kopplung) zur Analytik. NOJIRI et al. verwenden eine GC-MS-Technik mit Elektronenstoßionisation im *single-ion-monitoring* (SIM) Modus (GC-EI-SIM-MS) zum Nachweis der Beteiligung von Jasmonsäure an der Knollenbildung der Zwiebel (*Allium cepa*). Die auf diese Weise erhaltenen Daten werden mit entsprechenden aus einem RIA erhaltenen Werten verglichen.^[87] Dabei zeigt sich, daß relativ gesehen beide Verfahren zu äquivalenten Aussagen kommen, jedoch sind die absoluten Werte beim RIA um ca. den Faktor 20 niedriger als bei der GC-MS-Analyse. Eine weitere sehr empfindliche Methode unter Verwendung eines Massenspektrometers mit chemischer Ionisation im Negativionenmodus (GC-NICI-MS) wurde von MUELLER et al. entwickelt.^[88] Das Verfahren wurde erfolgreich zur Trennung und Quantifizierung der vier Stereoisomere der Jasmonsäure^[88], sowie in jüngerer Zeit zur simultanen Quantifizierung von JA und ihrem biosynthetischen Vorläufer 12-OPDA in verschiedenen Pflanzen angewendet^[89]. Ein sehr modernes Verfahren zur Quantifizierung von JA, MeJA und Salicylsäure bedient sich der *reversed-phase* Kapillarflüssigkeitschromatographie, gekoppelt mit einem Elektrospray-Tandemmassenspektrometer als Detektor (RP-LC-MS/MS)^[90]. Der große Vorteil dieser Methode ist ihre hohe Spezifität für einen bestimmten zu detektierenden Analyten in einer komplexen Mischung, wie sie Pflanzenextrakte im allgemeinen darstellen. Durch die hier erfolgende doppelte Fragmentierung wird nur

dann ein Signal registriert, wenn aus einem bestimmten, vorher zu determinierenden Primärfragment in einer zweiten Fragmentierung ein definiertes Sekundärfragment entsteht.

Neben den verschiedenen Varianten zur Analyse werden eine Vielzahl unterschiedlicher Probenvorbereitungen eingesetzt. Im allgemeinen wird pflanzliches Gewebe im Gramm- oder Kilogrammmaßstab zerkleinert und mit organischen Lösungsmitteln extrahiert. Im folgenden wird dann der Extrakt weiter extraktiv oder chromatographisch gereinigt. Sehr häufig stellt eine der eigentlichen Analytik vorgeschaltete Reinigung mittels Flüssigchromatographie (HPLC) den Schlüsselschritt bei der Probenvorbereitung dar.^[83, 88]

Die Probenvorbereitung läßt sich allerdings stark vereinfachen, wenn nach der Extraktion des Gewebes durch Aminopropyl-Festphasenextraktion (NH₂-SPE, *solid phase extraction*) eine Anreicherung der enthaltenen Jasmonsäure erfolgt. NH₂-SPE-Kartuschen zur Probenvorbereitung bei der JA-Quantifizierung wurden zuerst von MUELLER et al. angewendet, allerdings mit einer nachgeschalteten zusätzlichen Reinigung per HPLC.^[88] In jüngerer Zeit entwickelten BALDWIN et al. eine neue Probenvorbereitung, die keine HPLC-Trennung erfordert und als Schlüsselschritt die Anreicherung von JA mit Hilfe der Festphasenextraktion implementiert.^[91]

Probenvorbereitung für die Analyse von Jasmonsäure aus pflanzlichem Gewebe

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Vielzahl von Proben auf ihren Gehalt an endogener Jasmonsäure hin untersucht werden. Daher ist es erforderlich, ein möglichst einfaches und schnelles Verfahren für die Probenvorbereitung zu etablieren, das mit hoher Zuverlässigkeit und Genauigkeit die für eine gesicherte statistische Aussage nötigen Probenmengen in vernünftiger Zeit abzuarbeiten erlaubt. Dazu wurde eine Probenvorbereitung modifiziert nach BALDWIN et al. gewählt, die ohne zeitraubende und verlustreiche HPLC-Analytik auskommt.^[91] Sie erlaubt die absolute Quantifizierung endogener Jasmonsäure aus Blattmaterial bis zu einer Nachweisgrenze von ca. 5 ng/g Frischgewicht (f.g.). Als Ausgangsmaterial dient jeweils 1 g frisches pflanzliches Gewebe, welches zum Abbruch aller biochemischen Prozesse in flüssigem Stickstoff eingefroren wird. Aufschluß des Gewebes und Extraktion mit wäßrig-acetonischer Zitronensäurelösung führt zu einer Suspension, die nach Evaporation des Acetons filtriert und mit Diethylether extrahiert wird. Die zugesetzte Zitronensäure verschiebt bei der

Extraktion den Verteilungskoeffizienten in Richtung Ether. Die erhaltenen etherischen Lösungen werden zur weiteren Jasmonsäure-Anreicherung auf Aminopropyl-Festphasenextraktionskartuschen geladen. Diese Kartuschen arbeiten nach dem Ionenaustauscherprinzip und adsorbieren daher selektiv Carbonsäuren. Die übrigen im Extrakt enthaltenen Verbindungen (Chlorophyll, Phospholipide, andere nicht saure Sekundärmetabolite) passieren die Kartusche ungehindert oder werden mit der im Folgenden aufgebrauchten Mischung aus Chloroform und i-Propanol ausgewaschen. Nach Elution mit essigsäurem Ether, Veresterung mit Diazomethan und Aufnehmen der Rückstände in Dichlormethan erhält man Proben von Methyljasmonat, die sich direkt mittels GC-MS untersuchen lassen.

Interner Standard [9,10-²H₂]-9,10-Dihydrojasmonsäure

Als interner Standard dient 3-Oxo-2-[2,3-²H₂]-pentyl]cyclopentylelessigsäure ([9,10-²H₂]-9,10-Dihydrojasmonsäure), die durch katalytische Deuterierung von Jasmonsäure erhalten wurde (s. Abb. 9). Der Standard wird noch vor dem Aufschluß des Blattgewebes in bekannter Konzentration zu jeder Probe zugesetzt.

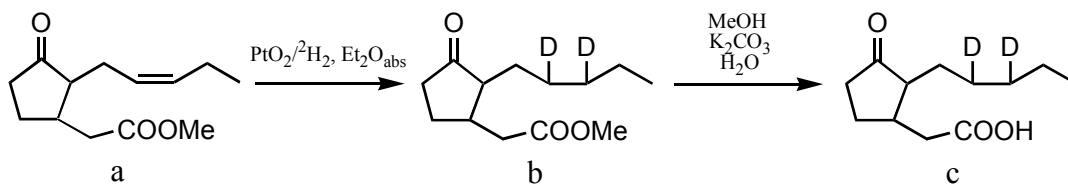


Abb. 9: Jasmonsäuremethylester (a) läßt sich in zwei Stufen zur als interner Standard verwendeten 3-Oxo-2-[2,3-²H₂]-pentyl]cyclopentylelessigsäure (c) umsetzen^[92].

Die Vorteile des verwendeten Standards liegen vor allem in seiner großen chemischen und physikalischen Ähnlichkeit zur Jasmonsäure. Daher wird der Standard zusammen mit der Jasmonsäure während der Probenvorbereitung angereichert, so daß sich ein eventuell auftretender Verlust an Probenvolumen nicht auf das Ergebnis auswirkt. Gleichzeitig sind die physikalischen Eigenschaften der beiden Verbindungen unterschiedlich genug, um eine ausreichende gaschromatographische Trennung zu ermöglichen.

Analytik und Quantifizierung mittels GC-(SIM)-MS

Die routinemäßige Analyse der Proben erfolgte per GC/MS. Ein Temperaturprogramm, das über weite Bereiche isotherm bei T = 127 °C gehalten wird, erlaubt eine gute

Trennung von Standard und Jasmonsäuremethylester. Das als Detektor eingesetzte Massenspektrometer nutzt zur Ionisierung die Elektronenstoßionisation. Die Vermessung der Proben erfolgt dabei im *single-ion-monitoring* (SIM) Modus, d.h. es wird in dem Zeitfenster, in dem die Retention des Analyten zu erwarten ist, nur ein oder wenige Ionen bestimmter Masse detektiert. Da im Massenspektrum von Jasmonsäuremethylester und Standard jeweils das Fragmentation der Masse $m/z = 83$ amu den Basispeak darstellt (s. Abb. 10), wird dieses Ion auch zur Detektion verwendet.

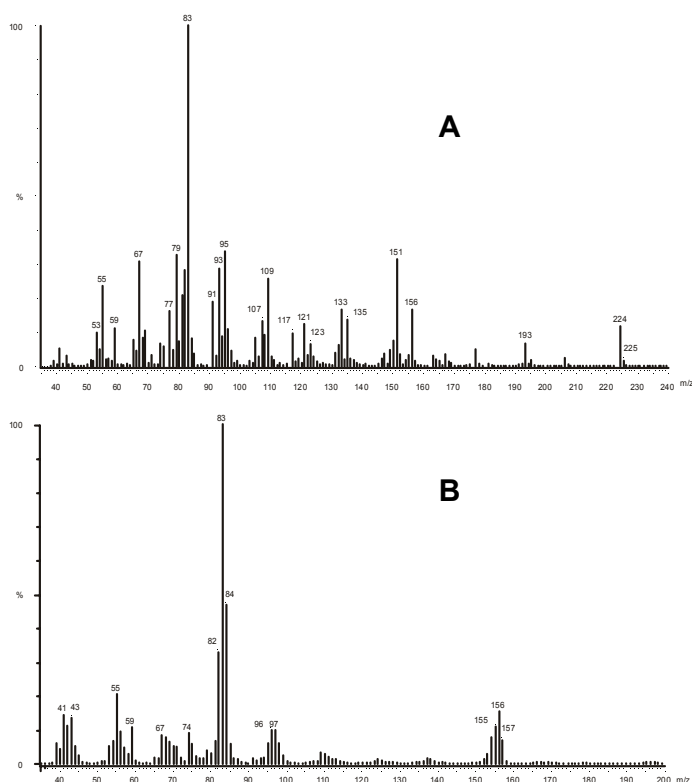


Abb. 10: Massenspektren von Jasmonsäuremethylester (A) und dem als internen Standard verwendeten $[9,10-^2\text{H}_2]$ -9,10-Dihydrojasmonsäuremethylester (B). In beiden Spektren stellt das Ion der Masse $m/z = 83$ amu den Basispeak dar. Daher sind durch eine massenspektrometrische Detektion im SIM 83 Modus beide Analyten erfassbar.

Durch den Einsatz dieses Meßverfahrens erhöht sich die Detektionsempfindlichkeit des Massenspektrometers signifikant gegenüber dem normalen *full-scan* Modus, in dem typischerweise alle Ionen im Bereich von 40-400 amu aufgezeichnet werden. Ein weiterer großer Vorteil des SIM-Modus ist die Tatsache, daß alle Verunreinigungen, die in ihrem Massenspektrum keinen Peak bei $m/z = 83$ amu aufweisen, nicht detektiert werden und somit im Chromatogramm nicht störend in Erscheinung treten können. Die Zuordnung der entsprechenden Peaks im Chromatogramm sowie die Überprüfung einer ausreichenden gaschromatographischen Trennung von Jasmonsäure und Standard erfolgt durch Vergleich mit den Retentionszeiten von Jasmonsäure und Standard in

entsprechenden reinen Lösungen der authentischen Substanzen (s. Abb. 11). Zur endgültigen Identifizierung werden hochkonzentrierte Proben aus biologischem Gewebe, die den gesamten Prozess der Probenvorbereitung durchlaufen haben, im *full-scan* Modus vermessen und die entsprechenden Massenspektren und Retentionszeiten von Jasmonsäure bzw. Standard mit denen authentischer Proben verglichen. Übliche Retentionszeiten liegen bei 12.15 (Methyljasmonat) bzw. bei 12.35 min (Standard).

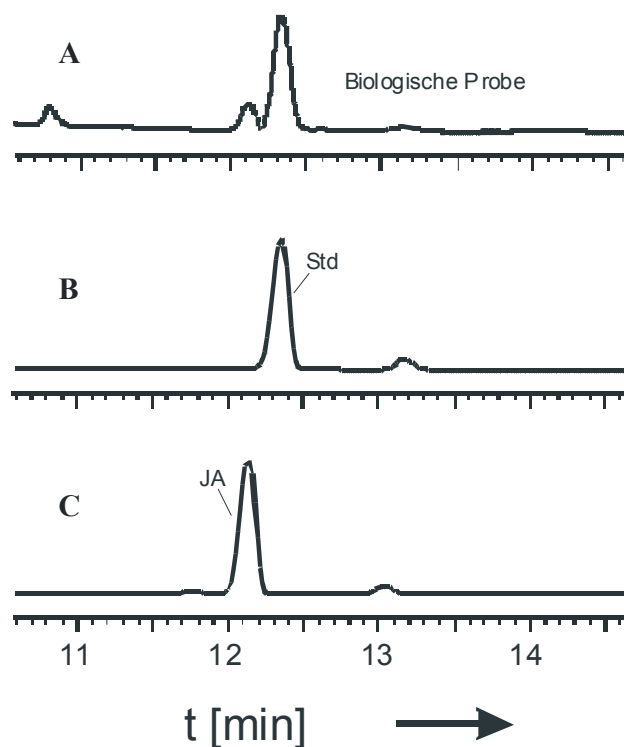


Abb. 11: Vergleich eines Probenchromatogramms (A) (aufgenommen im SIM-Modus) mit den Chromatogrammen einer Lösung von Standard (B) und Jasmonsäure (C). Die Retentionszeiten sind 12.15 min (JA) bzw. 12.35 min (Std). Chromatogramm A zeigt eine ausreichende Trennung der Peaks an.

Evaluierung der Methode

Neben der qualitativen Prüfung der Anwendbarkeit der gewählten Probenaufarbeitung und Analytik ist es zur akkuraten quantitativen Analyse notwendig, die Methode auch auf ihre Güte hinsichtlich der tatsächlich wiedergefundenen Substanzmengen zu überprüfen. Hierzu werden je sechs Proben mit 100 ng bzw. 300 ng Jasmonsäure und der üblichen Menge internem Standard versetzt und nach Veresterung mit Diazomethan direkt analysiert. Je sechs weitere gleichartige Proben (100 respektive 300 ng JA-Gehalt) werden dann dem gesamten Prozess der Probenvorbereitung und Analytik unterworfen und die Menge an im Mittel wiedergefundener Jasmonsäure bestimmt:

a) ohne Probenvorbereitung:

eingesetzt: 100 ng, wiedergefunden: 95.9 ng ± 21.6 ng, 95.9 %.

eingesetzt: 300 ng, wiedergefunden: 286.1 ng ± 24,6 ng, 95.4 %.

b) mit Probenvorbereitung:

eingesetzt: 100 ng, wiedergefunden: 97.2 ng ± 21.7 ng, 97.2 %

eingesetzt: 300 ng, wiedergefunden: 252.6 ng ± 28.5 ng, 84.2 %,

incl. SD: 93.7%.

Diese Ergebnisse zeigen, daß das analytische Verfahren anwendbar ist und zu sinnvollen Ergebnissen führt. Die Probenvorbereitung ist ebenfalls leistungsstark und führt nicht zu einem massiven Verlust des Analyten. Bei beiden Probengruppen, die ohne weitere Probenvorbereitung per GC-SIM-MS analysiert wurden liegt die Wiederfindungsrate, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, praktisch bei 100%, was auch die Güte der Eichgerade und mathematischen Auswertung demonstriert (s.u.). Bei den übrigen beiden Versuchen, die einer vollständigen Probenaufarbeitung unterworfen wurden, liegt die Wiederfindungsrate, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, bei 100 respektive 93,7%. Dies demonstriert deutlich die Effizienz der Aufarbeitung mit Hilfe der Festphasenextraktion. Da der geringe Verlust an Analyt, der bei der letzten untersuchten Probengruppe zu beobachten ist, bei allen 6 Replika gleichermaßen auftrat, kann es sich hier leicht um einen systematischen (z.B. Pipettier-)Fehler handeln.

Auswertung und Statistik für Quantifizierungen an *Phaseolus lunatus*

Zur Auswertung der Probenmessungen werden die Peakflächen integriert und das Verhältnis von Jasmonsäure zu Standard ermittelt. Der absolute Gehalt an Jasmonsäure in ng/g Frischgewicht wird durch Vergleich der so erhaltenen Werte mit einer zur Kalibrierung des Massenspektrometers aufgenommenen Eichgeraden bestimmt. Zur Ermittlung der Eichgeraden bedient man sich der Standardadditionsmethode^[93], d.h. zu Proben nichtinkubierter frischer Blätter von *P. lunatus* werden neben Standard (Std) auch definierte Mengen Jasmonsäure zugegeben. Zur Erhöhung der Genauigkeit wird jede Messung dreimal ausgeführt und die erhaltenen Peakflächenverhältnisse JA/Std gemittelt. Diese gemittelten Peakflächenverhältnisse aufgetragen gegen die Absolutmenge an jeweils zugesetzter Jasmonsäure liefern die Eichgerade (s. Abb. 12):

$$Y = A + B X \quad (1)$$

mit $Y =$ gemittelttes Peakflächenverhältnis JA/Std

$X =$ bei Aufnahme der Eichgeraden definierte
 zugesetzte Menge JA.

Die Zahlenwerte für die Konstanten A und B werden durch Lineare Regression der Daten mit Hilfe des Programmes Microcal Origin[®] ermittelt zu:

$$A \pm \Delta A = 0.06092 \pm 0.04162; \quad B \pm \Delta B = 0.00422 \pm 0.00015$$

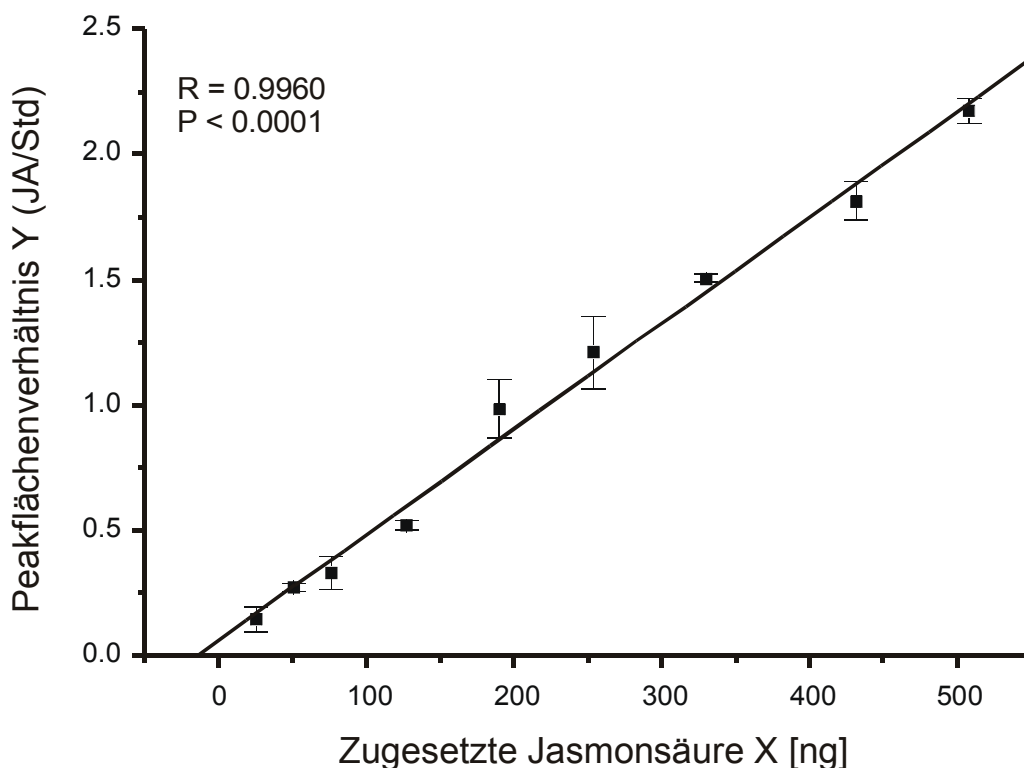


Abb. 12: Über je drei Proben gemittelte Eichgerade zur Ermittlung des Jasmonatgehaltes aus dem Peakflächenverhältnis JA/Std nach entsprechenden Inkubationen an der Limabohne. Der JA-Grundgehalt der Limabohne ergibt sich aus dem Betrag des Schnittpunktes der Gerade mit der Abszisse.

Zur Auswertung mit Hilfe der oben gezeigten Eichgerade bestimmt man aus jedem Probenchromatogramm das Peakflächenverhältnis Y und erhält durch Einsetzen in die Geradengleichung (1) den entsprechenden Wert an zugesetzter Jasmonsäure:

$$X = (Y-A) / B \quad (2)$$

Jeder der Werte Y, A und B ist mit einem Fehler behaftet. Die Standardabweichung von X berechnet sich nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz^[94] (Methode der kleinsten Fehlerquadrate) zu:

$$\Delta X = \left[\left(-\frac{(Y-A)}{B^2} \cdot \Delta B \right)^2 + \left(\frac{1}{B} \cdot \Delta Y \right)^2 + \left(-\frac{1}{B} \cdot \Delta A \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

Um den Gesamtgehalt an Jasmonsäure zu ermitteln, ist zu jedem der erhaltenen Werte für X noch der Grundgehalt zu addieren. Der Grundgehalt ist die Menge an JA, die ein Gramm nichtelicitiertes Pflanzenmaterial natürlicherweise enthält. Dieser läßt sich ebenfalls aus der Eichgeraden entnehmen. Am Schnittpunkt der Eichgerade mit der Abszisse gilt JA/Std = 0, d.h. [JA] = 0. Bei X = 0 gilt [JA] = Grundgehalt, da keine Jasmonsäure zugesetzt wurde. Daher entspricht der Betrag des Abszissenabschnitts zwischen X = 0 und dem Schnittpunkt mit der Eichgerade dem Grundgehalt. Man erhält den JA-Grundgehalt also aus der Geradengleichung für Y = 0:

$$-X_{\text{Grundgehalt}} = -A/B \quad (4)$$

Die Standardabweichung des Grundgehaltes berechnet sich ebenfalls nach Gauß:

$$\Delta X_{\text{Grundgehalt}} = \left[\left(-\frac{1}{B} \cdot \Delta A \right)^2 + \left(\frac{A}{B^2} \cdot \Delta B \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

Diese Berechnungen liefern einen Grundgehalt an Jasmonsäure in *Phaseolus lunatus* von **14.4 ± 9.9 ng/g f.g.**

In der Praxis ist dieser aus der Eichgerade ermittelte Zahlenwert jedoch kritisch zu beurteilen, da in Einzelfällen der Grundgehalt stark schwanken kann (10 – 40 ng/g f.w.). Dies ist dadurch erklärbar, daß der Grundgehalt an Jasmonsäure die gesamte Vorgeschichte der Pflanze, und somit alle aufgetretenen Stressfaktoren, widerspiegelt. Für die weitere Auswertung wurde jedoch der oben genannte Wert zugrundegelegt, so daß sich der Gesamtgehalt an Jasmonsäure einer jeden Probe durch Addition von 14.4 ng zum jeweils erhaltenen Wert für X ergibt. Ebenso sind die Fehler ΔX und $\Delta X_{\text{Grundgehalt}}$ zu addieren, wodurch man die Standardabweichung SD des Gesamtgehaltes erhält.

Um zu einem statistisch aussagekräftigen Ergebnis zu gelangen, wird jede Probenmessung wenigstens dreimal ausgeführt (in vielen Fällen fünf - sechsmal) und die

daraus erhaltenen einzelnen Peakflächenverhältnisse zu einem resultierenden Wert für Y arithmetisch gemittelt. ΔY , d.h. der Fehler des Peakflächenverhältnisses JA/Std, ergibt sich so als Standardabweichung des Mittelwertes. Y und ΔY sind dann in Gleichung (2) bzw. (3) einzusetzen.

Auswertung und Statistik für Quantifizierungen an anderen Pflanzen

Für Jasmonatbestimmungen aus anderen Spezies ist die oben zugrundegelegte Eichgerade nicht anwendbar, da während der Auswertung der JA-Grundgehalt der Limabohne in die Berechnung einfließt. Zur exakteren Bestimmung in diesen Fällen wird eine Spezies-unabhängige Eichgerade aufgenommen, indem Proben unterschiedlicher bekannter JA-Konzentration, die eine konstante Menge Standard enthalten, vermessen werden (3 Replika je Konzentration). Die nach Auftragen der gemittelten Peakflächenverhältnisse gegen die zugegebene JA-Menge erhaltene Eichgerade (s. Abb 13) geht durch den Koordinatenursprung und ist universell verwendbar.

Die Geradengleichung lautet in diesem Fall:

$$Y = B X \quad (6)$$

mit

Y = gemittelttes Peakflächenverhältnis JA/Std

X = bei Aufnahme der Eichgeraden definierte
zugesetzte Menge JA.

$$B \pm \Delta B = 0.00338 \pm 0.00027$$

Die Auswertung von Probenchromatogrammen mit dieser Eichgerade erfolgt völlig analog zum oben Gesagten. Gemittelte Peakflächenverhältnisse Y werden gemäß Gleichung (7) in die korrespondierenden JA-Gehalte umgerechnet:

$$X = Y / B \quad (7)$$

Der Fehler von X berechnet sich nach Gauß zu:

$$\Delta X = [(\Delta Y/B)^2 + (Y/B^2 * \Delta B)^2]^{1/2} \quad (8)$$

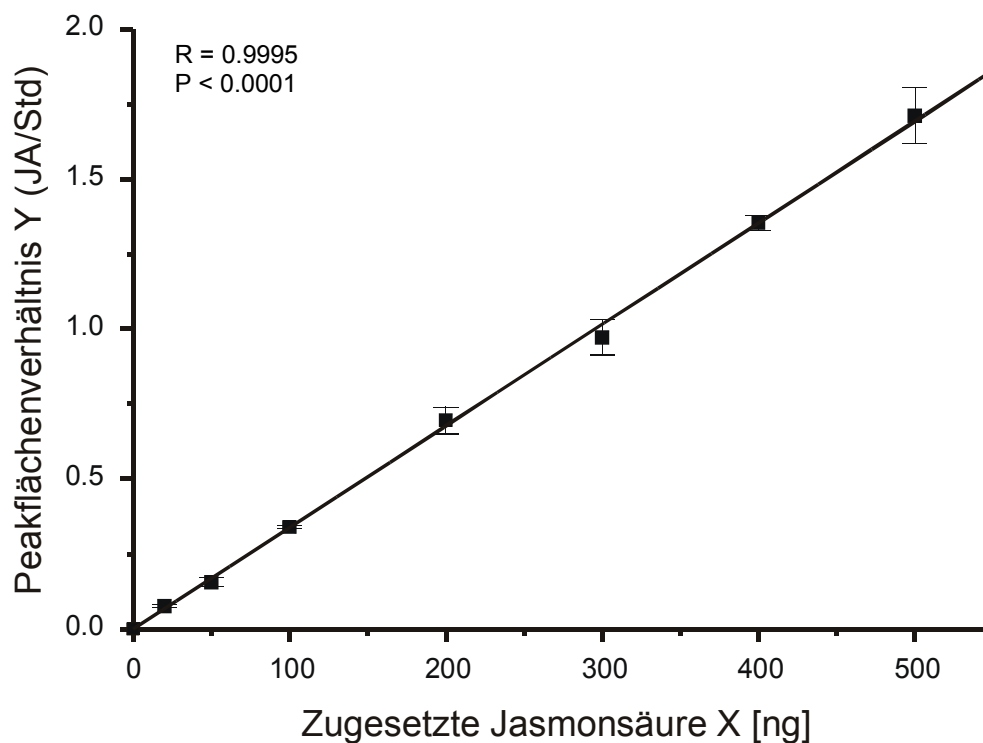


Abb. 13: Über je drei Proben gemittelte Eichgerade zur Ermittlung des Jasmonatgehaltes aus dem Peakflächenverhältnis JA/Std.

Zusammenfassung

Es konnte eine zuverlässige und einfach durchzuführende Analytik und Quantifizierungsmethode für das pflanzliche Hormon Jasmonsäure etabliert werden. Die Probenvorbereitung, die im Wesentlichen aus i) Extraktion des Gewebes, ii) Festphasenextraktion und iii) Derivatisierung besteht, ist sehr effektiv und erlaubt aufgrund der wenigen erforderlichen Arbeitsschritte einen Durchsatz von bis zu 24 Proben pro Tag. Die Analytik mittels GC-(SIM)-MS ist für den Routinebetrieb gut geeignet und verfügt, dank der gewählten Detektion im SIM Modus, über ausreichende Selektivität und Empfindlichkeit, um die Analyten JA und $[(9,10\text{-}^2\text{H}_2)\text{-}9,10\text{-Dihydro-JA}$ neben der komplexen Probenmatrix zu detektieren.

3.1.3 Analytik der Salicylsäure (SA)

Salicylsäure stellt einen weiteren wichtigen Signalstoff höherer Pflanzen dar, der an vielen Entwicklungs- und Wachstumsprozessen beteiligt ist.^[28] Dabei wirkt SA jedoch antagonistisch zu Jasmonsäure seneszenz-inhibierend (vergl. Kap. 1.3). Bei der Analyse und Quantifizierung von Salicylsäure muß man beachten, daß ein großer Teil der in der Pflanze enthaltenen SA gebunden in Form von Aminosäure- und Kohlenhydratkonjugaten vorliegt. Eine Analytik ohne Anwendung hydrolytischer Aufarbeitungsschritte wird immer nur die aktuell freie Salicylsäure detektieren, während unter hydrolysierenden Bedingungen ein vielfach erhöhter endogener Gehalt erhalten wird. Zur Quantifizierung der freien SA, die zur gegebenen Zeit tatsächlich am hormonellen Signalgeschehen der Pflanze beteiligt ist, muß man also unter nicht-hydrolysierenden Bedingungen arbeiten. Aufgrund des gesteigerten Interesses an einem tieferen Verständnis der Pflanze-Pathogen Interaktion, insbesondere an der systemischen Resistenz, existieren derzeit bereits mehrere Arbeiten zur Quantifizierung von SA bzw. ihren Konjugaten aus pflanzlichen Geweben. Dabei kommen reine HPLC-Methoden mit Fluoreszenzdetektion^[95, 96] oder LC-MS mit Elektrosprayionisation zum Einsatz. Letztere Technik nutzte WILBERT zur simultanen Quantifizierung von JA, MeJA und SA.^[90] Die meisten anderen eingeführten Verfahren zur SA-Analytik aus biologischen Geweben nutzen die kombinierte GC-(SIM)-MS-Analyse nach Derivatisierung zum leicht flüchtigen Methylester. Ein allgemeines Verfahren zur Anwendung u.a. im humanmedizinischen Bereich stammt von KAKKAR et al..^[97] Hier kann auf elegante Weise Salicylsäure neben vorliegendem Ethyl- und Methylsalicylat detektiert werden. Ein Verfahren für Pflanzen, das dem in dieser Arbeit verwendeten am nächsten kommt, stammt von SCOTT.^[98] Es erlaubt die Detektion und Quantifizierung von endogener Salicylsäure aus pflanzlichen Geweben mit Hilfe der GC-(SIM)-MS unter Verwendung von dreifachdeuterierter SA als internem Standard. Für die Probenvorbereitung ist allerdings auch hier wieder ein zeitraubender HPLC-Reinigungsschritt erforderlich. Zur Untersuchung der Wechselbeziehungen zwischen den jasmonat- und salicylatabhängigen Abwehrmechanismen der Limabohne war es erforderlich, sowohl JA als auch SA in den selben inkubierten Pflanzen zu bestimmen. Es war daher wünschenswert, eine simultane Analytik zu entwickeln, die die gleichzeitige Bestimmung beider Signalsubstanzen aus einer Probe erlaubt. Dadurch verringert sich

die zu bearbeitende Probenzahl auf die Hälfte. Tatsächlich konnte das bereits für die Analytik der Jasmonsäure unter 3.1.2 beschriebene Verfahren auf einfache Weise zur gleichzeitigen Detektion von Salicylsäure erweitert werden.

Probenvorbereitung zur simultanen SA und JA-Bestimmung

Durch Aufarbeitungsversuche mit authentischen JA- und SA-Mischungen zeigte sich, daß der zentrale Schritt der Probenvorbereitung für die Analytik der Jasmonsäure, nämlich die Aminopropyl-Festphasenextraktion, auch geeignet ist, um gleichzeitig endogene Salicylsäure aus den Gewebextrakten anzureichern. Zur Bestimmung von Salicylsäure kommen also die gleichen Arbeitsschritte wie bereits für JA unter 3.1.2 beschrieben zum Einsatz. Der einzige Unterschied ist, daß zur quantitativen Elution von SA von der Festphasenextraktionskartusche eine etwas größere Menge der Elutionslösung erforderlich ist. Statt der für JA ausreichenden 8 ml werden hier 12 ml zur Elution eingesetzt. Für die JA-Bestimmung ist diese Veränderung ohne Bedeutung, so daß die bereits gut etablierte Probenvorbereitung zur Quantifizierung von Jasmonsäure auf einfache Weise und simultan auch zur Anreicherung endogener Salicylsäure aus pflanzlichen Geweben verwendet werden kann.

Interner Standard [3,4,5,6-²H₂]-Tetradeterosalicylsäure

Als interner Standard für die Bestimmung von Salicylsäure dient [3,4,5,6-²H₂]-Tetradeterosalicylsäure. Die Verbindung läßt sich in zwei Schritten aus Hexadeuterophenol darstellen.^[99] Im ersten Schritt wird das vollständig deuterierte Phenol in einer Reimer-Tiemann-analogen ortho-Formylierung in den entsprechenden Salicylaldehyd überführt und dieser dann im zweiten Schritt durch Einwirken von Natriumchlorit zur Tetradeterosalicylsäure oxidiert (Abb. 14).

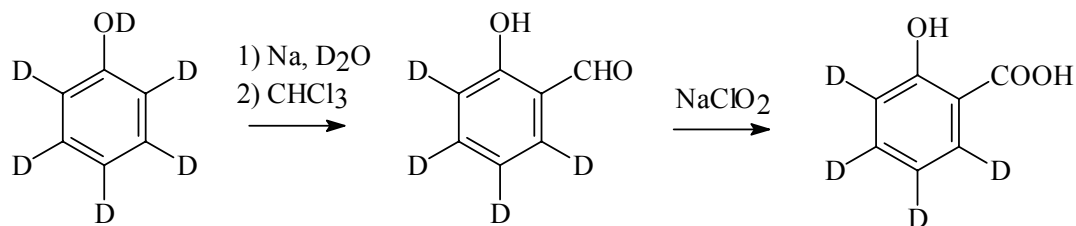


Abb. 14: Darstellung von [3,4,5,6-²H₂]-Tetradeterosalicylsäure, aus Phenol-d₆.

Die Reinheit des erhaltenen Standards wird nach Derivatisierung zum entsprechenden Methylester per GC-MS überprüft. Der Deuterierungsgrad entspricht mit 99.7 % dem des eingesetzten Phenols. 500 ng dieser [3,4,5,6-²H₂]-Tetradeterosalicylsäure werden zu Beginn der Probenvorbereitung gleichzeitig mit dem Standard zur JA-Bestimmung jeder Probe zugesetzt. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften von SA und dem tetradeterierten Standard sind nahezu identisch. Daher wird der Standard zusammen mit der Salicylsäure während der Probenvorbereitung angereichert, so daß sich ein eventuell auftretender Verlust an Probenvolumen nicht auf das Ergebnis auswirkt.

Simultane Analytik und Quantifizierung von JA und SA mittels GC-(SIM)-MS

Wie bereits für JA beschrieben, werden die nach der Probenvorbereitung erhaltenen methylierten Lösungen in Dichlormethan per GC-(SIM)-MS untersucht. Aufgrund der weitgehenden chemischen und physikalischen Übereinstimmung zwischen SA und dem korrespondierenden Standard lassen sich die beiden Verbindungen gaschromatographisch nicht trennen.

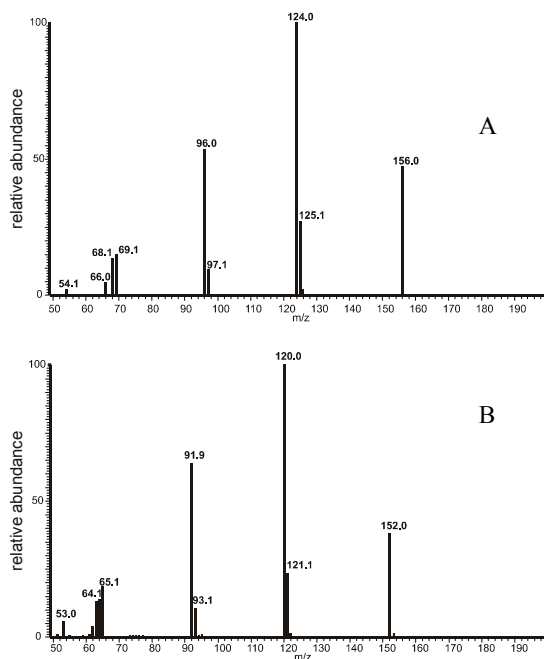


Abb. 15: Massenspektren von Tetradeutero-MeSA (A) und Methylsalicylat (B). Die Unterscheidung im Chromatogramm erfolgt durch Analyse der Ionenspuren 120 (für MeSA) bzw. 124 (für MeSA-d₄).

Unter Verwendung des gleichen Temperaturprogramms wie für die JA-Analytik beschrieben, coeluierten Methylsalicylat und $[3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_2]$ -Tetradeuterosalicylsäuremethylester praktisch bei Retentionszeiten von 3.61 (Tetradeutero-MeSA) und 3.64 min (MeSA). Beide Verbindungen unterscheiden sich jedoch signifikant in ihren Massenspektren (vergl. Abb. 15). Der Basispeak des Methylsalicylats liegt bei 120 amu, während der des tetradeutierten Standards um vier Masseneinheiten höher ist und bei 124 amu liegt. Daher lassen sich die beiden Verbindungen trotz Coelution durch „selected ion monitoring“ sicher trennen. In dem Zeitfenster, in dem die Elution zu erwarten ist (2.5-5.0 min) werden im SIM-MS-Modus also nur die Ionen der Masse 120 amu bzw. 124 amu detektiert. Nach Aufnahme des Chromatogramms kann man dann die Ionenspuren 120 und 124 getrennt darstellen und die korrespondierenden Peakflächen ermitteln (s. Abb. 16).

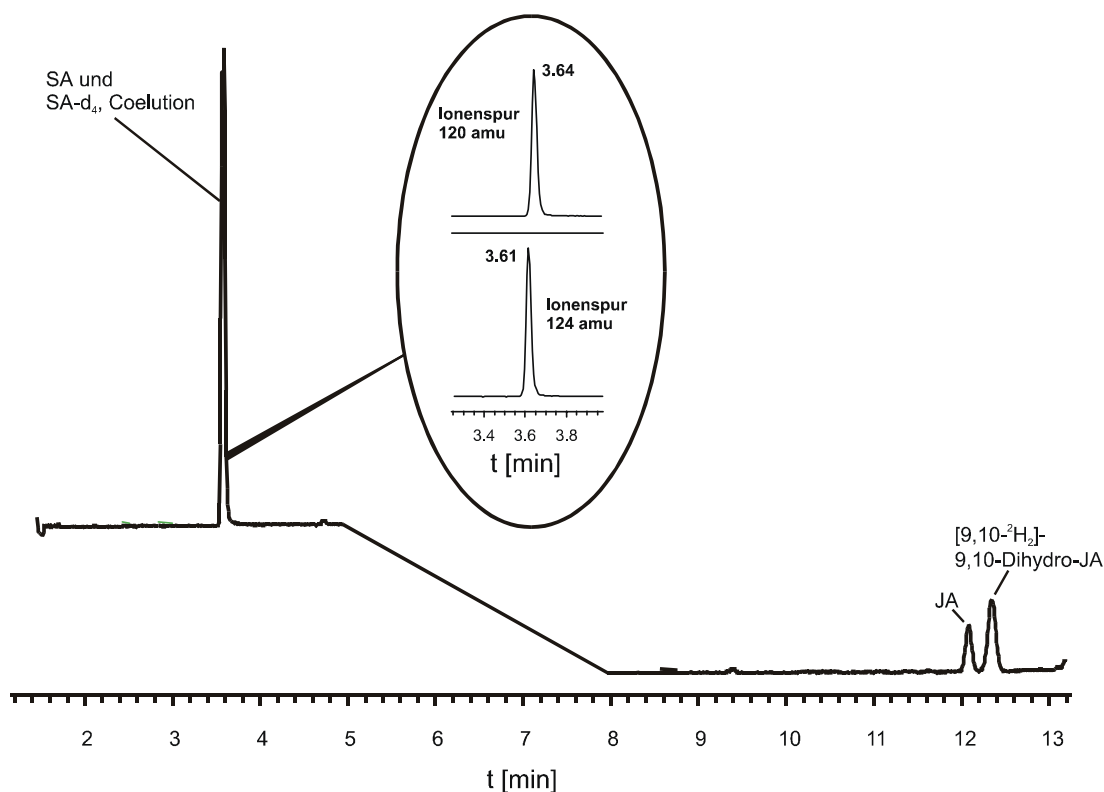


Abb. 16: Chromatogramm eines methylierten Gemisches aus SA (500 ng/50 μ l), SA-d₄ [500 ng/50 μ l], JA (120 ng/50 μ l) und $[9,10\text{-}^2\text{H}_2]$ -9,10-Dihydro-JA (146 ng/50 μ l). SA und SA-d₄ coeluierten, können aber leicht über die Ionenspuren 120 respektive 124 getrennt werden. Im Bereich von 1.5 – 5.0 min werden nur Massen 120 und 124 amu aufgezeichnet. Zwischen 5.0 – 8.0 wird der Detektor ausgeschaltet und ab 8.0 min werden zur JA-Bestimmung Ionen der Masse 83 amu aufgezeichnet.

Die gleichzeitige Detektion zweier Ionen anstelle von nur einem führt nicht zu einem signifikanten Empfindlichkeitsverlust und erlaubt, trotz Coelution beider Verbindungen, die einfache Unterscheidung zwischen Analyt und Standard. Die Zuordnung der entsprechenden Peaks im Chromatogramm erfolgt, wie bereits für JA beschrieben, durch Vergleich mit den Retentionszeiten von Methylsalicylat und Standard in entsprechenden reinen Lösungen der authentischen Substanzen. Zur endgültigen Identifizierung werden wieder hochkonzentrierte Proben aus biologischem Gewebe, die den gesamten Prozess der Probenvorbereitung durchlaufen haben im *full-scan* Modus vermessen und die entsprechenden Massenspektren und Retentionszeiten von Salicylsäure bzw. Standard mit denen authentischer Proben verglichen. Nach der Elution von MeSA und Tetradeutero-MeSA schaltet sich der Massendetektor im weiteren Verlauf des Temperaturprogramms nach 5.00 min zunächst aus, um dann ab RT = 8.00 min Ionen der Masse 83 amu aufzuzeichnen. Dadurch läßt sich in einer Messung auch die in der Probe enthaltene Jasmonsäure bestimmen.

Evaluierung der Salicylatanalytik

Genau wie für die Jasmonsäurequantifizierung wurde auch die Methode der SA-Detektion auf ihre Güte hinsichtlich der tatsächlich wiedergefundenen Substanzmengen überprüft. Aufgrund der zu erwartenden höheren endogenen SA-Konzentrationen im pflanzlichen Gewebe wurden diesmal je sechs Proben mit 300 ng bzw. 900 ng Salicylsäure und der üblichen Menge internem Standard (je 500 ng) versetzt. Diese Proben wurden dann dem gesamten Prozess der Probenvorbereitung und Analytik unterworfen und im Anschluß die Menge an im Mittel wiedergefundener Salicylsäure bestimmt:

- 1) eingesetzt: 300 ng, wiedergefunden: 316 ng \pm 49 ng,
- 2) eingesetzt: 900 ng, wiedergefunden: 890 ng \pm 55 ng,

Diese Ergebnisse dokumentieren die Leistungsstärke und Effizienz sowohl der gewählten Probenvorbereitung als auch der analytischen Methode. Bei beiden Probengruppen liegt die Wiederfindungsrate, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, im Bereich von 100%, was auch die Güte der Eichgerade und mathematischen Auswertung demonstriert.

Auswertung und Statistik der SA-Quantifizierungen

Die Ermittlung des endogenen Salicylatgehaltes aus pflanzlichem Gewebe geschieht durch Vergleich der gemittelten Peakflächenverhältnisse SA/Std mit einer unabhängig davon aufgenommenen Eichgerade. Zur Bestimmung des gemittelten Peakflächenverhältnisses Y teilt man die Fläche des SA-Peaks der Ionenspur 120 amu durch die Fläche des Standardpeaks der Ionenspur 124 und bildet aus allen gleichartigen Messungen ($n \geq 3$ Replika) das arithmetische Mittel. Die universell für alle Proben einsetzbare Eichgerade wird aufgenommen, indem Proben unterschiedlicher bekannter SA-Konzentrationen, die jeweils eine konstante Menge Standard (je 500 ng) enthalten, vermessen werden (3 Replika je Konzentration). Die nach Auftragen der gemittelten Peakflächenverhältnisse gegen die zugegebene SA-Menge erhaltene Eichgerade (s. Abb. 17) geht durch den Koordinatenursprung und gehorcht damit der folgenden Geradengleichung:

$$Y = B X \quad (9)$$

mit $Y =$ gemittelttes Peakflächenverhältnis SA/Std
 $X =$ bei Aufnahme der Eichgeraden definierte
 zugesetzte Menge SA.

$$B \pm \Delta B = 0.00179 \pm 0.000018$$

Der korrespondierende SA-Gehalt eines gemittelten Peakflächenverhältnisses Y aus einer Probengruppe wird gemäß Gleichung (10) berechnet:

$$X = Y / B \quad (10)$$

Der Fehler von X berechnet sich nach Gauß zu:

$$\Delta X = [(\Delta Y/B)^2 + (Y/B^2 * \Delta B)^2]^{1/2} \quad (11)$$

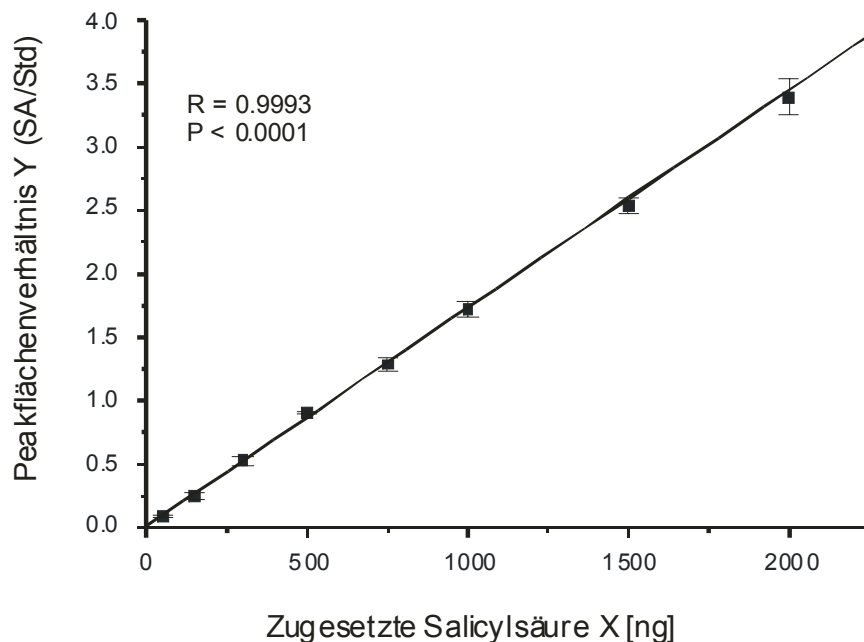


Abb. 17: Über je drei Proben gemittelte Eichgerade zur Ermittlung des Salicylatgehaltes aus dem Peakflächenverhältnis SA/Std.

Zusammenfassung

Die auf den vorangegangenen Seiten vorgestellte Methode zur Analytik der Salicylsäure aus pflanzlichem Gewebe ermöglicht eine einfache und effektive Quantifizierung dieses wichtigen pflanzlichen Signalstoffes und läßt sich darüberhinaus problemlos mit der zuvor etablierten Jasmonat-Analytik kombinieren. Auch Salicylsäure läßt sich nach dem Verfahren der Aminopropyl-Festphasenextraktion zusammen mit Jasmonsäure und beiden deuterierten Standards aus den Gewebeextrakten anreichern. Ohne zusätzlichen Arbeitsaufwand lassen sich so auf der Basis einer schnellen Probenvorbereitung und Analytik nun zwei Phytohormone in „einem Durchgang“ quantifizieren. Es ist nicht nur möglich, beide Analyten aus einer Probe zu bestimmen, sondern es werden vielmehr die endogenen Gehalte beider Verbindungen im Verlauf einer einzigen GC-MS-Messung erhalten. Dadurch kann wertvolle Meßzeit eingespart und der tägliche Probendurchsatz signifikant erhöht werden. Darüberhinaus kommt das Verfahren ohne die sonst übliche Anreicherung der Einzelproben mittels HPLC aus. Durch die dadurch ermöglichte hohe Probenzahl, die pro Tag bearbeitet werden kann, erhält man sehr schnell statistisch abgesicherte Daten mit kurzen Zeitintervallen bei der Aufnahme von Kinetiken.

3.1.4 Analytik der 12-Oxophytodiensäure (12-OPDA)

Bei der Biosynthese der Jasmonsäure aus freigesetzter Linolensäure tritt 12-OPDA als zentrales Intermediat auf (s. Abb. 3). Seit wenigen Jahren mehren sich die Hinweise auf eine eigenständige, JA-unabhängige Signalfunktion der 12-Oxophytodiensäure. So induziert 12-OPDA in *Bryonia dioica* (Zaunrübe) eine deutlich stärkere Rankenspiralisierung als Jasmonsäure und wird daher als maßgeblich an der Transduktion mechanischer Reize höherer Pflanzen angesehen.^[48] Da 12-OPDA nach exogener Applikation möglicherweise schnell in JA umgewandelt wird, ist es allerdings schwierig, eine exakte Entscheidung über die Art des Signals bei einem beobachteten Effekt zu treffen. Übereinstimmung herrscht in der Literatur über die Beobachtungen, daß neben JA nach Verwundung des Pflanzengewebes auch die endogene Konzentration der 12-OPDA ansteigt und daß 12-OPDA in pflanzlichen Geweben zumeist in deutlich höherer Konzentration vorliegt (bis ca. Faktor 10) als JA.^[89] Publierte Verfahren zur Extraktion und Analytik der 12-OPDA nutzen Kombinationen aus Festphasenextraktionen, HPLC und GC-MS.^[100-102] Meist wird zur massenspektrometrischen Detektion der 12-OPDA die chemische Ionisation verwendet, häufig auch nach Derivatisierung mit Pentafluorbenzylbromid im Negativionenmodus.^[89] Für die vorliegende Arbeit war es zur Untersuchung der antagonistischen JA/SA Wechselwirkung essentiell, auch endogene 12-OPDA-Konzentrationen an der Limabohne *Phaseolus lunatus* zu bestimmen. Es zeigte sich, daß die bereits für die Jasmonat- und Salicylatanalytik eingeführte Methodik nicht einfach auf 12-OPDA übertragbar ist. Eine Anreicherung des Analyten über die Aminopropyl-Festphasenextraktionstechnik ist allerdings aufgrund des sauren Charakters der 12-OPDA ebenfalls möglich. Die GC-(EI-SIM)-MS-Analyse stößt jedoch auf Probleme, da eine Vielzahl der ebenfalls in der Pflanze enthaltenen C₁₈-abgeleiteten Oxylipine (vergl. Kapitel 3.4) im gleichen Zeitfenster eluiert und daher selbst im SIM-Modus zu einem deutlich erhöhten Untergrundrauschen beiträgt. Außerdem fragmentiert 12-OPDA unter den verfügbaren Bedingungen der Elektronenstoßionisation sehr stark, so daß sich nur schwer geeignete Peaks für die SIM-Analyse finden lassen. Daher wurde an einem anderen GC-MS-System (Finnigan GCQ) die Analytik der 12-OPDA mit Hilfe der chemischen Ionisation (Reaktandgas: Methanol) versucht. Hier wurden deutlich bessere Ergebnisse erzielt, und es ließ sich das Molekülion der 12-OPDA (-methylester) im SIM-Modus verfolgen. Jedoch war auch hier die Empfindlichkeit für die zu bearbeitende Fragestellung nicht

hinreichend, und es mangelte an ausreichender Meßzeit an diesem häufig genutzten Gerät. Daher wurde unter leichter Abwandlung der Probenvorbereitung und in Zusammenarbeit mit SCHÜLER, eine HPLC-Methode zur Detektion von 12-OPDA aus pflanzlichem Gewebe entwickelt.

Probenvorbereitung zur Detektion von 12-OPDA aus pflanzlichem Gewebe

Im wesentlichen kommt die für die Anreicherung von Jasmonsäure und Salicylsäure etablierte Methodik zum Einsatz. Die Evaporation des zur Extraktion verwendeten Acetons über Nacht führt jedoch zur weitgehenden Zersetzung des chemisch relativ unbeständigen Analyten. Daher werden die nach Schockgefrieren unter flüssigem Stickstoff erhaltenen Gewebepulver direkt mit Diethylether extrahiert und diese Extrakte dann auf die Festphasenextraktionskartuschen geladen. Nach Elution von der Kartusche und Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand ohne Veresterung in Methanol aufgenommen und direkt per HPLC analysiert.

Analytik der 12-Oxophytodiensäure per RP-HPLC

Die aus der Probenvorbereitung erhaltenen methanolischen Lösungen werden per reversed-phase HPLC mit UV-Detektion bei 221 nm analysiert. Als Trennsäule kommt eine C18-Nucleosil (RP-18) – Säule der Firma Macherey-Nagel (Düren) zum Einsatz. Als mobile Phase wird ein binärer Gradient aus Wasser und Acetonitril unter Zusatz von einigen Promille Trifluoressigsäure verwendet. Zu Beginn der Messung enthält die mobile Phase 40% Acetonitril, dessen Anteil im Verlauf von 5 min auf 50 % ansteigt, um dann während weiteren 15 min 60 % zu erreichen. Die Retentionszeit der 12-OPDA liegt unter diesen Bedingungen bei $RT = 17.64$ min. Die Überprüfung der Identität der

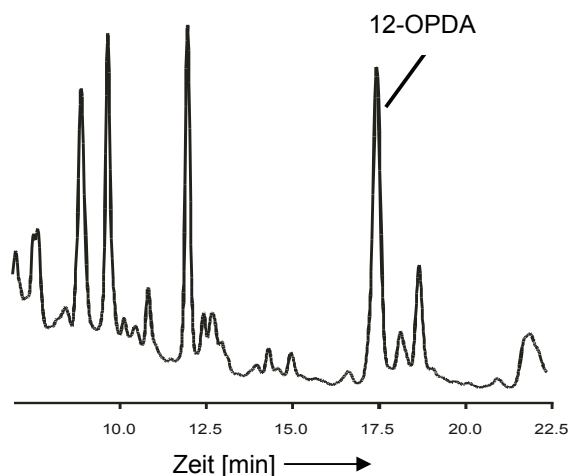


Abb. 18: Chromatografisches Profil einer biologischen Probe zur Bestimmung von 12-OPDA aus Blattgewebe der Limabohne. Unter den gewählten HPLC-Bedingungen (vergl. Kap. 5.6) eluiert der Analyt bei $RT = 17.64$ min und zeigt bei UV-Detektion (221 nm) einen deutlichen Peak.

Verbindung erfolgt über den Vergleich von Retentionszeit und UV-VIS-Spektrum mit der authentischen Substanz. In den unter diesen Bedingungen aufgenommenen Chromatogrammen (s. Abb. 18) stellt der Analytpeak einen der Hauptpeaks dar. Daher ist eine Gehaltsbestimmung über dessen Peakfläche problemlos möglich.

Auswertung und Statistik der 12-OPDA-Quantifizierungen

Zur Gehaltsbestimmung werden die entsprechenden 12-OPDA-Peakflächen ermittelt und mit einer zuvor aufgenommenen Eichgerade verglichen. Die Eichgerade wird erhalten, indem 12 Proben bekannter Konzentration an 12-OPDA unter den gleichen o.g. Bedingungen vermessen werden. Die erhaltenen gemittelten Peakflächen der 12 Einzelwerte werden gegen die jeweiligen zugesetzten Mengen 12-OPDA aufgetragen. Mit Hilfe einer Linearen Regression durch den Nullpunkt ergibt sich eine Gerade:

$$Y = B X \quad (12)$$

mit $Y =$ Peakfläche 12-OPDA
 $X =$ bei Aufnahme der Eichgeraden definierte
 zugesetzte Menge 12-OPDA.
 $B \pm \Delta B = 0.01071 \pm 0.00027$

Da von den nach der Probenvorbereitung anfallenden 100 μl methanolischer Lösung nur jeweils 60 μl in das HPLC-System eingegeben werden, muß jeder erhaltene Wert für die Peakfläche des 12-OPDA-Peaks noch mit dem konstanten Faktor 1.667 multipliziert werden, bevor dann die einzelnen Replika einer Messreihe zu einer resultierenden mittleren Peakfläche vereinigt werden. Der korrespondierende 12-OPDA-Gehalt einer so erhaltenen gemittelten Peakfläche Y aus einer Probengruppe wird gemäß Gleichung (13) erhalten:

$$X = Y / B \quad (13)$$

Der Fehler von X berechnet sich nach Gauß zu:

$$\Delta X = [(\Delta Y/B)^2 + (Y/B^2 * \Delta B)^2]^{1/2} \quad (14)$$

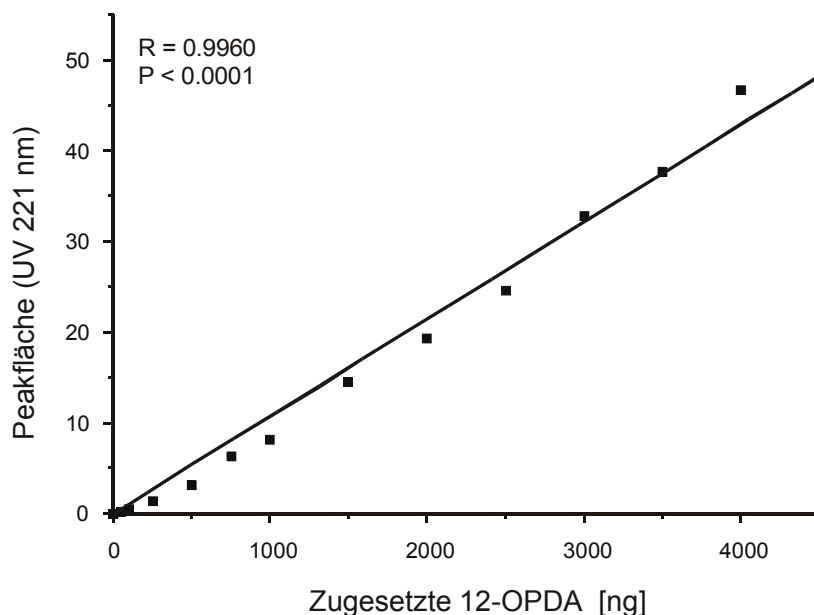


Abb. 19: Eichgerade zur Ermittlung des Gehaltes an 12-Oxophytodiensäure aus biologischen Proben.

Zusammenfassung

In Zusammenarbeit mit SCHÜLER konnte ein Verfahren etabliert werden, daß es gestattet, 12-Oxophytodiensäure aus pflanzlichen Geweben zu isolieren und zu quantifizieren. Wegen der höheren Sensitivität der 12-OPDA kommt dabei eine im Vergleich zur JA und SA-Analytik zeitlich verkürzte Probenvorbereitung zum Einsatz. Dies erlaubt die Durchführung der Inkubationsexperimente, Probenvorbereitungen und Analytik an nur einem Tag. Die Analyse der erhaltenen Proben geschieht via RP-HPLC mit UV-Detektion. Durch die sehr gute Anreicherung des Analyten hat sich die Quantifizierung über die Peakflächen (UV-Spur 221 nm) bewährt. Dennoch ist, bedingt durch das Fehlen eines internen Standards in diesem Fall die Güte der Methode geringer als bei den im Vorangegangenen besprochenen Bestimmungen von Jasmonsäure und Salicylsäure. Für die Beantwortung der Fragestellung (vergl. Kapitel 3.3) hat sich die erreichte Genauigkeit aber als absolut ausreichend erwiesen.

3.1.5 Analytik der Abscisinsäure (ABA)

Auch der Abscisinsäure kommt eine bedeutende Funktion als regulatorisches Element vieler pflanzenphysiologischer Prozesse zu.^[103] Erhöhte ABA-Gehalte (400-500 µg/kg) werden vor allem als Antwort auf abiotische Stressfaktoren (Trockenstress, Kälte oder Hitze) beobachtet.^[28] In Dürreperioden verhindert ABA durch Schließung der Stomata einen raschen Turgorverlust. Dabei bewirkt ein erhöhter ABA-Spiegel die Änderung von Ionenflüssen in den Schließzellen.^[104] Die Biosynthese der Abscisinsäure kann über zwei unterschiedliche Wege verlaufen. Die Sesquiterpen-abgeleitete Verbindung kann entweder direkt aus Mevalonatvorstufen gebildet werden oder entstammt dem Carotinoidstoffwechsel.^[57] In letzterem Fall entsteht ABA durch Spaltung des Carotinoids Violaxanthin, wobei Xanthoxin als Intermediat auftritt. Auch letzterem werden Funktionen als Phytohormon zugeschrieben.^[28] Die Rolle der Abscisinsäure bei der pflanzlichen Verteidigung gegen Pathogene und Herbivore ist noch weitgehend ungeklärt. Häufig wird jedoch über einen Synergismus zwischen ABA und JA berichtet.^[40] Da auch ABA eine saure Carboxylfunktion enthält, sollte sie sich, genau wie bereits für JA, SA und 12-OPDA beschrieben, über die Aminopropyl-Festphasenextraktion anreichern lassen. Vorversuche zeigen klar die Anwendbarkeit dieses Ansatzes. Wird eine etherische Lösung, die 1000 ng ABA enthält, über eine Aminopropyl-SPE-Kartusche gegeben, so lassen sich nach weiterer Aufarbeitung, wie für JA und SA beschrieben, signifikante Mengen des Analyten im Eluat nachweisen. Die Analytik erfolgt per GC-(SIM)-MS, wobei nur Ionen der Masse 190 amu (=Basispeak im ABA-Massenspektrum) registriert werden (s. Abb. 20). Als interner Standard wird das

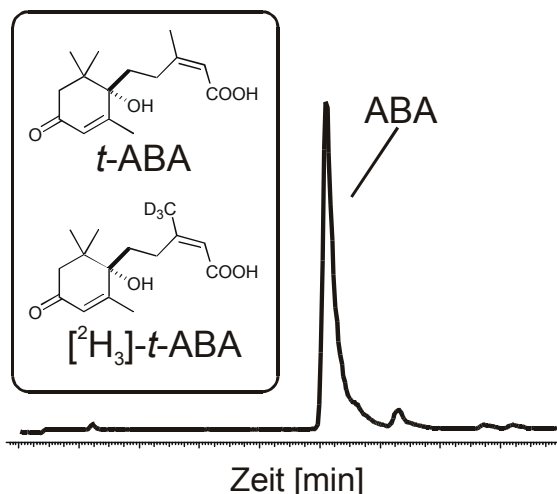


Abb. 20: Strukturen der *trans*-Abscisinsäure und der als interner Standard verwendbaren 3-Methyl- [²H₃]-*t*-ABA, sowie GC/SIM-MS - Chromatogramm einer durch Aufarbeitung von 1000 ng ABA erhaltenen Probe. Durchlauf und Waschlösung der Kartusche enthalten keine nachweisbaren Mengen des Analyten.

von R LAUCHLI synthetisierte trideuterierte ABA-Derivat 3-Methyl-[²H₃]-*t*-Abscisinsäure verwendet.^[82] Diese Verbindung zeigt die gleiche Retentionszeit wie natürliche ABA, weist jedoch in ihrem Massenspektrum einen Basispeak der Masse 193 amu auf. Die Quantifizierung kann also durch simultane Registrierung von Ionen der Massen 190 und 193 amu auf gleiche Weise wie für SA beschrieben erfolgen. Für die nahe Zukunft ist die Aufnahme einer Eichgeraden und die vollständige Etablierung der ABA-Analytik aus pflanzlichen Geweben geplant. Es können dann drei pflanzliche Signalstoffe (JA, SA und ABA) aus einer Probe und eventuell in einer GC-(SIM)-MS-Messung bestimmt werden.

3.1.6 Analytik der 1-Oxoindan-4-carbonsäure (In)

Konjugate der 1-Oxoindan-4-carbonsäure mit verschiedenen Aminosäuren haben sich als potente Induktoren der pflanzlichen Duftproduktion erwiesen.^[105] Das speziell durch das Isoleucin-Konjugat der 1-Oxoindan-4-carbonsäure (In-Ile) bei der Limabohne *P. lunatus* induzierte Duftprofil ist identisch zu dem durch exogene Applikation von Jasmonsäure hervorgerufenen.^[105] Wenn In-Ile und JA mit den gleichen makromolekularen Strukturen interagieren, sollte es eventuell möglich sein, durch Inkubation mit radioaktiv markiertem In-Ile, den entsprechenden Jasmonat-Rezeptor seinerseits zu markieren und zu isolieren. Die einfachste Möglichkeit, ein radioaktiv markiertes In-Ile zu erhalten, ist die synthetische Verknüpfung von 1-Oxoindan-4-carbonsäure mit kommerziell erhältlichem radioaktiv markiertem Isoleucin. Dieser Problematik ging SCHÜLER in seiner Dissertation u.a. nach.^[106] Der gewählte Ansatz, kann aber nur dann zum Erfolg führen, wenn die Bindung zwischen der radioaktiv markierten Aminosäure und der Indanoncarbonsäure unter physiologischen Bedingungen wenigstens über einen gewissen Zeitraum hydrolysestabil ist. Anderenfalls wird das applizierte In-Ile direkt hydrolytisch gespalten und die in der Aminosäure enthaltene Radioaktivität über das gesamte Gewebe verschmiert. Es war also in Zusammenarbeit mit SCHÜLER die analytische Fragestellung zu klären, ob und wann nach exogener Applikation von In-Ile im Gewebe der Limabohne freie Indanoncarbonsäure nachweisbar ist.

Probenvorbereitung zur Analytik der 1-Oxoindan-4-carbonsäure (In)

In diesem Fall ist die gleiche Probenvorbereitung anwendbar wie bereits für die Analytik der 12-OPDA beschrieben. Pflanzen werden nach Inkubation mit In-Ile (1mM in Wasser)

schockgefroren und das Gewebepulver dann mit Ether extrahiert. Auch die In kann dann mit Hilfe der Aminopropyl-Festphasenextraktion angereichert werden. Nach Derivatisierung mit Diazomethan werden die erhaltenen Proben per GC-(SIM)-MS vermessen. Die Durchführung dieser Probenvorbereitung mit authentischer Indanoncarbonsäure demonstriert die Leistungsfähigkeit der Methode.

Bestimmung der 1-Oxoindan-4-carbonsäure (In) mittels GC-(SIM)-MS

1-Oxoindan-4-carbonsäure-methylester weist einen Hauptpeak von 190 amu in seinem Massenspektrum auf. Daher werden die Chromatogramme im SIM-Modus aufgenommen und über die gesamte Meßdauer nur Ionen der Masse 190 amu detektiert. Die Retentionszeit des Analyten beträgt unter den gewählten Bedingungen $RT = 11.67$ min (Abb. 21).

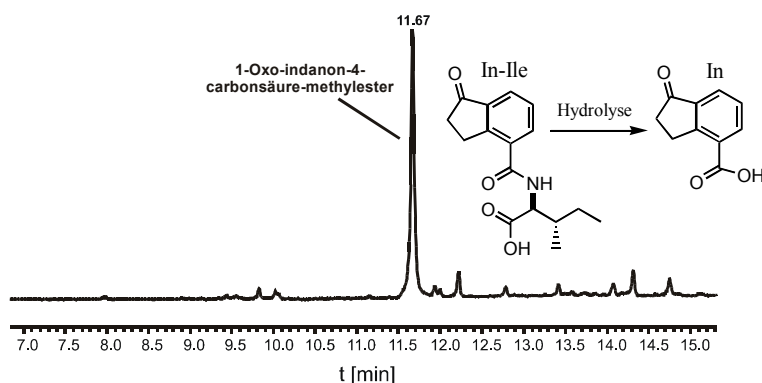


Abb. 21:

Indanoncarbonsäure ist in Chromatogrammen deutlich nachweisbar. Hier eine biologische Probe nach 2 h Inkubation mit In-Ile.

Zur Evaluierung der Methode wurden biologische Proben, die den gesamten Prozess der Probenvorbereitung durchlaufen haben und denen zuvor einige μg In zugesetzt wurden, im *full-scan* Modus vermessen, was Identität und Retentionszeit des gesuchten Analyten bestätigt. Als Resultat der gegebenen Fragestellung zeigte sich klar, daß bereits nach 60 min Inkubationsdauer das applizierte In-Ile in signifikanten Größenordnungen hydrolysiert wird. In allen Proben, die länger als 60 min mit In-Ile behandelt wurden, konnten deutliche, von 1-Oxoindan-4-carbonsäure-methylester herrührende Peaks nachgewiesen werden. Proben korrespondierender Kontrollpflanzen ohne Inkubation mit In-Ile zeigten diesen Peak nicht.

3.2 Ionenkanalbildende Peptide sind potente Induktoren der pflanzlichen Duftproduktion

Ein Befall durch Mikroorganismen oder herbivore Insekten löst bei Pflanzen charakteristische lokale und/oder systemische Abwehrreaktionen aus. Dazu zählt die *de novo* Biosynthese von Duftstoffen, die als Kairomone für Wechselwirkungen mit anderen Organismen über weite Distanzen dienen können.^[107, 108] Abgesehen vom rein mechanischen Schaden kommt vor allem den nieder- und hochmolekularen Komponenten, die der attackierende Organismus in das Pflanzengewebe einbringt, Bedeutung als Elicitoren von Abwehrreaktionen zu. Einige der Elicitoren vermögen direkt oder rezeptorvermittelt die Ionenpermeabilität der Plasmamembran zu verändern und lösen dadurch ein komplexes Netzwerk intrazellulärer Folgereaktionen aus.^[109] Die außerordentliche Bedeutung von Ionenkanälen für Elicitor-induzierte Abwehrreaktionen wurde bereits für einen Oligopeptidelicitor an Zellkulturen der Petersilie demonstriert.^[110] Ebenso induzieren Oligogalakturonide über Ionenkanäle die Biosynthese von Phytoalexinen in Tabakzellkulturen^[111], und kürzlich wurde für einige Proteinelicitoren an artifiziellen Lipidmembranen ihre Fähigkeit zur Kanalbildung nachgewiesen.^[112]

Neben makromolekularen Kanalbildnern sind auch niedermolekulare, peptidische Antibiotika mit ausgeprägt membrandepolarisierenden Eigenschaften bekannt.^[113] Ein charakteristischer Vertreter dieser Verbindungsklasse der Peptaibole ist das aus dem phytopathogenen Pilz *Trichoderma viride* isolierbare Alamethicin (ALA). Es wird als komplexe Mischung homologer Peptaibole produziert und ist als solche kommerziell erhältlich. ALA besitzt, genau wie die übrigen überwiegend aus Pilzen stammenden Peptaibole einen *N*-acylierten Terminus, enthält mehrere α -Aminoisobuttersäure-Bausteine (Aib) und einen zum α -Aminoalkohol reduzierten *C*-Terminus. Die aus 20 Aminosäuren bestehende Struktur des Alamethicin F ist in Abb. 22 dargestellt.

Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol

Abb. 22: Aminosäuresequenz des Alamethicin F. ALA bildet in (Bio)membranen als Oktamer spannungsabhängige Kanäle mit hoher Leitfähigkeit; Aib= α -Aminoisobuttersäure, Pheol=Phenylalaninol.^[113, 114]

Die antibiotische Wirkung des Alamethicins und anderer Vertreter dieser Substanzklasse beruht auf ihrer Fähigkeit, α -helicale Strukturen auszubilden, die sich in biologischen Membranen als Oligomere zu spannungs(un)abhängigen Kanälen, beziehungsweise Poren zu aggregieren vermögen.^[113, 114]

Die Tatsache, daß die Induktion von pflanzlichen Abwehrreaktionen, wie zuvor erwähnt, an Ionenflüsse und Membranpotentiale gekoppelt sein kann^[109, 110], veranlasste J ENGELBERTH neben anderen Verbindungen ähnlicher Aktivität speziell das Alamethicin auf seinen möglichen Einfluss auf den pflanzlichen Sekundärstoffwechsel zu untersuchen. Es zeigte sich, daß ALA und verwandte Peptaibole in der Tat hochwirksame Elicitoren mit Wirkung auf unterschiedliche Stoffwechselwege darstellen. Wird ein frisch geschnittener Trieb der Limabohne (*Phaseolus lunatus*) als Modellsystem in eine wässrige Lösung mit ALA (5 μ M) eingestellt, so zeigt die Überwachung der Gasphase durch Absorption flüchtiger Komponenten an Aktivkohle in einem geschlossenen System, gefolgt von Desorption und massenspektrometrischer Analyse deutlich, daß durch ALA die Biosynthese bestimmter terpenoider und aromatischer Komponenten angeregt wird. So zeigt das Gaschromatogramm (Abb.23) neben DMNT und Methylsalicylat (MeSA) die Bildung von TMTT als Hauptkomponente an.

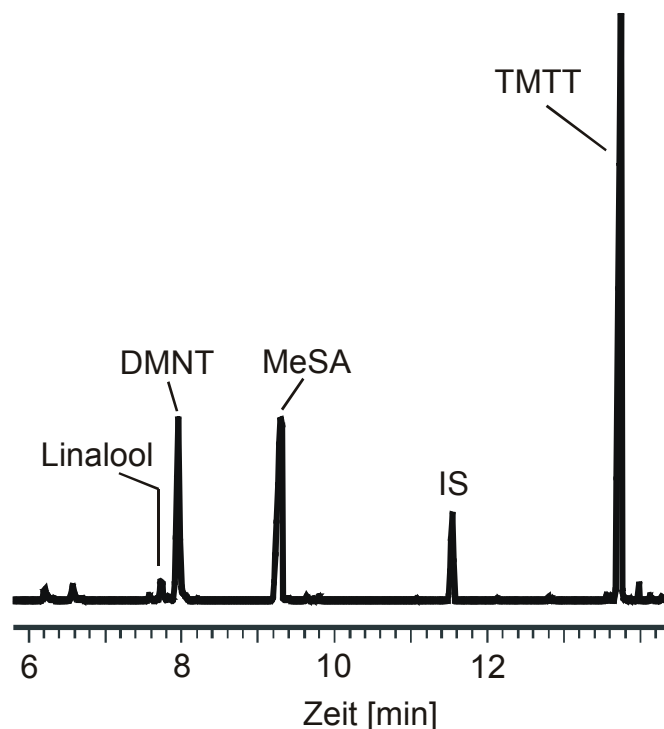


Abb. 23: Gaschromatographisches Profil der nach Induktion mit Alamethicin von Limabohnen abgegebenen flüchtigen Verbindungen. Im Gegensatz zur Induktion mit JA oder Herbivorie werden hier im Wesentlichen nur drei Verbindungen induziert. Es handelt sich um i) 4,8-Dimethylnona-1,3,7-trien (DMNT), ii) Methylsalicylat (MeSA) und iii) 4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen (TMTT); IS = Interner Standard, n-Bromdecan.

Das durch ALA induzierte Duftprofil, welches im Wesentlichen exklusiv aus den drei genannten Verbindungen besteht, unterscheidet sich deutlich von entsprechenden Duftstoffemissionen, die infolge von Jasmonatbehandlung oder Herbivorie bei der Limabohne zu beobachten sind. In diesen Fällen beobachtet man die Emission weitaus komplexerer Bouquets mit 30 und mehr Verbindungen. Interessant ist, daß TMTT nach JA-Induktion nicht auftritt, während infolge Herbivorie alle ALA-responsiven flüchtigen Verbindungen zumindest als NebenkompONENTEN im ansonsten komplexen Duftstoffgemisch vertreten sind. Ein dem ALA-induzierten vergleichbares Duftprofil wird auch nach Behandlung der Limabohne mit sog. frühen Octadecanoiden, wie Linolensäure und anderen Linolensäure-abgeleiteten Oxylipinen, sowie nach Inkubation mit Schwermetalllösungen^[106] beobachtet. Zur ausführlicheren Diskussion dieser differentiellen Duftinduktion bei der Limabohne vergl. Kapitel 3.6.2. Die ALA-induzierte Emission flüchtiger Verbindungen ist konzentrationsabhängig und endet bei einer Grenzkonzentration von 0.5 µM.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Teil der Grundlagen zum besseren Verständnis der durch die Alamethicin-induzierten Membrandepolarisation hervorgerufenen intrazellulären Signaltransduktion gelegt werden. Allgemein gehen bei Pflanzen Veränderungen im Sekundärmetabolismus (An- und Abschaltung von Biosynthesewegen) häufig mit Veränderungen des Hormonhaushalts einher. Dabei kann es bei der Signaltransduktion nur zu reinen Konzentrationsveränderungen einzelner Phytohormone kommen. Jedoch sind auch antagonistische und synergistische Wechselwirkungen zwischen den einzelnen hormonellen Signalschienen zu beobachten. Wie bereits durch Untersuchungen am ebenfalls aus *T. viride* stammenden hochmolekularen Elicitor Cellulysin bekannt^[115] kommt es hier nach der Reizerkennung zu einem schnellen und transienten Anstieg der endogenen Jasmonatkonzentration, in deren Folge die Genexpression zur Biosynthese flüchtiger Sekundärmetaboliten einsetzt. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse und der Präsenz von JA-induzierbaren Terpenen und Methylsalicylat in der Gasphase wurde deshalb in ALA-induzierten Pflanzen der Gehalt von endogener JA und SA zeitabhängig quantifiziert. Wie in Abb. 24 dargestellt, wurde in der Tat die Biosynthese beider Phytohormone stimuliert.

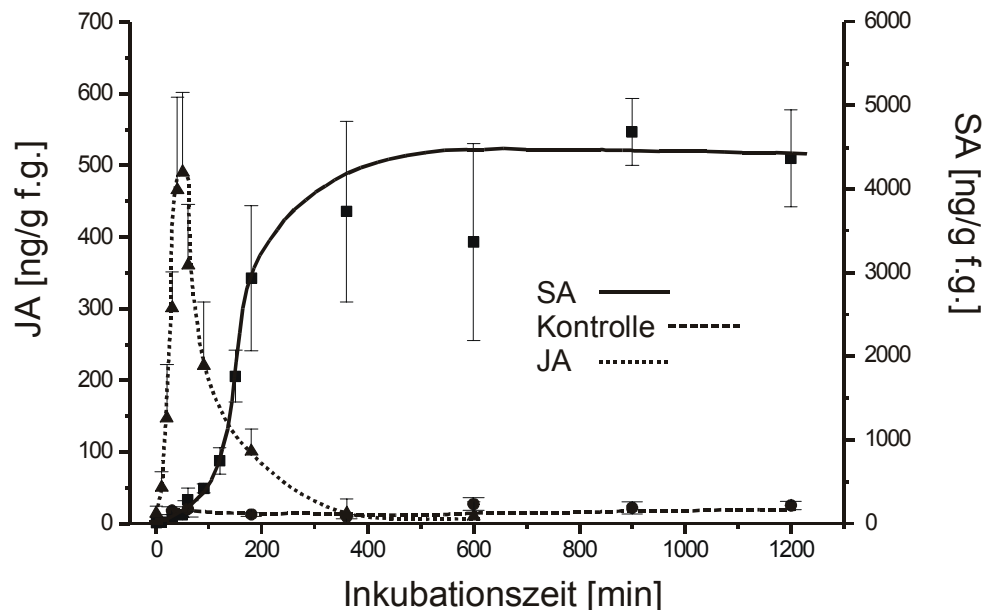


Abb. 24: Quantifizierung und Zeitverlauf endogener Jasmonsäure und Salicylsäure nach Behandlung von Limabohnenblättern mit Alamethicin. Die eingezeichnete Kontrolle bezieht sich auf Salicylsäure. Zur JA-Kontrolle vergl. Abb. 5.

Die Konzentration endogener Jasmonsäure zeigt einen charakteristischen transienten Anstieg innerhalb der ersten 50 min (20-facher Anstieg), der praktisch identisch zur Reaktion der Limabohne auf Inkubation mit der Elicitorpräparation Cellulysin ist (vergl. Kap.1.3). Nach Erreichen ihres Maximums von ca. 450 ng/g Frischgewicht sinkt die JA-Konzentration stetig, um nach ca. sechs Stunden wieder den Level von nichtinduzierten Kontrollpflanzen zu erreichen. Im Verlauf des Absinkens der JA-Konzentration beginnt ca. 2 h nach Inkubationsstart der endogene Salicylatgehalt massiv anzusteigen, um nach ca. sechs Stunden ein Plateau zu erreichen, das bei einer SA-Konzentration von ca. 4.5 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht einem 90-fachen Anstieg gegenüber nichtinkubierten Kontrollpflanzen entspricht. Diese nur mit Leitungswasser behandelten Kontrollpflanzen produzierten erwartungsgemäß weder Duftstoffe, noch zeigten sie einen vergleichbaren Anstieg der beiden Phytohormone JA und SA. Die zeitliche Kinetik der Emission von flüchtigem Methylsalicylat und die der endogenen Akkumulation von Salicylsäure entsprechen einander. Daher ist anzunehmen, daß die *de novo* synthetisierte SA wenigstens teilweise methyliert und über die Gasphase abgegeben wird.

Werden Blätter der Limabohne 24 h vor der ALA-Induktion mit Inhibitoren des zur Jasmonsäure führenden Oktadecanoid-Signalwegs vorbehandelt (Phenidon^[116], Aristolochiasäure^[117]), unterbleibt die Biosynthese von Duftstoffen. Umgeht man den

Block der Inhibitoren durch exogene Zugabe von JA, so wird wieder das übliche JA-responsive Duftmuster erhalten. Zusammen mit der infolge ALA deutlich erhöhten endogenen Jasmonatkonzentration demonstriert diese Beobachtung die Beteiligung des Octadecanoid-Signalwegs bei der Alamethicin-induzierten Duftstoffbiosynthese eindrucksvoll.

Seit einiger Zeit ist bekannt, daß eine erhöhte endogene Salicylatkonzentration oder die Freisetzung von Methylsalicylat^[27] bei Pflanzen häufig die Folge einer Pathogeninfektion ist und im weiteren Verlauf zu einer systemischen Resistenz der Pflanze (SAR von *systemic acquired resistance*) gegenüber weiterem Pathogenbefall führen kann. Die massiv erhöhten SA-Konzentrationen, die nach Alamethicingabe im Blattgewebe vorliegen, deuten zusammen mit der Tatsache, daß ALA von einem phytopathogenen Pilz stammt, stark darauf hin, daß Alamethicin als Induktor der systemischen Resistenz bei Pflanzen wirkt. In einer Kooperation zwischen J ENGELBERTH und T JABS von der Landwirtschaftlichen Versuchsstation Limburgerhof der BASF AG konnten experimentelle Belege für diese Vermutung gefunden werden. So wird die Infektionsrate von *Colletotrichum lagenarium* (phytopathogener Pilz) auf Gurkenpflanzen durch 10 ppm Alamethicin auf nur noch 7 % gesenkt. Im Fall von *Uromyces phaseoli* (Bohnenrost) auf Bohnen haben 100 ppm ALA den gleichen Effekt. Alamethicin kann also tatsächlich als potenter SAR-Induktor angesehen werden. Wie J ENGELBERTH weiterhin fand, bewirkt Alamethicin neben der Induktion flüchtiger Verbindungen auch die Spiralisierung von Ranken, induziert also die Mechanotransduktion.^[48]

Ein neben JA und SA weiteres wichtiges Phytohormon ist das Ethen (Ethylen). Als in die Gasphase abgegebener Signalstoff bewirkt es die Reifung von Früchten und wird als Signalsubstanz zur interpflanzlichen Kommunikation diskutiert^[23] (vergl. Kap.1.3 und 3.6.6). In Kooperation mit F KÜHNEMANN vom Institut für Angewandte Physik der Universität Bonn wurde mit Hilfe der nichtinvasiven Photoakustikspektroskopie^[79] (Kap. 3.6.6) der Verlauf der Ethylenproduktion von Limabohnen nach Gabe von Alamethicin bestimmt (vergl. Abb. 25).

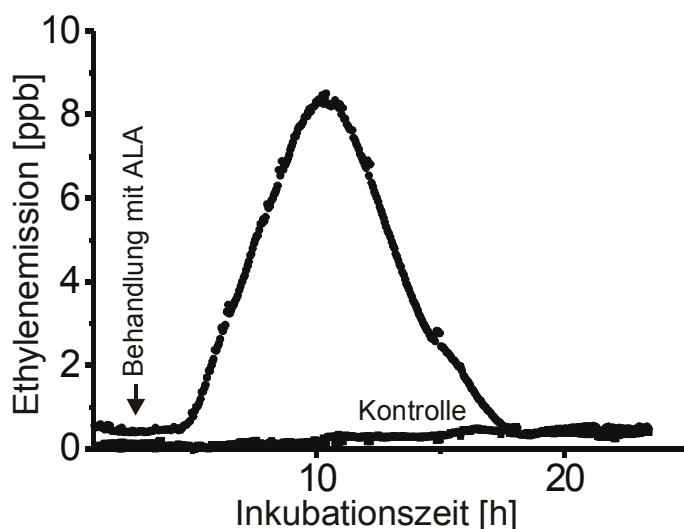


Abb. 25: Ethylenemission nach Applikation von Alamethicin (10 µg/ml) an Blätter der Limabohne (*P. lunatus*). Die Ethylenabgabe wurde in einer kontinuierlichen Durchflußzelle mittels Photoakustikspektroskopie^[13] bestimmt.

Die Messung ergab, daß bereits nach ca. drei Stunden eine deutliche Emission von Ethylen einsetzt. Sie erreicht nach 7.5 h ihr Maximum und klingt im Verlauf von weiteren fünf Stunden wieder ab. Die Kinetik entspricht der bereits früher beschriebenen Ethylenemission aus Blättern von *P. lunatus* nach Behandlung mit dem Proteinelicitor Cellulysin^[55] oder der Jasmonsäure (JA)^[51].

Die Elicitoraktivität des Alamethicins ist nicht auf die Limabohne beschränkt, sondern wurde auch bei anderen Pflanzen gefunden. Der phylogenetisch alte Wurmfarne (*Dryopteris filix-mas*) reagiert mit sehr ausgeprägter Emission einer komplexen Mischung von Sesquiterpenen. Terpenoide Verbindungen dominieren auch im Duftmuster ALA-induzierter Mungbohnen (*Vigna radiata*), in der Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) oder im Mais (*Zea mays*). Die Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) produziert ein der Limabohne vergleichbares Substanzprofil; Sojabohne (*Glycine max*) und Gartenerbse (*Pisum sativum*) lassen keine signifikante Duftproduktion erkennen.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß das aus 20 Aminosäuren bestehende Peptaibol Alamethicin ein neuartiger Elicitor pflanzlicher Sekundärreaktionen ist. Der Ionenkanalbildner induziert deutlich die Duftstoffbiosynthese und die Rankenkrümmung in höheren Pflanzen. Dabei werden wenigstens drei intrazelluläre Signalwege, die zur Synthese von i) JA, ii) SA und iii) Ethylen führen, angesprochen. Darüberhinaus bewirkt Alamethicin über eine SA-vermittelte SAR-Induktion eine erhöhte Resistenz von Pflanzen gegen Pathogene.

Neben ALA sind weitere Peptaibole und Peptide mit membrandepolarisierenden Eigenschaften bekannt. Um zu prüfen, ob die beobachteten Effekte tatsächlich auf Membrandepolarisierung durch Porenbildung zurückzuführen sind, wurden von J ENGELBERTH neben ALA deshalb weitere Porenbildner getestet. Alle untersuchten Peptaibole, Ampullosporin A^[118], Bergofungine^[119] und Chrysospermin A^[120] wirken stimulierend. Unabhängig von der Aminosäuresequenz der Testsubstanz wird von Blättern der Limabohne stets dasselbe ungewöhnliche Duftmuster freigesetzt, so daß auf Membrandepolarisierung als ein gemeinsames Wirkprinzip geschlossen werden kann. Kanalbildner wie Alamethicin sollten sich daher besonders gut als Modellverbindungen zur zukünftigen Simulation und Analyse der frühen Wechselwirkungen zwischen Pflanze und Schadorganismus unter kontrollierten Bedingungen eignen.

3.3 Interaktionen zwischen Jasmonat und Salicylatsignalwegen in der Limabohne *Phaseolus lunatus* („JA/SA-Cross-Talk“)

Pflanzen sind in der Lage, hochgradig differenziert auf biotische und abiotische äußere Einflüsse zu reagieren. So können sie sehr empfindlich zwischen einer Pathogeninfektion und einem Befall durch herbivore Insekten unterscheiden.^[70] Zum Teil sind sie sogar zur differentiellen Antwort auf verschiedene attackierende Spezies fähig. Dies ist nicht in Einklang zu bringen mit einer einfachen unverschalteten hormonellen Signaltransduktion, die sich auf weniger als zehn Signalsubstanzen stützt. Es ist daher ein komplexes Netzwerk von Interaktionen zwischen allen an Abwehrreaktionen beteiligten Phytohormon-Signalschienen anzunehmen, das nach Verarbeitung aller äußeren Reize über ein resultierendes integriertes Signal die differenzierte Reaktion initiiert. Es ist literaturbekannt, daß sich das hormonelle Geschehen bei einer Pathogeninfektion deutlich von dem unterscheidet, welches infolge Herbivorie zu beobachten ist.^[121] Im Fall von Herbivorie erfolgt eine größtenteils Jasmonat-vermittelte sog. „Wundantwort“, während Pathogenbefall zu einer SA-induzierten Induktion systemischer Resistenz führt (vergl. Kap.1.3). Dabei wird von mehreren Autoren berichtet, daß das freigesetzte Salicylat über eine Inhibition des Octadecanoidweges die Biosynthese der Jasmonsäure und damit die Wundantwort unterbindet.^[40] Durch diese antagonistische SA→JA-Wechselwirkung kann die Differenzierung zwischen Pathogenbefall und Herbivorie

verstanden werden. Über die Art und Weise und vor allem über den Ort der Inhibition im Octadecanoidweg herrscht in der Literatur allerdings keine Übereinstimmung. PEÑA-CORTES et al. (1993) postulieren eine Interaktion im Bereich der frühen Schritte des Signalweges (vor der zentralen 12-OPDA)^[122], während WEILER et al. (1998) Hinweise für eine Inhibition des im Verlauf des Octadecanoidweges erfolgenden Exports der plastidär gebildeten 12-OPDA ins Cytosol anführen^[123]. Auf diese Weise würde 12-OPDA, nicht aber JA gebildet. Es existieren auch Studien, die von einer SA-Inhibition der durch JA initiierten Genexpression ausgehen, d.h. die Inhibition liegt der JA nachgeschaltet.^[124]

Alamethicin aktiviert sowohl die Jasmonat- als auch die Salicylatbiosynthese, allerdings mit deutlich unterschiedlicher Zeitkinetik (vergl. Abb. 24). Es eignet sich eventuell als Werkzeug, um die Art der Wechselwirkung zwischen den beiden Signalwegen besser zu verstehen. Nach Inkubation von Limabohnen mit ALA beobachtet man ein Duftprofil, das sich praktisch aus nur drei Verbindungen zusammensetzt (s. Abb. 23) und sich deutlich von einem JA-induzierten Bouquet unterscheidet (vergl Kapitel 3.6.2). Die zumindest zu Beginn der ALA-Induktion gebildeten großen Mengen Jasmonsäure führen augenscheinlich nicht zu einer entsprechenden Duftinduktion. Man beobachtet ein Duftprofil, das dem nach Induktion mit Linolensäure und anderen frühen Oxylipinen ähnelt (vergl. Kap. 3.4). Es ist also möglich, daß die zur Induktion eines JA-responsiven Duftgemisches im weiteren Verlauf der Inkubation nötige JA-Biosynthese durch die nach zwei Stunden beginnende Bildung großer Mengen endogener Salicylsäure inhibiert wird. Um diese Hypothese zu untermauern, wurden zunächst Vorversuche mit dem gut charakterisierten Proteinelicitor Cellulysin unternommen. Cellulysin induziert ein Gemisch flüchtiger Verbindungen, das völlig dem JA-responsiven Bouquet entspricht.^[55] Desweiteren führt eine Vorbehandlung von Limabohnen mit bekannten Inhibitoren des Octadecanoidweges wie z.B. Phenidon^[116] (Inhibitor der Lipoxigenase) zu einem vollständigen Verlust der Induktionskapazität des Cellulysins. Eine Signaltransduktion über den Oktadecanoidweg gilt daher im Fall des Cellulysins als gesichert.

Um den Einfluß von Salicylsäure auf die Induktion der Duftstoffbiosynthese zu testen, wurden frisch geschnittene Limabohnenpflanzen 13 h mit 0.5 mM wässriger Salicylatlösung vorinkubiert und anschließend mit Cellulysin induziert. Es zeigte sich eine etwa 40%ige Reduktion der Menge an freigesetzten flüchtigen Verbindungen im Vergleich zu salicylat-unbehandelten Kontrollpflanzen, die direkt mit Cellulysin

inkubiert wurden. Da SA in wässriger Lösung zum Teil ionisch vorliegt, kann diese nur recht moderate Inhibitionswirkung auf adverse Transporteffekte oder Membranimpermeabilitäten zurückzuführen sein. Daher wurden auch Versuche mit 13-stündiger Vorinkubation der Pflanzen mit Methylsalicylat und Acetylsalicylsäure (je 0.5 mM) unternommen. Beide Verbindungen werden unter physiologischen Bedingungen rasch zu freier SA hydrolysiert. Während das eingesetzte Methylsalicylat nur ähnlich aktiv wie die freie Säure war, erwies sich insbesondere Acetylsalicylsäure (AcSA) als potenter Inhibitor der Cellulysin-induzierten Duftstoffbiosynthese bei *P. lunatus*. Außer einem großen und nach Cellulysingabe normalerweise nicht auftretenden Methylsalicylatpeak war keine Emission flüchtiger Verbindungen mehr zu beobachten. Wurde der mit Hilfe von AcSA gesetzte Block durch exogene Applikation von Jasmonsäure (1mM) umgangen, so beobachtete man wieder eine starke Emission JA-responsiver Duftstoffe. Dieses Experiment zeigt eindeutig, daß durch AcSA lediglich Schritte oberhalb der Jasmonsäure, nicht aber die Genexpression, gestört werden. Exogen applizierte Acetylsalicylsäure kann also an Stelle freier SA zur Inhibition der Jasmonat-vermittelten Duftstoffbiosynthese eingesetzt werden. Gleichzeitig zeigen diese Ergebnisse, daß im System der Limabohne ein erhöhter endogener SA-Spiegel tatsächlich den Octadecanoidweg nachhaltig inhibiert. Von J ENGELBERTH durchgeführte Versuche weisen in die gleiche Richtung. Zweistündige Vorinkubation von frisch geschnittenen Bohnenpflanzen mit Alamethicin (10 µg/ml) und anschließende Behandlung mit Cellulysin, führt lediglich zum Auftreten des aus DMNT, MeSA und TMTT bestehenden ALA-responsiven Duftmusters. Die Emission Cellulysin- respektive JA-induzierter Duftstoffe unterbleibt völlig. Dies deutet klar darauf hin, daß der nach 2-5 Stunden durch ALA induzierte hohe endogene SA-Spiegel zur Inhibition des Octadecanoidweges in der Lage ist.

Um den Einfluß der Salicylsäure auf den Octadecanoidweg und insbesondere den durch SA inhibierten Schritt besser herauszuarbeiten, wurden frisch geschnittene Limabohnen für 13 h mit Acetylsalicylsäure (0.5 mM) vorbehandelt, dann für 40 min (Maximum der transienten JA-Produktion, vergl. Abb. 23) mit ALA (10 µg/ml) induziert und anschließend die Produktion der endogenen Octadecanoide 12-OPDA und JA bestimmt. Als Vergleich und Kontrollen dienten nicht AcSA-vorbehandelte, aber ALA-induzierte und völlig unbehandelte Pflanzen. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abb. 26 dargestellt.

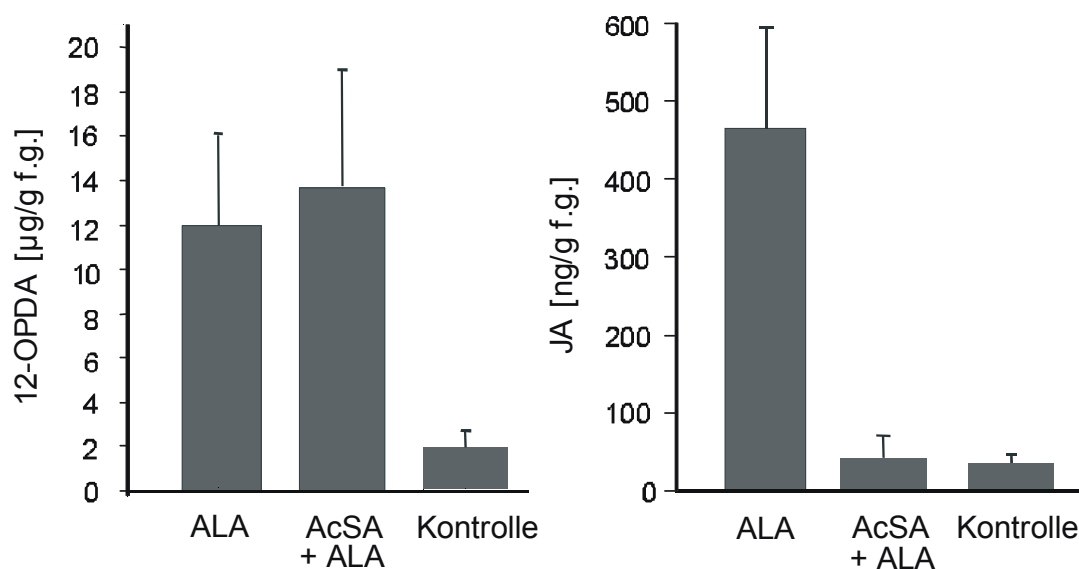


Abb. 26: 40 min Induktion mit ALA bewirkt ein Hochschalten der Octadecanoid-Kaskade, was sich in deutlich gesteigerten endogenen Gehalten an 12-OPDA und JA zeigt. 13 h AcSA-Vorinkubation (0.5 mM) der Pflanzen mit anschließender ALA-Induktion (10 $\mu\text{g/ml}$) führt nur zu einem Anstieg der Konzentration endogener 12-OPDA. Der korrespondierende JA-Level unterscheidet sich in diesem Fall nicht von dem der unbehandelten Kontrollen.

Ohne AcSA-Vorbehandlung beobachtete man nach 40 min eine massive Hochregulation des gesamten Octadecanoidweges, was sich in den vergleichsweise großen Mengen gefundener endogener 12-OPDA (ca. 12 $\mu\text{g/g f.g.}$) und JA (ca. 450 ng/g f.g.) äußerte. Eine Vorinkubation mit AcSA hat offensichtlich keinen Einfluß auf die endogen infolge ALA-Behandlung gebildete Menge an 12-OPDA (gefunden: 13.5 $\mu\text{g/g f.g.}$). Jedoch wurde in diesem Fall keine über den Grundlevel hinausgehende Menge an endogener Jasmonsäure gefunden (ca. 30 ng/g f.g.). Der durch Vorinkubation mit AcSA in der Pflanze bereits zu Beginn der ALA-Induktion vorliegende hohe endogene SA-Spiegel führt also anscheinend zu einem Block im Octadecanoidweg, welcher der 12-OPDA nachgeschaltet, aber der Jasmonsäure vorgeschaltet ist.

In der Limabohne inhibieren hohe endogene Salicylatkonzentrationen den Octadecanoidweg in einer Weise, daß das zentrale Intermediat dieses Stoffwechselweges, die 12-Oxophytodiensäure, noch gebildet wird. Es kommt jedoch nicht mehr zur Biosynthese des Endproduktes Jasmonsäure. Dabei ist es durchaus möglich, daß wie von WEILER et al. postuliert^[123] eine Inhibition des Transports der 12-OPDA von ihrem plastidären Ursprungsort ins Cytosol eintritt und hohe endogene SA-Konzentrationen einen Membrantransportmechanismus stören. Allerdings liegt kein eindeutiger Beweis

für eine solche Wirkungsweise vor. Es ist ebenso möglich, daß einer der folgenden Schritte auf dem Weg zur JA, die Reduktion oder die β -Oxidation, von SA beeinflusst werden. Immerhin konnte durch das oben beschriebene Experiment die Art der SA-vermittelten Inhibition der Jasmonsäurebiosynthese deutlich besser verstanden werden. Es ist nun klar, daß SA zumindest in der Limabohne einen oder mehr der drei genannten Schritte (Transport der 12-OPDA aus dem Plastiden, Reduktion, β -Oxidation) effektiv inhibiert. Diese Inhibition kann auch die Grundlage für ein Verständnis des beobachteten „reduzierten“ ALA-responsiven Duftmusters bilden. Wenn man davon ausgeht, daß ein kontinuierlicher Durchfluß von Metaboliten durch den Octadecanoidweg für eine kontinuierliche Induktion JA-responsiver Duftstoffe erforderlich ist, so erklärt die Blockierung dieses Signalwegs 3-5 h nach Beginn der ALA-Induktion zwanglos das Fehlen der üblichen JA-induzierten Duftstoffe im Chromatogramm. Im Einklang mit dieser Hypothese ist, daß während der ersten 4 h der Induktion mit Alamethicin durchaus JA-responsive Terpene, wie Linalool oder Hexenylacetat, auftreten können. Diese Komponenten treten bei zweitägiger Duftsammlung aber gegenüber der massiven Emission von DMNT, MeSA und TMTT deutlich in den Hintergrund. Die zu Beginn einer ALA-Inkubation beobachtete transiente starke JA-Induktion ist offensichtlich nicht ausreichend, um eine längerfristige Biosynthese JA-responsiver Duftstoffe zu initiieren. Vielmehr scheint dazu eine kontinuierliche Anschaltung des Octadecanoidweges nötig zu sein. Um diese Annahme zu untermauern, wurden Limabohnen zunächst 24 h mit Cellulysin behandelt und dann eine 1 mM Lösung des LOX-Inhibitors Phenidon zugesetzt. Als Resultat beobachtete man nach der Inhibitorzugabe eine rasche Abnahme der Duftstoffemissionsrate. Zur stetigen Duftemission scheint also tatsächlich ein stetiger Metabolitenfluß durch den Octadecanoidweg nötig zu sein. Frühe Octadecanoide und andere Linolensäure-abgeleitete Oxylipine unbekannter Struktur induzieren in der Limabohne ein dem ALA-responsiven analoges Duftmuster (vergl. Kap.3.4). Der SA-vermittelte Block im Octadecanoidweg könnte also dazu führen, daß das Signal über andere Linolensäure-abgeleitete Oxylipine rekanalisiert wird, was zur Induktion des spezifischen beobachteten Duftbouquets führt. Jedoch ist nicht zu erwarten, daß es durch den SA-Block zu einer bemerkenswerten Akkumulation früher Octadecanoide wie 12-OPDA oder Linolensäure kommt. Die natürliche Konzentration an 12-OPDA liegt im Gewebe bereits um wenigstens den Faktor 10 höher als die der JA. Es ist also unwahrscheinlich anzunehmen, daß 12-OPDA nur über den Jasmonatweg metabolisiert

wird. Der durch den Block inhibierte Abbau der frühen Octadecanoide über den Jasmonatweg beeinflusst deren Konzentration daher nur wenig (vergl. Abb. 26, es kommt nicht zu einer deutlichen Akkumulation von 12-OPDA nach AcSA+ALA).

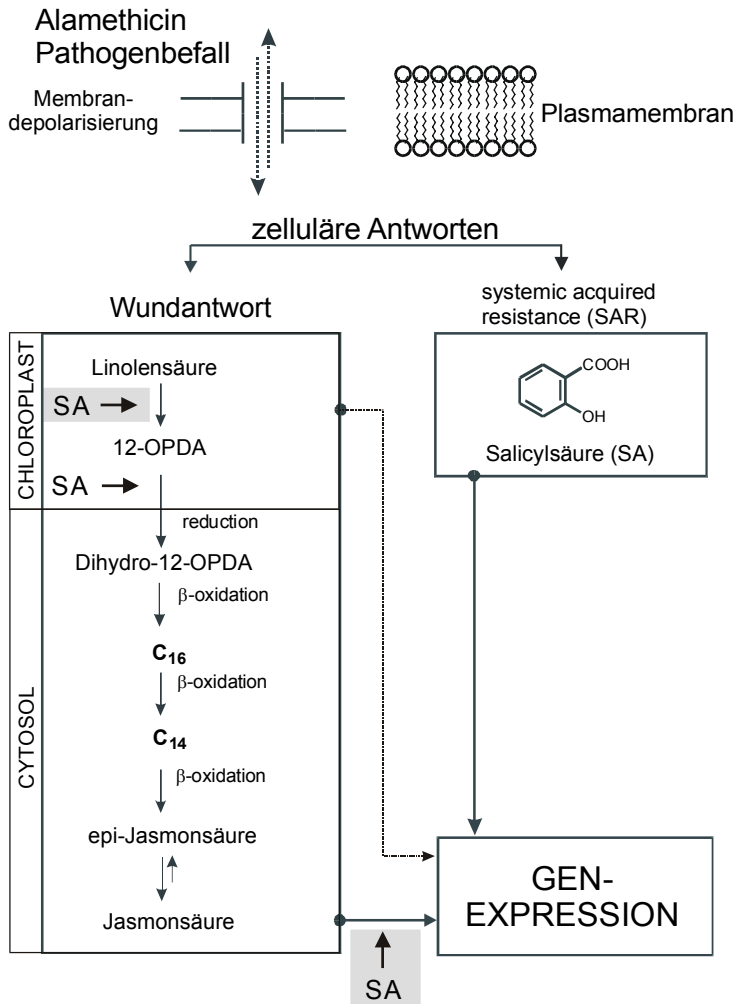


Abb. 27: Modell der nach Alamethicininduktion in der Limabohne auftretenden Signal-Kaskade. Nach ALA-bedingter Depolarisation der Plasmamembran kommt es mit Hochschalten des Octadecanoidweges zunächst zur Einleitung der zellulären Wundantwort, was sich im ersten transienten JA und 12-OPDA-Peak widerspiegelt. Für das Auftreten von JA-responsiven Duftstoffen im Bouquet während der ersten 4 h der Inkubation kann also die frühe JA-induzierte Genexpression verantwortlich sein. Mit einem zeitlichen Versatz von ca. 2-3 h kommt es dann zu einer massiven Induktion der SA-Biosynthese. Die nach ca. 6 h gebildete Menge endogener SA interferiert mit dem Octadecanoidweg unter Ausbildung eines Blocks hinter 12-OPDA, aber vor JA. Dadurch wird im Folgenden die JA-induzierte Wundantwort, mit entsprechender Duftstoffemission unterbunden und es kommt zur Einleitung der SA-vermittelten systemischen Resistenz (SAR). Man beobachtet das typische reduzierte Duftmuster (vergl. Abb. 22). Von anderen Autoren beschriebene Inhibitionsschritte sind grau hinterlegt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß i) hohe endogene Konzentrationen an Salicylsäure den Octadecanoidweg und damit das JA-Signal inhibieren, daß ii) der durch SA inhibierte Schritt des Octadecanoidweges stromabwärts von 12-OPDA, aber oberhalb von JA zu suchen ist, und daß iii) sich das beobachtete „reduzierte“ ALA-responsive Duftmuster durch einen derartigen SA-vermittelten Block und damit „Umleitung“ des Signals über andere Oxylipine deuten läßt. Ein Modell zur Wirkungsweise des Alamethicins und verwandter Verbindungen ist in Abb. 27 dargestellt.

Wechselseitige Interaktionen zwischen JA-vermittelten Wundantwort- und SA-induzierten SAR-Signalwegen sind auch bei anderen Pflanzen bekannt ^[71, 125]. So wird

z.B. in der Tomate die Expression eines Gens der JA-Biosynthese durch exogene SA-Applikation inhibiert.^[122] FELTON et al. (1999) konnten zeigen, daß durch Abschalten der Expression eines Schlüsselenzyms der SA-Biosynthese (Phenylalanin Ammonium Lyase = PAL) die systemische Resistenz (SAR) gegen Infektion mit Tabakmosaikvirus im Tabak reduziert wird, während gleichzeitig die fraßinduzierte Resistenz gegen Larven von *H. virescens* zunimmt.^[71] Umgekehrt führt PAL-Überexpression zu gesteigerter SAR und reduzierter Resistenz gegen Herbivore.

Für das Studium solcher Interaktionen zwischen JA- und SA-vermittelten Signalwegen könnten sich kanalbildende Peptide wie das Alamethicin als wichtige Organismus-unabhängige und unter definierten Bedingungen einsetzbare Testsubstanzen erweisen. Die massive Hochregulation des SA-Signalweges, der schließlich mit der Octadecanoidkaskade negativ interferiert, könnte ein regulatorisches Schlüsselement darstellen, das die pflanzliche Abwehr je nach der Menge an induzierter Salicylsäure und Jasmonsäure entweder in Richtung SAR oder in Richtung Wundantwort steuert (vergl. Abb. 27). Zusammenfassend läßt sich postulieren, daß die bioaktiven Elicitoren eines angreifenden Organismus zur spezifischen Veränderung der relativen Mengen an endogener JA, SA und eventuell anderer Phytohormone führen. Zusammen mit der zeitlichen Kinetik ihrer Produktion bestimmt dieses integrierte hormonelle Signal die Art der Genexpression und damit die Pathogen- bzw. Herbivor-spezifische Abwehrreaktion der Pflanze.

3.4 Linolensäure-abgeleitete Oxylipine als endogene Signalstoffe

Die Ausgangsverbindung des Octadecanoidweges zur Biosynthese der Jasmonsäure ist die dreifach ungesättigte C₁₈-Fettsäure Linolensäure (9Z,11Z,15Z-Octadeca-9,11,15-triensäure). Sie ist in allen Pflanzen integraler Bestandteil von Plasmamembranen und stellt eine wertvolle Schlüsselsubstanz zur Biosynthese komplexer Sekundärmetaboliten des Lipidstoffwechsels dar. In der Literatur wird der Linolensäurestoffwechsel der Pflanzen sehr häufig mit dem tierischen Arachidonsäuremetabolismus verglichen^[126], der die Grundlage der Biosynthese von Prostaglandinen und Leukotrienen darstellt. Letztere sind wichtige Signalsubstanzen im tierischen Organismus, die infolge Verwundung oder Entzündungen ausgeschüttet werden.

Zur Initiierung spezifischer Reaktionen sind immer auch spezifische, zum Teil komplex aufgebaute Sekundärmetaboliten erforderlich, deren Konzentration im allgemeinen niedrig und stark variabel ist. Aufgrund ihrer hohen endogenen Konzentration und Verteilung kommt der Linolensäure selbst sicher keine eigenständige Signalfunktion zu. Sie fungiert vielmehr als biosynthetischer Pool, aus dem je nach Bedarf entsprechende sekundäre Signalmoleküle synthetisiert werden. Ein wichtiges unter ihnen ist die Jasmonsäure.

Wie von KRUMM gezeigt wurde, induzieren hohe Konzentrationen (2 mM) exogen applizierter Linolensäure jedoch in der Limabohne die Emission flüchtiger Verbindungen.^[77] Es handelt sich dabei um die ebenfalls durch Alamethicin induzierbaren flüchtigen Homoterpene DMNT und TMTT (vergl. Abb. 28).

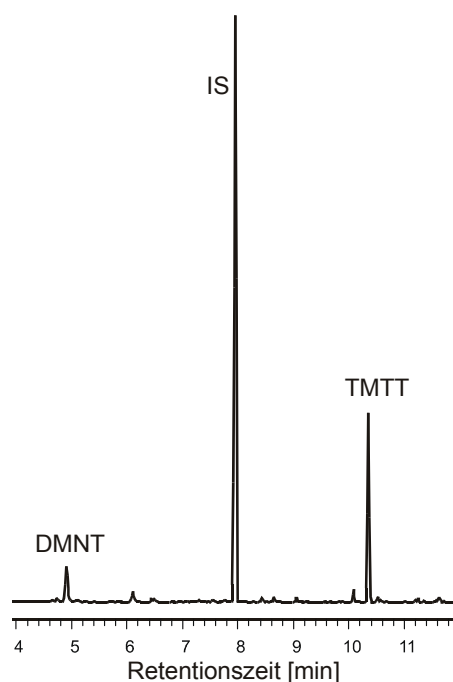


Abb. 28: Von der Limabohne nach Linolensäurebehandlung (2 mM) emittierte Duftstoffe. Neben dem Internen Standard (IS) treten nur die beiden Homoterpene DMNT und TMTT im Gemisch auf. Die Ähnlichkeit der Zusammensetzung dieses Bouquets und des ALA-responsiven ist deutlich erkennbar (vergl. Abb. 22).

Das Induktionspotential der Linolensäure ist allerdings gegenüber ALA sehr gering. Nur bei Applikation hoher Konzentrationen beobachtet man überhaupt eine Duftemission. Interessanterweise handelt es sich jedoch um ein spezifisches Signal, da eine Inkubation der Limabohne mit der um eine Doppelbindung ärmeren Linolsäure (9Z,11Z-Octadeca-9,11-diensäure) selbst in hohen Konzentrationen (2 mM) nicht zu einer Duftemission führte. Das bedeutet, daß die beobachtete Duftstoffbiosynthese nach Inkubation mit Linolensäure keine allgemeine Streßreaktion der Pflanze, etwa bedingt durch den relativ

niedrigen pH der Inkubationslösung oder durch eine plötzliche Steigerung allgemeiner endogener Fettsäurekonzentration, darstellt. Wenn man jedoch Linolensäure selbst als eigenständiges Signal ausschließt, dann liegt die Vermutung nahe, daß die signalvermittelnde Substanz in diesem Fall ein charakteristischer Metabolit der Linolensäure ist. Jasmonsäure kommt hier nicht in Betracht, da das JA-induzierte Duftstoffprofil (vergl. Abb. 4) weitaus komplexer ist und darüberhinaus kein TMTT enthält. Betrachtet man die Ähnlichkeit der ALA- und Linolensäure-induzierten Duftstoffgemische, so liegt vielmehr die Vermutung nahe, daß die Signalweiterleitung in beiden Fällen über ähnliche Wege erfolgt. Es sollte also durch genauere Betrachtung des pflanzlichen Linolensäurestoffwechsels möglich sein, Aufschlüsse über die Natur der unbekannt Substanze(-n) zu erhalten, die u.a. im Falle einer ALA-Induktion zur Signaltransduktion beitragen. Der erste Schritt der Metabolisierung von Linolensäure in Pflanzen ist im allgemeinen eine Lipoxigenase-katalysierte Hydroperoxidierung. Dabei kann die Hydroperoxyl-gruppe entweder an Position 9, oder, wie im ersten Schritt des Octadecanoidweges (vergl. Kap 1.3, Abb. 3), an Position 13 eingefügt werden. Die gebildeten Linolensäure-Hydroperoxide sind recht reaktive Verbindungen, die unter physiologischen Bedingungen spontan oder enzymkatalysiert weiterreagieren. Dabei treten Reduktionen zu den korrespondierenden Alkoholen, Oxidationen mit und ohne Bindungsspaltung sowie radikalische Reaktionen unter Bildung einer Vielzahl möglicher Produkte auf. Eine Auswahl von Linolensäuremetaboliten, die infolge Lipoxigenaseeinwirkung entstehen (Oxylipine) ist in Abb. 29 aufgeführt. Neben den Vertretern des Octadecanoidweges sind vielen weiteren Metaboliten biologische Aktivitäten zugeordnet worden.^[50]

Zur Identifikation der gesuchten Linolensäure-abgeleiteten Signalsubstanz(-en) sind grundsätzlich drei Wege denkbar. Man kann zum einen durch chemische Synthese die einzelnen Komponenten darstellen und an der Limabohne auf ihre Fähigkeit zur Induktion der Duftstoffbiosynthese testen. Dies ist ein recht zeitraubendes Verfahren, besonders wenn man davon ausgeht, daß die in Abb. 29 gezeigte Übersicht nicht vollständig ist.

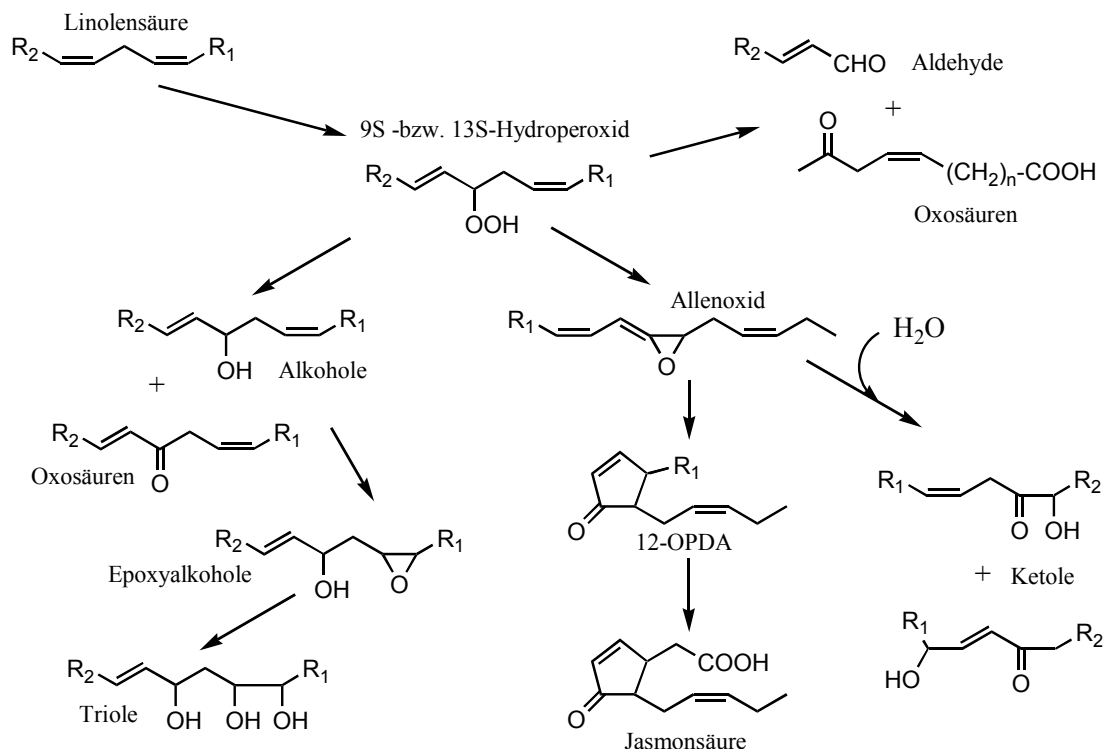


Abb. 29: Ausgewählte Linolensäure-abgeleitete Oxylipine^[127]. Zunächst entstehen Lipoxigenase-katalysiert die 9- bzw. 13-Hydroperoxide. Diese reagieren dann unter Einwirkung von Peroxygenasen, Epoxyhydrolasen, Allenoxidsynthasen oder Lyasen zu verschiedensten Metaboliten weiter. Der Octadecanoidweg, der zur Jasmonsäure führt, ist dabei nur ein möglicher Reaktionsweg unter vielen. Es sind nur charakterisierte enzymatische Abbauege gezeigt. Unter Berücksichtigung nicht-enzymatischer Reaktionen verkompliziert sich das Bild nochmals deutlich. Vielen der gezeigten Metaboliten sind bereits biologische Funktionen zugeordnet worden.

Außerdem ist es möglich, daß die gesuchte Substanz extrem instabil und durch chemische Synthese daher nicht zugänglich ist. So könnte z.B. das im Octadecanoidweg als frühes Intermediat auftretende Allenoxid ein kurzlebiges Signal darstellen. Eine zweite Möglichkeit zur Aufklärung der Identität des gesuchten Signals ist die Extraktion aller im Blattgewebe enthaltener Oxylipine (Fettsäure-abgeleitete Oxidationsprodukte) und Analyse der per GC-MS erhaltenen „Oxylipinsignaturen“. Ein Vergleich der nach ALA-, JA- oder Cellulysininkubation erhaltenen Oxylipinsignaturen mit denen von unbehandelten Kontrollpflanzen könnte Aufschluß über charakteristisch auftretende Metaboliten geben. Sind solche Kandidaten gefunden, so müssen sie identifiziert, synthetisiert und an der Limabohne auf ihre Induktionsfähigkeit getestet werden. Erschwerend bei diesem Ansatz wirkt sich aus, daß die gesuchte(-n) Signalverbindung(-en) höchstwahrscheinlich in nur sehr geringen Konzentrationen neben den im gleichen Zeitfenster eluierenden Hauptlipiden der Pflanze auftreten. Es sind hier Gemische aus

mehreren 10-100 Verbindungen zu erwarten. Als dritte Möglichkeit bietet sich an, Linolensäure oxidativ-synthetisch in ein hochkomplexes Produktgemisch zu zersetzen und dieses Gemisch dann an Limabohnen auf seine Fähigkeit zur Duftinduktion zu testen. Um vergleichbare Produkte zu erhalten, muß dabei beachtet werden, daß die Zersetzung unter möglichst physiologischen Bedingungen erfolgt. Sollte sich das Produktgemisch als aktiv erweisen, so ist es mit geeigneten Mitteln aufzutrennen und die aktive(-n) Komponente(-n) zu ermitteln.

Synthese bekannter Linolensäuremetaboliten

Vor kurzem fanden FARMER et al., daß zwei bisher nicht auf ihr Induktionspotential zur Duftstoffbiosynthese getestete Linolensäuremetaboliten infolge Verwundung in Blättern von *Arabidopsis thaliana* akkumulieren.^[128] Es handelt sich um die 9- bzw. 13-Hydroperoxy- abgeleiteten Oxoverbindungen 9-Oxo-10*E*,12*Z*,15*Z*-octadecatriensäure und 13-Oxo-9*Z*,11*E*,15*E*-octadecatriensäure (Abb. 30). Ihnen und abgeleiteten Derivaten wird eine Signalwirkung bei der Initiierung von Abwehrreaktionen zugeschrieben.^[129] Es besteht also eine gewisse Möglichkeit, daß eine der genannten Verbindungen zu den gesuchten Signalsubstanzen gehört. Daher wurden die genannten Verbindungen dargestellt und an der Limabohne inkubiert. Die Synthese erfolgte durch spezifische Lipoxigenase-katalysierte Hydroperoxidierung von Linolensäure in 9- bzw. 13-Position mit anschließender Reduktion zu den korrespondierenden Alkoholen. Im letzten Schritt wurde dann zu den entsprechenden Ketonen oxidiert (s. Abb. 30). Zur Darstellung der (13*S*,)-13-Hydroperoxy-9,11,15-octadecatriensäure (13*S*-HPOTrE) wurde Lipoxigenase aus Sojabohnen verwendet.^[130] Prinzipiell ist es mit dieser käuflichen Lipoxigenase-Präparation möglich, mit gewisser Selektivität beide gewünschten Hydroperoxide zu erhalten. Bei hohen pH-Werten (pH 9) bilden sich aus Linol- und Linolensäure bevorzugt die 13*S*-Hydroperoxide, während die Reaktionsführung bei pH 6 vorwiegend zur Bildung der 9*S*-Hydroperoxide führt. Im letzten Fall sind die Reaktionsgeschwindigkeiten aber deutlich verlangsamt, so daß zur Darstellung der (9*S*,10*E*,12*Z*,15*Z*)-9-Hydroperoxy-10,12,15-octadecatriensäure (9*S*-HPOTrE) Lipoxigenase aus Tomaten verwendet wurde.^[131] Da diese nicht kommerziell erhältlich ist, mußte die Umsetzung mit frischen homogenisierten Tomaten im Phosphatpuffer durchgeführt werden. Dabei wurde unter kräftigem Rühren 1 g Linolensäure in 1 kg Tomatenhomogenat unter Zutritt von Luftsauerstoff mehrere Stunden lang bei rt. oxidiert.

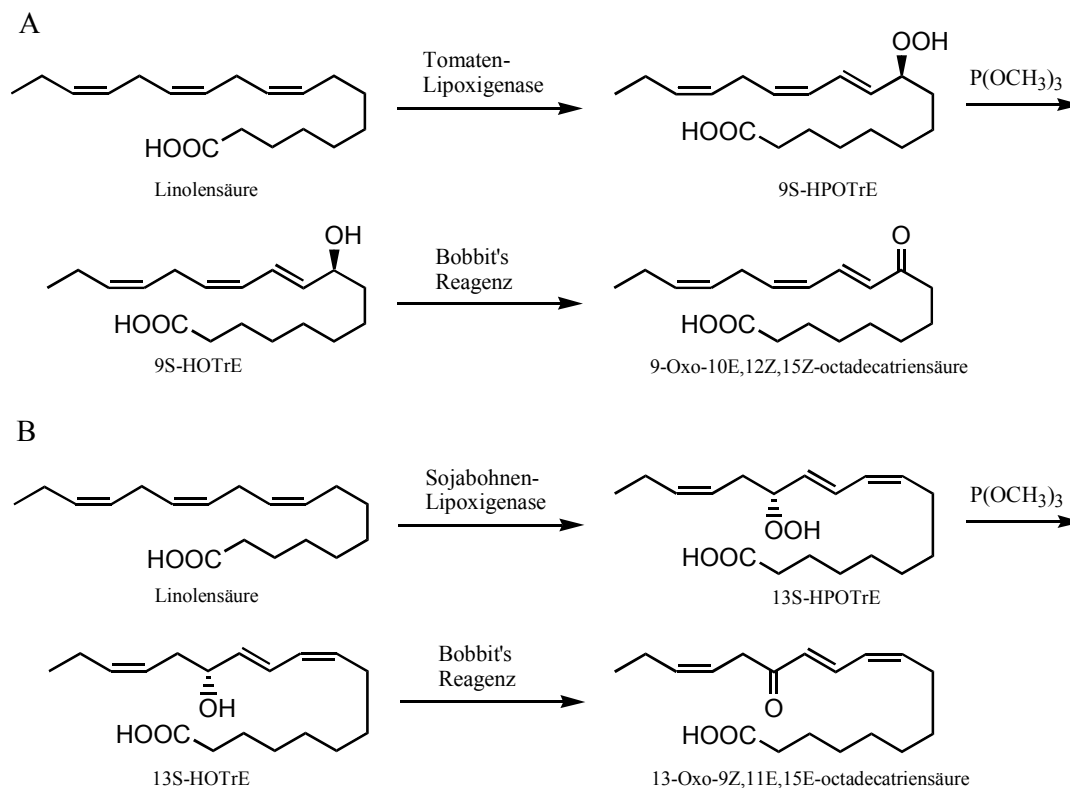


Abb. 30: Darstellung von 9-Oxo-10E,12Z,15Z-octadecatriensäure (A) und 13-Oxo-9Z,11E,15E-octadecatriensäure (B). Die Synthese nutzt in beiden Fällen Linolensäure als Edukt, die zur selektiven Hydroperoxidierung in 9- bzw. 13-Position mit Luftsauerstoff in Gegenwart von Lipoxygenase aus Tomaten (A) bzw. mit Lipoxygenase aus Soja (B) umgesetzt wird. Die folgenden Schritte sind für beide Verbindungen identisch und bestehen aus Reduktion der Hydroperoxide zu den entsprechenden Alkoholen mit Hilfe von Trimethylphosphit und Oxidation der erhaltenen Hydroxylderivate mittels Bobbitts Reagenz unter Freisetzung der Produkte.

Auf diese Weise konnte nach Extraktion das 9S-Hydroperoxid in guter Ausbeute und ohne nachweisbare Verunreinigung durch die 13S-Verbindung erhalten werden. Letztere wurde durch einstündiges Rühren von 1 g Linolensäure im Boratpuffer unter Zusatz von Sojabohnen-Lipoxygenase ebenfalls in reiner Form erhalten. Durch Einwirken von Trimethylphosphit mit anschließender säulenchromatischer Reinigung ließen sich die Hydroperoxide quantitativ in die korrespondierenden 9S- und 13S-Hydroxyverbindungen überführen. Die Oxidation zu den entsprechenden Ketonen erfolgte mit Hilfe von Bobbitts Reagenz.^[132] Es handelt sich dabei um 4-Acetylamino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxoammoniumperchlorat (a), welches durch Oxidation von 4-Acetylamino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin und anschließender Umsetzung mit Perchlorsäure auf einfache Weise erhalten werden kann. Das von J BOBBITT (1998) beschriebene Reagenz fällt als leuchtendgelbes Salz an und überführt bevorzugt allyl-

und benzylständige Hydroxylgruppen in die entsprechenden Oxoverbindungen. Bei der Umsetzung ist nicht das Perchlorat die oxidierende Gruppe, sondern das 4-Acetylamino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxoammonium-Kation wird zum korrespondierenden farblosen Hydroxylammonium-Ion (b) reduziert (s. Abb. 31).

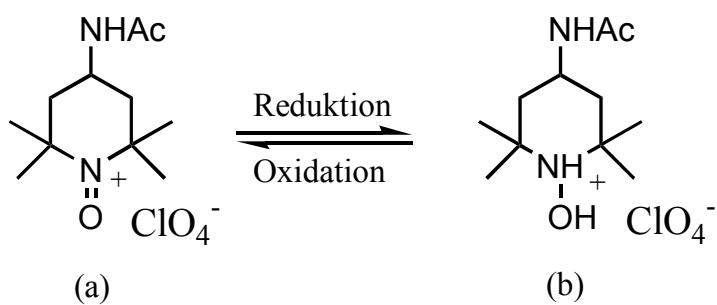


Abb. 31: Bobbitts Reagenz in oxidierter (a) und reduzierter (b) Form. Im Verlauf der Oxidation von Alkoholen wird das in (a) vorliegende Oxoammonium-Kation in das korrespondierende Hydroxylammonium-Ion überführt. Letzteres läßt sich nach der Reaktion mit Hilfe von NaOCl_{aq} unter Rückgewinnung von (a) reoxidieren.

Das für die Synthesen verwendete Reagenz wurde freundlicherweise von M HOSKOVEC zur Verfügung gestellt. Die Umsetzungen gelangen glatt und in Ausbeuten von 50-60 % nach säulenchromatographischer Reinigung. Im Gegensatz dazu führte eine konventionelle Oxidation mittels Mangan-(IV)-oxid zu einem untrennbaren Produktgemisch, welches die gewünschten Verbindungen lediglich als Nebenkomponenten enthielt. Bobbitts Reagenz eignet sich also sehr gut zur selektiven Oxidation von Alkoholfunktionen in empfindlichen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die mit konventionellen Verfahren nur schwer auszuführen sind.

Alle durch die oben beschriebene Reaktionssequenz erhaltenen Oxylipine wurden im Folgenden an der Limabohne auf ihre Fähigkeit zur Induktion der Duftstoffbiosynthese getestet. Frisch geschnittene Pflanzen wurden in 0.1-1.0 mM wässrige Lösungen der erhaltenen Oxylipine eingestellt und der umgebende Gasraum 48 h lang per CLS (s. Kap. 5.4.1) analysiert. Es konnte jedoch lediglich für die beiden Hydroperoxide 9S-HPOTrE und 13S-HPOTrE eine geringe, der Linolensäure vergleichbare Aktivität festgestellt werden. In 1 mM Lösung wurde eine leichte Induktion der beiden Homoterpene DMNT und TMTT beobachtet. Zusätzlich trat auch eine geringe Menge Methylsalicylat im Duftchromatogramm auf. Die Induktionskraft der Hydroperoxide lag allerdings um mehrere Größenordnungen unter der des Alamethicins (vergl. Abb. 23).

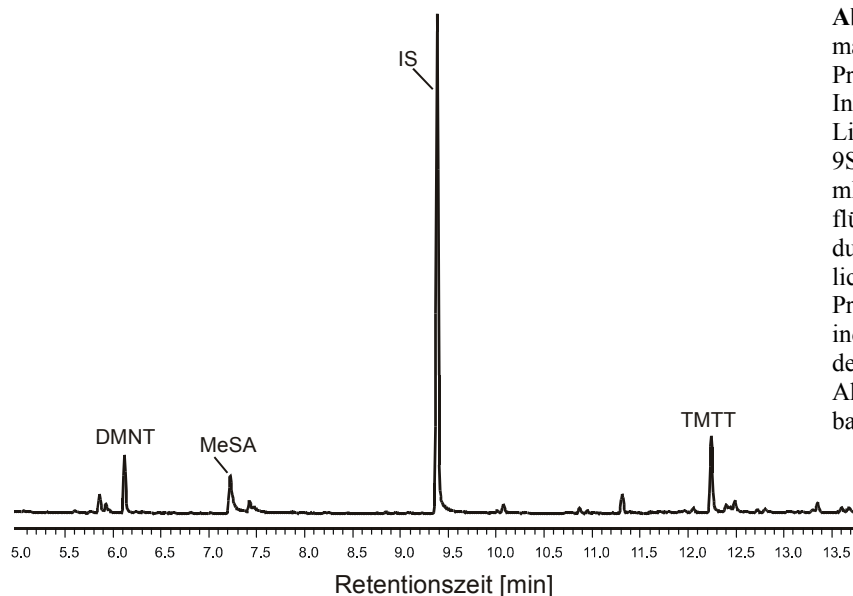


Abb. 32: Gaschromatographisches Profil der nach Inkubation von Limabohnen mit 9S-HPOTrE (1 mM) erhaltenen flüchtigen Verbindungen. Die Ähnlichkeit dieses Profils zum ALA-induzierten ist, bei deutlich geringerer Aktivität, erkennbar.

Für die vier übrigen Verbindungen (9S-HOTrE, 13S-HOTrE und die korrespondierenden Oxosäuren) konnte keine Aktivität gefunden werden. Die Oxosäuren stellen also nicht das (die) gesuchte(-n) Signal(-e) dar, das (die) in der Limabohne zum ALA-induzierten Duftbouquet führen. Die geringe Aktivität der Hydroperoxide kann allerdings als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, daß es sich bei den gesuchte(-n) Signal(-en) um Metabolit(-en) des primär Lipoxigenase-katalysierten Linolensäurestoffwechsels handelt.

Aufnahme von Oxylipinsignaturen

Durch Extraktion und Analyse des Gesamtlipidgehalts eines pflanzlichen Gewebes lassen sich wertvolle Aussagen über das Spektrum enthaltener Oxylipine und vor allem über ihre relativen Konzentrationen im Gewebe treffen. Aus den daraus gewonnenen Informationen können eventuelle Beteiligungen einzelner Oxylipine am Signalgeschehen in der Pflanze abgeleitet werden. So berichten KRAMELL et al. nach Aufnahme von Oxylipinsignaturen über differentielle Induktionen einzelner Octadecanoide als Reaktion auf Sorbitol-induziertem Streß bei Gerste.^[133] HAUSE et al. finden Unterschiede der Oxylipinsignaturen in verschiedenen Geweben bei Tomaten.^[134] Auch in *A. thaliana* wurden durch Aufnahme von Oxylipinsignaturen wertvolle Informationen über das zugrundeliegende Lipid-basierte Signalgeschehen gewonnen.^[135] Ein Vergleich der Oxylipinsignaturen aus Blattgewebe von Limabohnen, die mit Alamethicin, Cellulysin

oder Leitungswasser inkubiert wurden, könnte Aufschluß über speziell ALA-responsive Oxylipine geben. Nach entsprechender Inkubation des Pflanzenmaterials wurde das Gewebe zunächst unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerkleinert und in kaltem Methanol suspendiert. Als Standard zum Abschätzen der Güte der Extraktion wurde $[9,10\text{-}^2\text{H}_2]$ -9,10-Dihydrojasmonsäure zugesetzt. Eine starke Anreicherung der Oxylipine konnte mit Hilfe der RP18-Festphasenextraktion erreicht werden. Vor der Analytik wurden die Proben mittels Reduktion (Trimethylphosphit), Methylierung (Diazomethan) und Silylierung (MSTFA) derivatisiert. Der Rückstand nach der Derivatisierung wurde in Dichlormethan aufgenommen und per GC-MS analysiert. Es zeigte sich in allen Fällen eine hochkomplexe, aus mehreren Hundert Verbindungen bestehende Oxylipinmischung. Mit Hilfe eines sehr langsamen Temperaturprogrammes gelang es jedoch, das Zeitfenster, in dem die zu untersuchenden Verbindungen eluieren, auf ca. 10 min auszudehnen. Mit Hilfe von Spektren- und Retentionszeitvergleich ließen sich die Hauptkomponenten und bekannte Vertreter der Oxylipinsignatur der Limabohne identifizieren (s. Abb. 33).

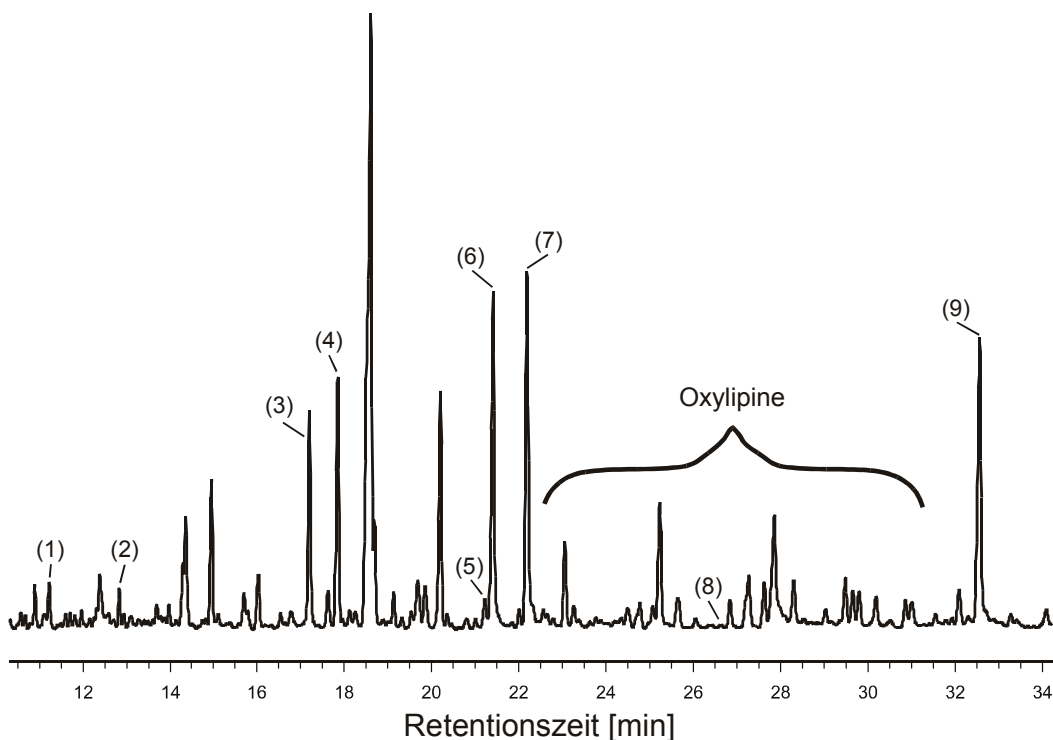


Abb. 33: Oxylipinsignatur aus 1.7 g Blattgewebe der Limabohne nach Inkubation mit ALA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 h Inkubationsdauer). Identifikation von Verbindungen: (1) $[9,10\text{-}^2\text{H}_2]$ -9,10-Dihydrojasmonsäuremethylester (interner Standard), (2) Tetradecensäuremethylester, (3) Palmitinsäuremethylester, (4) Weichmacher, (5) Linolensäuremethylester, (6) Linolensäuremethylester, (7) Stearinsäuremethylester, (8) 12-OPDA (identifizierbar über Ionenspur bei 95 amu), (9) Weichmacher.

Auch die wie oben beschrieben synthetisierte und als inaktiv klassifizierte 9-Oxo-10E,12Z,15Z-octadecatriensäure konnte als Spurenkomponente in den Oxylinmustern nachgewiesen werden. Ihre Retentionszeit beträgt 30.92 min.

Ein Vergleich der Oxylinsignaturen von Limabohnen, die jeweils 2 h mit Alamethicin (10 µg/ml), Cellulysin (100 µg/ml) oder zur Kontrolle mit Leitungswasser inkubiert wurden, ergab allerdings kein klares Bild. Insgesamt läßt sich schließen, daß das Gewebe induzierter Pflanzen eine größere Menge an Oxylinen enthält, von denen einige induzierbar sein könnten. Es muß jedoch in Betracht gezogen werden, daß nichts über die Kinetik des Auftretens der unbekannt Signalstoffe bekannt ist. D.h. es ist unklar, ob die gesuchte(-n) Substanz(-en) nach zweistündiger Inkubation überhaupt in ausreichender Menge vorliegen. Wenn es sich darüberhinaus um Verbindungen sehr geringer Konzentration handelt, die wie z.B. JA nur über ihre charakteristische Ionenspur in der Oxylinsignature detektierbar sind, so ist ein Auffinden im Chromatogramm unwahrscheinlich. Die Methodik der Oxylinextraktion und Analytik konnte erfolgreich etabliert und routinemäßig angewendet werden. Für die nahe Zukunft ist eine systematische Analytik von Oxylinsignaturen nach unterschiedlichen Inkubationsdauern mit ALA, Cellulysin und Vergleich mit entsprechenden Kontrollen geplant. Sollten dann speziell ALA-responsive Verbindungen reproduzierbar in den Chromatogrammen auftauchen, so sind diese zu identifizieren, synthetisieren und an der Limabohne auf ihre Fähigkeit zur Induktion der Duftstoffbiosynthese zu untersuchen.

Untersuchung von Produktgemischen nach Linolensäureoxidation

Bei den gesuchten Signalsubstanzen handelt es sich höchstwahrscheinlich um Verbindungen, die durch oxidativen Abbau der Linolensäure unter physiologischen Bedingungen entstehen. Nimmt man an, daß eine oxidative Zersetzung von Linolensäure *in vitro* zu ähnlichen Produkten führt wie *in vivo*, so besteht die Möglichkeit, daß die gesuchte(-n) Verbindung(-en) auf diese Weise zumindest als Spurenkomponente(-n) in einem komplexen Produktgemisch zugänglich sind. Erweist sich das Produktgemisch als aktiv, so ist es mit den verfügbaren analytischen Verfahren eventuell bis zur Identifikation von bioaktiven Komponenten fraktionierbar.

Ein von P SPITELLER beschriebenes Verfahren gestattet die Oxidation von Linolensäure *in vitro* unter praktisch physiologischen Bedingungen.^[136] Dabei wird zu einer Emulsion von Linolensäure im Phosphatpuffer (pH 7.4) eine kleine Menge Eisen-

(II)-sulfat gegeben und die Reaktionsmischung für 18-21 h unter Luftzutritt gut gerührt. Das durch Luftsauerstoff gebildete Fe-(III) katalysiert die Oxidation der Linolensäure. Ähnlich wie bei den enzymatischen Reaktionen bilden sich zunächst verschiedene Hydroperoxide, die dann zu Hydroxiden, Epoxiden, Aldehyden, Di- und Triolen, Ketolen und Dicarbonsäuren weiterreagieren. Unter Bindungsspaltung entstehen schließlich viele kleine Fragmente. Die Reaktionszeit ist dabei entscheidend für die Art der erhaltenen Produkte. Beendet man die Reaktion nach 3-5 h, so erhält man neben restlicher Linolensäure hauptsächlich die Hydroperoxide. Nach mehreren Tagen liegt dagegen nur noch ein komplexes Gemisch sauerstoffhaltiger Fragmente vor. Um zunächst ein möglichst breitgefächertes Produktgemisch zu erhalten, wurde eine Reaktionszeit von 18-21 h gewählt. Zu dieser Zeit sollte die eingesetzte Linolensäure fast vollständig umgesetzt und eine breite Palette von höheren und niederen Verbindungen entstanden sein. Zum Abbruch der Oxidation wurde die Reaktionsmischung mit Chloroform ausgeschüttelt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das als gelbes Öl anfallende Produktgemisch wurde geteilt und eine Hälfte zur Entfernung von labilen Hydroperoxiden schnell mit Trimethylphosphit reduziert. Dünnschichtchromatographische Analyse des Gemisches zeigte einen vollständigen Umsatz der Linolensäure und das Vorliegen einer Vielzahl polarer Verbindungen an. Analyse des Reaktionsgemisches per GC-MS nach Derivatisierung (Reduktion, Methylierung, Silylierung) bestätigte das Vorliegen von mehreren 10-100 „Oxylipinen“.

Sowohl das reduzierte als auch das Rohgemisch der *in vitro* Oxidation der Linolensäure wurde an der Limabohne auf seine Fähigkeit zur Induktion der Duftstoffbiosynthese untersucht. Da die eventuell enthaltenen bioaktiven Oxylipine ggf. nur als Spurenkomponenten im komplexen Gemisch vorliegen, wurde eine Konzentration der wässrigen Inkubationslösungen von 500 µg/ml eingesetzt. Die von den Pflanzen emittierten Duftstoffe wurden über einen Inkubationszeitraum von 48 h gesammelt und per GC-MS analysiert. In der Tat zeigten beide Oxylipingemische (reduziert und nicht-reduziert) eine bemerkenswerte Aktivität und bewirkten eine Induktion genau jener flüchtigen Verbindungen, die von der Behandlung mit Alamethicin her bekannt sind. Es wurde die Emission einer geringen Menge Linalool zusammen mit signifikanten Mengen DMNT und MeSA neben TMTT als Hauptkomponente beobachtet. Aus Untersuchungen von SCHÜLER ist jedoch bekannt, daß auch Schwermetalllösungen bei Limabohnen genau den beobachteten Effekt hervorrufen können.^[106] Bei Betrachtung der Herkunft der

getesteten Substanzgemische ist es daher als problematisch anzusehen, daß eine eventuell auftretende Kontamination durch Fe-Ionen als Ursache für die beobachtete Duftemission verantwortlich sein könnte. Um dies auszuschließen, wurden wässrige Eisen-(II)-sulfatlösungen entsprechender Konzentration mit Chloroform extrahiert und die Rückstände nach Entfernung des Lösungsmittels auf ihre Duftinduktionsfähigkeit bei der Limabohne untersucht. Als Resultat zeigte sich ein völliges Fehlen flüchtiger Verbindungen in den jeweiligen Chromatogrammen. Es ist also zumindest eine Linolensäure-abgeleitete Verbindung im Oxidationsgemisch enthalten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Rolle bei der durch ALA induzierten Signaltransduktion spielt. Um das bioaktive aber hochkomplexe Lipidgemisch in einem ersten Schritt anzutrennen und Hinweise auf den Oxidationsgrad der gesuchten Verbindung(-en) zu erhalten, wurde es mittels präparativer Dünnschichtchromatographie fraktioniert. 30 mg Rohgemisch wurden auf die Kieselgelplatte aufgetragen und mit einem Gemisch aus Hexan/Essigsäureethylester 1:1 (v/v) unter Zusatz von 0.1 % Essigsäure entwickelt. UV-Betrachtung der Platte lieferte einen Bereich von $r_f = 0.06 - 0.79$ in dem Substanzen auftraten. Dieser Bereich wurde in 6 Banden unterteilt, jede Bande ausgeschnitten, mit Chloroform extrahiert und die jeweiligen Rückstände an der Limabohne auf ihr Duftinduktionspotential hin getestet. Es zeigte sich, daß alle Fraktionen gegenüber entsprechenden Kontrollen ein gewisses Potential zur Induktion des aus DMNT, MeSA und TMTT bestehenden Duftgemisches aufweisen. Mit Abstand die größte Aktivität fand sich jedoch in Fraktion 3 ($r_f=0.29$). Das hier erhaltene gaschromatographische Profil der induzierten Duftstoffe ist in Abb. 34 dargestellt.

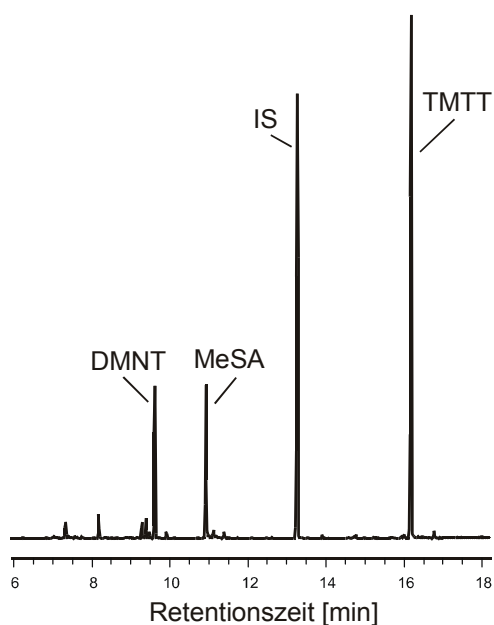


Abb. 34: Gaschromatographisches Profil der abgegebenen flüchtigen Verbindungen nach Inkubation von Lima-bohnen mit einem komplexen Linolensäure-abgeleiteten Oxy-lipingemisch (Fraktion 3 nach dünnschichtchromatographischer Antrennung des synthetischen Gemisches). Es werden genau die gleichen Verbindungen wie nach ALA-Induktion emittiert.

Unter den gewählten chromatographischen Bedingungen besitzt Linolensäure einen r_f -Wert von ca. 0.80. Die in Fraktion 3 zu findenden Substanzen sind also im Vergleich zu Linolensäure deutlich polarer und enthalten schätzungsweise wenigstens zwei weitere Sauerstoffatome. Bei den gesuchten Verbindung(-en) könnte es sich also um Diole, Hydroxyketone oder -aldehyde oder auch Epoxyalkohole handeln. Für jede dieser Substanzklassen sind Vertreter im Linolensäuremetabolismus der Pflanzen bekannt. Eine geringe Menge der aus Fraktion 3 erhaltenen Oxylinmischung wurde nach Derivatisierung (Reduktion, Methylierung und Silylierung) mittels GC-MS analysiert. Wie Abb. 35 zeigt, handelt es sich um ein hochkomplexes Gemisch unterschiedlichster Oxyline.

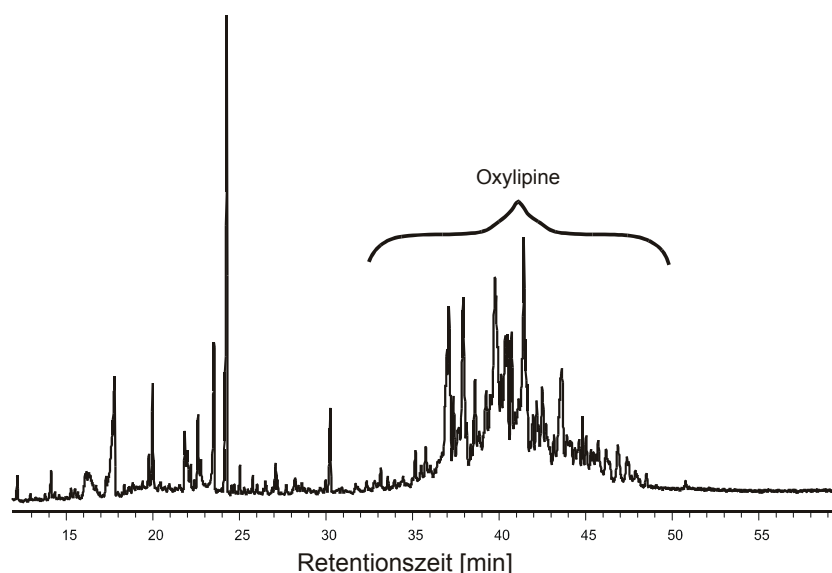


Abb. 35: Gaschromatographisches Profil der nach Oxidation von Linolensäure erhaltenen Oxylinmischung. Gezeigt ist die Zusammensetzung der nach dünn-schichtchromatographischen Trennung erhaltenen Fraktion 3 ($r_f = 0.29$, GC-MS nach Derivatisierung mit i) Trimethylphosphit, ii) Diazomethan und iii) MSTFA). Diese Fraktion erweist sich im Duftassay an der Limabohne als deutlich aktiv. Allerdings sind auch nach der Antrennung mittels präparativer Dünnschichtchromatographie eine Vielzahl von Oxylinen zu erkennen, und eine weitere Auftrennung des Gemisches ist erforderlich.

Zur weiteren Reinigung und Charakterisierung von Einzelkomponenten ist eine sorgfältige HPLC-gestützte Analyse des Gemisches nötig. Alternativ kann auch versucht werden, durch Verkürzung der Reaktionszeit bei der Oxidation die Bildung von höher oxidierten Verbindungen und Kettenfragmenten zu unterdrücken. Dadurch könnte ein weit weniger komplexes aber noch aktives Substanzgemisch erhalten werden.

Mit Hilfe der Oxidation von Linolensäure unter physiologischen Bedingungen konnte tatsächlich eine Oxylinmischung erhalten werden, die in der Limabohne ein

„reduziertes“ Duftmuster induziert wie Alamethicin. Es ist jedoch unklar, wieviele aktive Komponenten die komplexe Mischung enthält und in welcher Konzentration sie vorliegen. Aus diesen Gründen ist eine Abschätzung der Aktivität der Verbindungen derzeit noch unmöglich. Die erhaltenen gaschromatographischen Profile der induzierten Duftstoffgemische deuten jedoch auf eine im Vergleich zu ALA etwas geringere Aktivität der Mischung hin. Dünnschichtchromatographische Fraktionierung zeigt eine Anreicherung des Induktionspotentials in einem Bereich, der auf höher oxidierte Linolensäurederivate, nicht aber auf Kettenfragmente, als Signalträger schließen läßt.

3.5 Fettsäurekonjugate als Elicitoren der pflanzlichen Duftproduktion

3.5.1 Volicitin

Neben der durch Elicitoren wie Alamethicin oder Cellulysin induzierten Verteidigung können Pflanzen auch einen Befall durch herbivore Insekten erkennen und differenziert darauf reagieren. Eine solche Abwehrstrategie ist die Elicitor-induzierte Emission eines hochkomplexen Gemisches an flüchtigen Verbindungen. Letztere wirken als Lockstoffe für Fraßfeinde oder Parasiten der attackierenden Herbivoren. Die Erkennung des Herbivorenbefalls erfolgt durch aktive Komponenten in den eingebrachten Salivarsekreten der fressenden Insekten. Ein solcher Elicitor aus den Salivarsekreten von Schmetterlingslarven (Lepidopteren) wurde von ALBORN et al. identifiziert.^[22] Es handelt sich dabei um *N*-(17-Hydroxylinolenoyl)-L-glutamin (Volicitin, Abb.36).

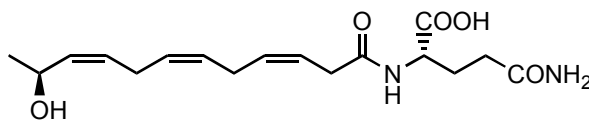


Abb. 36: *N*-(17-Hydroxylinolenoyl)-L-glutamin (Volicitin) aus dem Salivarsekret herbivorer Insekten.

Nach den Ergebnissen von ALBORN et al. handelt es sich bei diesem „Volicitin“ genannten Elicitor um eine hochaktive Verbindung, die in gering konzentrierter Lösung am Mais genau das gleiche Duftstoffgemisch zu induzieren vermag wie ein realer Befall durch *Spodoptera*-Larven. Volicitin ist damit als niedermolekularer Elicitor der pflanzlichen Abwehr von Frassfeinden anzusehen. Unklar ist jedoch, ob es sich um ein generelles Phänomen handelt und Volicitin der universelle Elicitor herbivorer Insekten

ist, der von einer Vielzahl unterschiedlicher Pflanzenarten erkannt wird. In der Limabohne löst mehrtägiger Befall durch verschiedene Lepidopteren die Emission eines hochkomplexen Duftbouquets aus (Abb. 40). In den Salivarsekreten der verwendeten Larven konnte JUNG darüberhinaus mittels LC-MS-Analytik substanzielle Mengen von Volicitin und ähnlichen Fettsäurekonjugaten nachweisen.^[137] Es war also die Frage zu klären, ob sich reines Volicitin auch im Fall der Limabohne als ähnlich aktiv wie realer Raupenbefall erweisen würde. Die Limabohne hat im Gegensatz zum Mais die Fähigkeit zur differentiellen Duftinduktion (s. Kap. 3.3 und 3.6.2). Daher wäre es interessant zu erfahren, ob Volicitin in der Limabohne das vollständige Bouquet, oder nur ein Subset flüchtiger Verbindungen zu induzieren vermag. Darüberhinaus ist das Volicitinmolekül in Position 17 chiral. Es ist also zu überprüfen, ob die Chiralität Einfluß auf die Aktivität der Verbindung ausübt.

Die Zusammensetzung der Salivarsekrete von *Spodoptera*-Larven ist recht komplex.^[137] Daher ist es ungünstig, Volicitin durch chromatographische Reinigung aus der natürlichen Quelle zu erhalten. Eine Kontamination mit anderen niedermolekularen Verbindungen ist in diesem Fall nicht auszuschließen; außerdem ist die für eine Reinigung benötigte Menge an Ausgangsmaterial unrealistisch groß. Um analytisch reines Volicitin nicht biogenen Ursprungs idealerweise in enantiomerenreiner Form zu erhalten, ist eine präparative Darstellung nötig. Ein Darstellungsverfahren für Volicitin wurde bereits von ALBORN et al. beschrieben.^[138] Es nutzt zum Aufbau des all-cis konfigurierten Doppelbindungssystems eine Folge von Cupratadditionen entsprechender acetylenischer Einheiten, die dann jeweils cis-selektiv hydriert werden können. Es handelt sich jedoch um eine recht komplizierte, vielstufige Synthese, die darüberhinaus lediglich zum Racemat führt. Unter eigener Mitarbeit, jedoch maßgeblich von POHNERT, wurde daher eine neue einfachere Synthese des Volicitins entwickelt (s. Abb. 37). Im Verlauf der Synthese wurde die geschützte 17-Hydroxylinolensäure-Untereinheit in einer Bis-Wittig-Eintopfreaktion erhalten. Die gewünschte Konfiguration kann durch Wahl des entsprechenden Enantiomeren der Milchsäure als Edukt eingestellt werden. Das zentrale Intermediat der Bis-Wittigreaktion zum Aufbau des Fettsäuregerüsts stellt das aus dem Bis-Wittigsalz **1** erhältliche bis-funktionelle-Ylid **2** dar. An dieses wurde nach DIBAL-H-Reduktion im ersten Wittig-Schritt zunächst das entsprechende Enantiomer des Milchaldehyds angekoppelt. Durch Zugabe von 9-Nonanal-1-carbonsäuremethylester zur Reaktionsmischung wurde im zweiten Wittig-

Schritt die noch freie Ylidfunktion zur 17-Hydroxylinolensäureuntereinheit umgesetzt. Die Bildung der symmetrischen Addukte läßt sich durch sorgfältiges Einhalten der beschriebenen Reaktionsbedingungen weitgehend unterdrücken.^[139] Nach Verseifung des Esters wurde mit Hilfe der Methode des gemischten Anhydrids L-Glutamin an die freie Carbonsäurefunktion gekoppelt.^[77] Die saure Aufarbeitung dieses Reaktionsgemisches setzte unter Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe das Produkt mit 42% Gesamtausbeute frei.

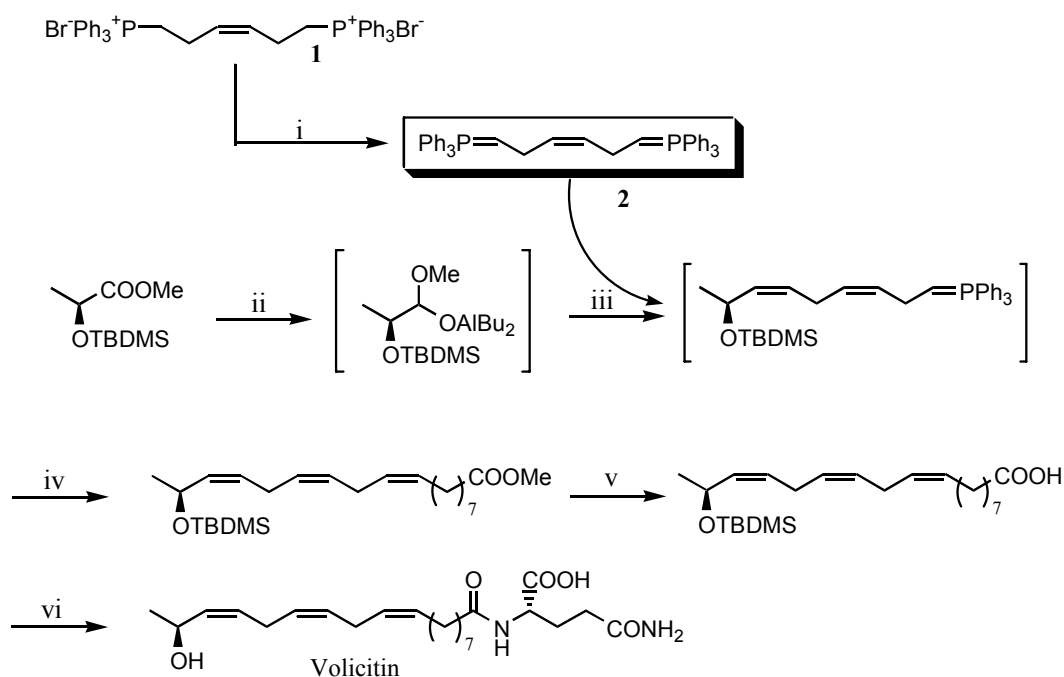


Abb. 37: Neuer enantioselektiver synthetischer Zugang zum Volicitin. Reagenzien und Bedingungen: i) 2 equiv. $\text{KN}(\text{SiMe}_3)_2$, THF; ii) DIBAL-H, Ether, -78°C ; iii) $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt.}$; iv) 9-Oxononan-1-carbonsäuremethylester, $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt.}$; v) LiOH, THF-Wasser; vi) NET_3 , THF, ClCOOEt, -10°C , Gln, NaOH $\rightarrow \text{rt.}$

Mit Hilfe dieser aus nur wenigen Schritten bestehenden Synthese wurden beide Enantiomere des Volicitins im 100 mg - Maßstab zugänglich und konnten an der Limabohne auf ihre Fähigkeit zur Induktion der Duftstoffbiosynthese getestet werden.

Frisch geschnittene Limabohnenpflanzen wurden in wäßrige Volicitinlösungen von 1 nM - 0.5 mM eingestellt und die Gasphase im geschlossenen System für 48 h per CLS überwacht. Die Analyse der Filtereluate erfolgte per GC-MS. Trotz häufiger Repetition der Experimente konnte an der Limabohne jedoch keine Volicitin-induzierte Duftstoffemission festgestellt werden. Sorgfältige Analyse der erhaltenen Chromatogramme zeigte keinen Unterschied zu parallel durchgeführten Kontrollexperimenten mit

Leitungswasser als Inkubationslösung an. Die Variation der Konzentration, der Enantiomerenzusammensetzung, des pH-Wertes und der Applikationsart (in Lösung oder direkt auf verwundetes Blatt aufgetragen) hatte dabei keinen Einfluß auf das erhaltene Ergebnis. Die Identität des verwendeten synthetischen Volicitins wurde, neben der üblichen spektroskopischen Charakterisierung, zusätzlich durch Vergleich mit Volicitin biogenen Ursprungs gesichert. Beide Verbindungen coeluierten bei flüssigchromatographischer Analyse (LC-MS) und zeigen identisches spektroskopisches Verhalten. Im Gegensatz zur Inkubation von Limabohnen mit Volicitin führte ein zweitägiger Befall der Pflanzen mit Larven von z.B. *Spodoptera exigua* hingegen zur massiven Emission von intensiv duftenden Verbindungen. Auch Experimente zur Duftinduktion des Volicitins an Mais und Baumwolle führten zu unbefriedigenden Ergebnissen. Im Fall des Mais ist es jedoch möglich, daß bei zu geringer Lichtintensität inkubiert wurde. Nach Untersuchungen von DEGEN kann sich die Volicitin-induzierte Duftstoffbiosynthese in Abhängigkeit von der verfügbaren Lichtenergie um mehrere Größenordnungen verstärken.^[140] Von DEGEN durchgeführte Experimente mit dem von uns synthetisierten Volicitin sprechen für ein gewisses Induktionspotential am Mais, zumindest in 0.5 mM Konzentration der Inkubationslösungen (T Degen, pers. Mitteilung).

Der bisher einzige beobachtete Effekt des Volicitins an der Limabohne ist eine moderate Induktion des Gehalts an endogener Salicylsäure. Nach 15 h Inkubation mit 0.2 mM Volicitinlösung zeigte sich ein Anstieg des endogenen SA-Gehalts im Blattgewebe auf ca. 1100 ng/g Frischgewicht, was in etwa dem Induktionspotential von fressenden Larven entspricht. Eine ausführlichere Diskussion dieses Effektes findet sich in Kapitel 3.6.4 und Abb. 44.

Die große für Mais beschriebene Bioaktivität des Volicitins bezgl. des Induktionspotentials der Duftstoffbiosynthese kann für die Limabohne nicht bestätigt werden. Nach Gabe von Volicitin werden von Limabohnenblättern nicht signifikant mehr flüchtige Verbindungen emittiert als von parallel untersuchten Kontrollpflanzen. Im Gegensatz dazu führt Herbivorenbefall bei der Limabohne binnen 24-48 h zu einer massiven Duftstoffemission. Volicitin kann dementsprechend kein universeller Elicitor sein, der bei vielen höheren Pflanzen gleichermaßen wirksam ist. Weitere Untersuchungen der Salivarsekrete nach hoch- und niedermolekularen Elicitoren sind erforderlich, um das komplexe Netzwerk aller zur Signalübertragung an der Schnittstelle

Tier/Pflanze beteiligten Verbindungen aufzuschlüsseln. Volicitin und verwandte Verbindungen stellen dabei eine Klasse möglicher Signalsubstanzen dar.

3.5.2 Weitere Linolensäurekonjugate

Neben dem oben beschriebenen Volicitin treten im Salivarsekret von Lepidopteren weitere Aminosäurekonjugate der Linol- und Linolensäure auf. Nach Identifikation durch JUNG handelt es sich vorwiegend um Linolenoyl-L-glutamin.^[137] Bis auf Verlust der 17-Hydroxyfunktion entspricht diese Verbindung dem Volicitin. Aber auch Konjugate der Linolensäure und der Linolsäure mit anderen L-Aminosäuren, wie Glu oder Ile sind seit vielen Jahren bekannt (Abb. 38). Ihnen wird eine Funktion als Emulgatoren der vom Insekt aufgenommenen Nahrung zugeschrieben.^[141, 142] Als Verbindungen mit tensidartiger Struktur (polarer Aminosäure-Kopf und unpolare Fettsäure-Schwanz) senken sie die Oberflächenspannung des wässrigen Salivarsekrets und erhöhen dadurch die Aufnahmefähigkeit für lipide Nahrungsbestandteile.

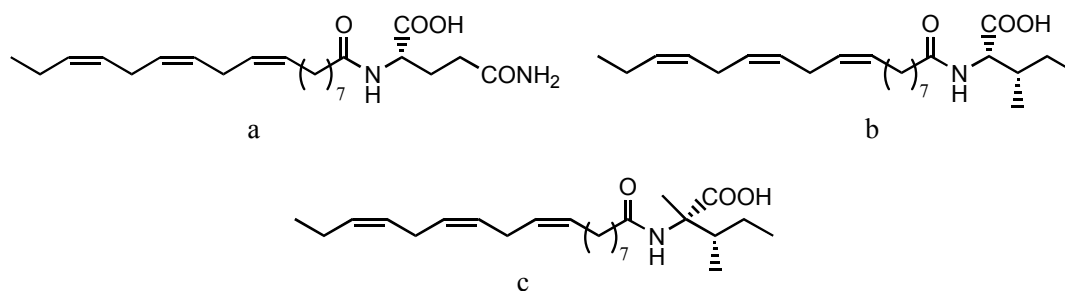


Abb. 38: (a) Linolenoyl-L-glutamin, (b) Linolenoyl-L-isoleucin und (c) das als hydrolysebeständiges Derivat synthetisierte Linolenoyl-L- α -methyl-isoleucin.

Für die Gln- und Ile-Konjugate der Linolensäure wurde bereits von KRUMM eine geringe aber signifikante Elicitoraktivität hinsichtlich der Induktion der Duftstoffbiosynthese bei *P. lunatus* gefunden.^[77] In 2 mM wässriger Lösung induzieren beide Komponenten die Emission der beiden Homoterpene DMNT und TMTT. Es ergibt sich also genau das bereits in Kapitel 3.4 für die Applikation reiner Linolensäure beschriebene Bild. Die Konjugate erweisen sich im Mittel jedoch als etwas stärkere Induktoren der Homoterpensynthese. Es ist zu klären, ob die Konjugate *per se* über elicitierende Eigenschaften verfügen, mithin eigene Signale darstellen, oder ob die nach hydrolytischer Abspaltung der Aminosäure freigesetzte Linolensäure die Induktion hervorruft. Dazu wurde ein nicht hydrolysierbares Derivat des Linolenoyl-L-isoleucins

dargestellt und auf seine Fähigkeit zur Duftstoffinduktion an der Limabohne untersucht. Es handelt sich um Linolenoyl-L- α -methyl-isoleucin (Abb. 38c), das am α -C-Atom der Aminosäure eine zusätzliche Methylgruppe trägt. Die in diesem Molekül enthaltene abgeschirmte Peptidbindung ist unter physiologischen Bedingungen praktisch hydrolysestabil.^[143] Die Verbindung wurde durch Kupplung von α -Methylisoleucin, an Linolensäure erhalten. Dabei kam, wie im letzten Schritt der Volicitinsynthese die Methode des gemischten Anhydrids zum Einsatz. Bedingt durch die hohe sterische Hinderung an der Aminogruppe des α -Methylisoleucins fielen die Ausbeuten mit ca. 10% sehr niedrig aus. Dennoch konnten 2.6 mg Produkt erhalten werden, die im folgenden für Inkubationen an der Limabohne verwendet wurden.

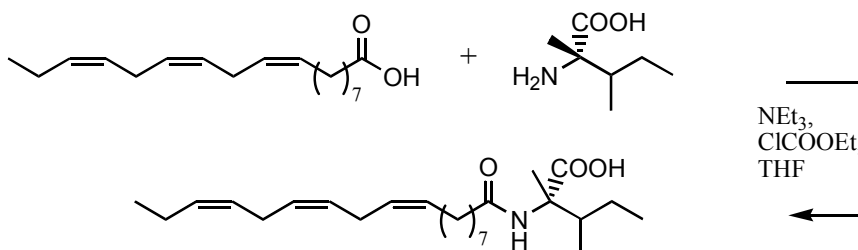


Abb. 39: Darstellung von Linolenoyl-L- α -methylisoleucin aus Linolensäure und α -Methylisoleucin.

Es zeigte sich eine vollständige Inaktivität des hydrolysestabilen Konjugats. Selbst in 2 mM Konzentration kam es nicht zu einer Induktion der Homoterpenbiosynthese bei *P. lunatus*. Gleichzeitig durchgeführte Kontrollexperimente mit 2 mM Lösungen von Linolenoyl-L-isoleucin zeigten normale Aktivität. Es ist also davon auszugehen, daß die Aktivität der Konjugate auf ihre rasche Hydrolyse unter Freisetzung von Linolensäure zurückzuführen ist. Letztere induziert dann das bereits bekannte Duftmuster, bestehend aus den beiden Homoterpenen DMNT und TMTT. Die gegenüber exogener Applikation von Linolensäure leicht erhöhte Wirksamkeit ihrer Aminosäurekonjugate könnte z. B. über veränderte Transporteigenschaften und leichtere Aufnahme der letztgenannten Verbindungen erklärt werden. Die ohnehin nur in sehr hohen „unphysiologischen“ Konzentrationen wirksamen Konjugate stellen also höchstwahrscheinlich keine eigenständigen Signale im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel dar. Analoge Ergebnisse wurden bereits für entsprechende bioaktive Aminosäurekonjugate der Jasmonsäure gefunden.^[92] Auch hier bewirkt eine schnelle Hydrolyse der Konjugate die Freisetzung von JA und damit Induktion des entsprechenden JA-responsiven Gemisches flüchtiger Verbindungen. Hydrolysestabile Konjugate der Jasmonsäure erwiesen sich als inaktiv.

3.6 Signaltransduktion nach Herbivorie

3.6.1 Einleitung

Auf einen Pathogenbefall oder auf Applikation von Pathogen-abgeleiteten Elicitoren, wie Cellulysin oder Alamethicin (vergl. Kap. 3.2), reagieren Pflanzen im allgemeinen mit einer Verstärkung ihrer verschiedenartigen Abwehrmechanismen. In ihrer natürlichen Umgebung muß sich die Pflanze jedoch nicht nur gegen mikrobielle Pathogene zur Wehr setzen. In einem beträchtlichen Ausmaß tragen Fraßschäden, bedingt durch herbivore Arthropoden (Schmetterlingslarven, Spinnmilben, Blattläuse, Blattkäfer, Heuschrecken u.a.), zur Dezimierung einer Pflanzenpopulation bei. Man unterscheidet dabei zwischen Schädlingen, die pflanzliches Gewebe verzehren (Lepidoptera-Larven oder Blattkäfer; sog. „chewing insects“) und solchen, die sich vom Zellsaft oder Phloem ernähren und diesen durch Einstiche in die Pflanze gewinnen (Spinnmilben oder Blattläuse). Beide Arten des Befalls erfolgen häufig durch große Schädlingspopulationen und führen binnen weniger Stunden oder Tage zur sichtbaren Schädigung der Pflanze. Dank der großen Vielfalt und Effizienz pflanzlicher Verteidigungsmechanismen kommt es allerdings nur in sehr seltenen Fällen zur völligen Vernichtung einer Pflanzenpopulation (z.B. Heuschreckenschwärme). Zu den faszinierendsten Strategien gegen Herbivorie gehören die induzierten indirekten Abwehrmechanismen. Die mit dieser Art der Abwehr einhergehenden induzierten biochemischen Veränderungen in der Pflanze führen über einen Umweg, meist über Einschaltung einer höheren trophischen Ebene, zur Reduktion der Herbivorenpopulation und damit zu einem Vorteil für die Pflanze. Ein Beispiel für eine solche induzierte indirekte Verteidigung ist die infolge Herbivorie verstärkte Bildung extrafloralen Nektars bei *Macaranga tanarius* (s. Kap. 3.7). Durch Steigerung des Nektarflusses werden verstärkt Fraßfeinde der Pflanzenschädlinge angelockt, so daß die Primärreaktion der befallenen Pflanze zur indirekten Reduktion der Herbivorie beiträgt. Die *de novo* Biosynthese flüchtiger Verbindungen stellt eine weitere induzierte indirekte Verteidigung höherer Pflanzen gegen Schädlingsbefall dar. Das emittierte Substanzgemisch wirkt stark attraktiv auf carnivore Arthropoden, die Duftstoff-geleitet zu ihren Beutetieren oder Wirten für ihre Larven finden. Diese Reaktion ist im Pflanzenreich sehr weit verbreitet und der ökologische Hintergrund bereits für viele der sog. tritrophischen Systeme verstanden.^[144] Massive Duftstoffemissionen nach Befall durch Schmetterlingslarven oder Spinnmilben treten z.B. bei Mais und Baumwolle, aber

auch bei der Limabohne *P. lunatus* auf (vergl. Kap. 1.2). Es ist jedoch bislang nur wenig über das hormonelle Signalgeschehen und die Art der involvierten Signalwege bekannt, die im Fall von Herbivorie in der Pflanze letztlich zur Induktion der Duftstoffbiosynthese führen. Im Verlauf einer Pathogeninfektion werden wenigstens vier verschiedene Signalkaskaden angeschaltet: I) die SA-abhängige Signalschiene, welche die systemische Resistenz der Pflanze erhöht^[40], ii) reaktive Sauerstoffspezies einschließlich Stickstoffmonoxid (NO), welche die sog. „hypersensitive response (HR)“, SA-Biosynthese und die Expression diverser verteidigungsspezifischer Gene induzieren^[145, 146], iii) Octadecanoid-abgeleitete Signale (speziell JA), die eine Vielzahl von Verteidigungsmechanismen auslösen^[147] und iv) die Ethylen-Biosynthese^[45]. Die Induktion von Resistenz gegen Herbivorie wird zumindest prinzipiell über die gleichen Signalwege vermittelt.^[41, 148] So aktiviert ein Befall durch *Trialeurodes vaporariorum* („Whitefly“) bei Tomaten sowohl JA- und Ethylen-, als auch SA-Signalwege.^[149]

Zur Erklärung der großen Vielzahl von z.T. Herbivor-spezifisch eingeleiteten Abwehrreaktionen ist es allerdings nötig, die vielfältigen Interaktionen zwischen den einzelnen Signalwegen zu berücksichtigen. Dazu ist eine stringente Bestimmung aller an den genannten Signalwegen beteiligter Schlüsselintermediate im Verlauf eines Schädlingsbefalls erforderlich. Als Modellpflanze eignet sich dafür besonders die Limabohne, da sie von einer Vielzahl von Herbivoren befallen wird, über stark differenzierte Verteidigungsmechanismen verfügt und je nach Art der Induktion ein charakteristisches Duftmuster emittiert. Außerdem ist für die Limabohne aus früheren Experimenten mit dem Pathogen-abgeleiteten Elicitor Alamethicin bereits vieles über Interaktionen zwischen den beteiligten Signalwegen bekannt (vergl. Kap. 3.3). Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst das durch Schädlingsbefall an der Limabohne induzierte Duftstoffprofil bestimmt und mit den bereits bekannten Emissionen nach Gabe von Alamethicin oder Jasmonsäure verglichen werden. Im folgenden werden wichtige pflanzliche Signalstoffe, wie JA, SA, NO und Ethylen während eines Herbivorenbefalls zeitlich quantifiziert und mögliche Interaktionen diskutiert.

3.6.2 Differentielle Duftinduktion bei der Limabohne *P. lunatus*

Die Limabohne reagiert auf Induktion durch verschiedene Elicitoren, Befall durch Lepidoptera-Larven oder Spinnmilben und exogene Applikation von Octadecanoiden, wie 12-OPDA und JA äußerst differenziert. In jedem Fall wird ein spezifisches Gemisch flüchtiger Verbindungen *de novo* biosynthetisiert und in die Gasphase abgegeben. Dabei lassen sich drei Extrema feststellen, zwischen denen jede mögliche graduelle Abstufung beobachtet wird (vergl. Abb.40).

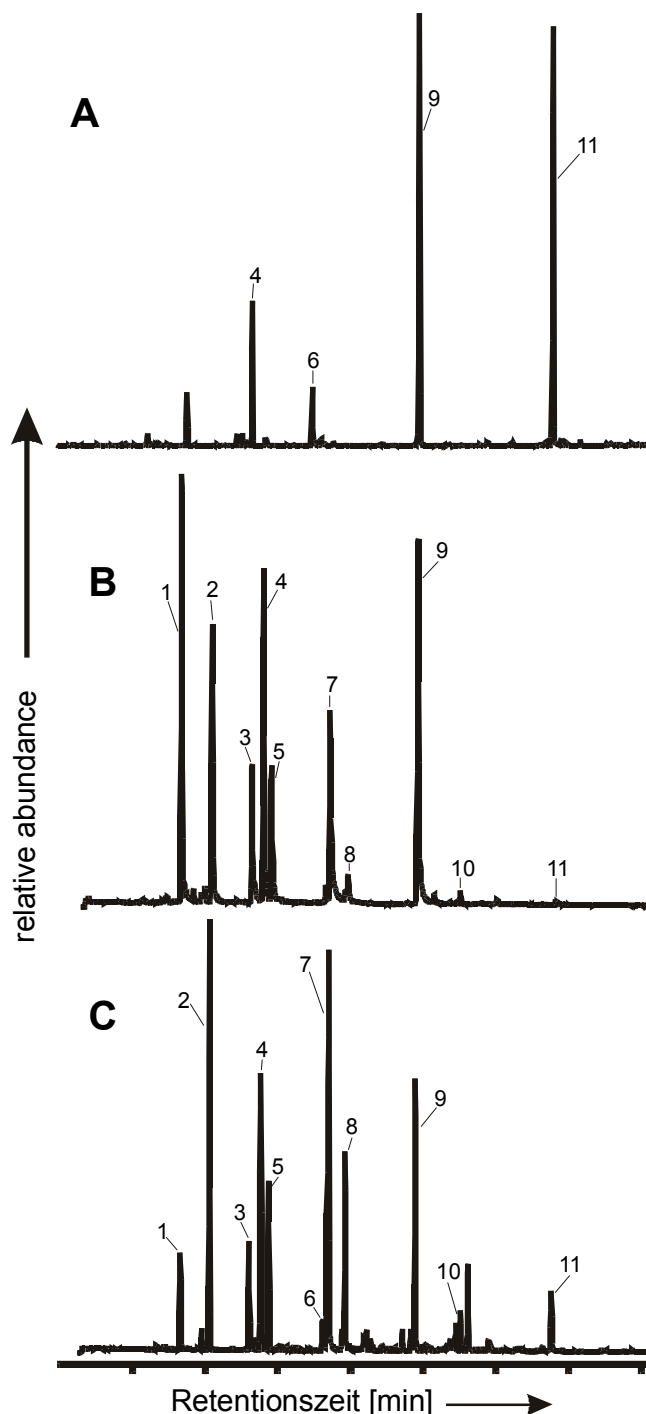


Abb. 40: Gaschromatographische Profile der während 48 h abgegebenen flüchtigen Verbindungen nach Inkubation von Limabohnen mit (A) Alamethicin (10 µg/ml), (B) Jasmonsäure (1 mM) und (C) 5 *Spodoptera exigua* Larven pro Pflanze (3. Larvalstadium). Identifikation der Verbindungen: (1) Hexenylacetat, (2) Ocimen, (3) Linalool, (4) DMNT, (5) C₁₀H₁₄, (6) Methylsalicylat, (7) C₁₀H₁₆O, (8) Valeriansäure-hexenylester, (9) IS=n-Bromdecan, (10) Caryophyllen, (11) TMTT. Duftprofile wie unter (A) werden von der Limabohne auch nach Inkubation mit Linolensäure abgeleiteten Oxylipinen oder Schwermetalllösungen beobachtet. JA-analoga (B) Duftstoffmischungen können auch durch Elicitierung von Limabohnen mit dem Proteinelicitor Cellulysin oder Indanoyliso-leucin (In-Ile) erhalten werden. Das vollständige Bouquet, wie unter (C) gezeigt wird außer durch Befall mit Lepidoptera Larven, auch durch Spinnmilbenbefall (hier mit deutlich stärkerer MeSA-Emission) oder durch Inkubation mit dem Phytotoxin Coronatin induziert. Bislang ist die Limabohne die einzige Pflanze, bei der eine derartige differentielle Duftinduktion beobachtet wird.

Die an Komponenten ärmste Mischung flüchtiger Verbindungen wird nach Elicitierung mit Ionenkanal-bildenden Peptaibolen und Verbindungen ähnlicher Aktivität emittiert (vergl. Kap. 3.2). Hier wird selektiv die Biosynthese der Homoterpene DMNT und TMTT, zusammen mit Methylsalicylat induziert (Abb. 40A). Das gleiche „reduzierte“ Bouquet wird auch durch eine Mischung Linolensäure abgeleiteter Oxylipine und in geringerer Intensität durch Linolensäure selbst und Linolensäure-hydroperoxide hervorgerufen. Nach Untersuchungen von SCHÜLER können auch Schwermetall-lösungen (z.B. von Quecksilber, Kupfer oder Cadmium) diesen Effekt auslösen.^[106] Exogene Applikation von Jasmonsäure, Cellulysin oder Indanoylisoleucin, induziert ein komplexeres Gemisch an flüchtigen Verbindungen (Abb. 40B). Die meisten Komponenten entstammen dem Terpenstoffwechsel, aber auch Lipid-abgeleitete und aromatische Verbindungen tauchen auf. Dieses Bouquet enthält zwar ebenfalls substantielle Mengen des C₁₁-Homoterpens DMNT, jedoch fehlen das Homoterpen TMTT und Methylsalicylat fast völlig. Infolge Herbivorie oder Einwirkung des Phytotoxins Coronatin^[78] beobachtet man die Emission eines Duftstoffgemisches, das als Kombination der beiden zuvor besprochenen angesehen werden kann. Es enthält in hoher Intensität alle JA-responsiven Komponenten und zusätzlich die ALA-induzierten Verbindungen TMTT und MeSA (Abb. 40C).

In ihrer Fähigkeit zur derartig differentiellen Duftinduktion ist die Limabohne bisher einzigartig. Andere untersuchte Pflanzen, wie Baumwolle, Mais, Paprika, Tabak oder der phylogenetisch alte Wurmfarne reagieren auf alle der genannten Reize mit der Emission jeweils identischer Duftbouquets, die häufig vorwiegend aus terpenoiden Verbindungen bestehen. In der Limabohne müssen also differentielle Mechanismen zur unterschiedlichen Verarbeitung der unterschiedlichen Reize vorliegen. Um diesen Unterschieden auf die Spur zu kommen, muß das hormonelle Geschehen in der Pflanze während eines Befalls durch Herbivore untersucht und mit den bereits bekannten Daten für Cellulysin und Alamethicin (s. Kap. 3.2) verglichen werden.

3.6.3 Induktion von Jasmonsäure nach Herbivorie

Ein Herbivor-bedingter Fraßschaden wird von der Pflanze als mechanische Verwundung mit zusätzlicher Erkennung spezifischer Elicitoren aus dem Salivarsekret des Schädling verarbeitet. Da bereits die mechanische Verwundung bekanntermaßen zu einem Anstieg

der endogenen Jasmonatkonzentration führt^[4] und darüberhinaus die Induktion von Duftstoffen immer mit einem Anschalten des Octadecanoidweges einhergeht, ist eine Beteiligung von Jasmonsäure am hormonellen Signalgeschehen nach Herbivorie als sehr wahrscheinlich anzusehen. Für andere Pflanzen wurde eine JA-Induktion nach Herbivorie bereits gefunden.^[147, 150] Es ist jedoch zu klären, wie hoch die erreichten endogenen Konzentrationen bei der Limabohne sind und vor allem welcher Zeitkinetik die JA-Biosynthese folgt. Um aussagekräftige und vergleichbare Daten zu erhalten, wurden Limabohnen mit drei Lepidoptera-Spezies, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens* (je 20 h Fraßdauer) und *Spodoptera littoralis* (56 h Fraßdauer) inkubiert und nach festgelegten Zeitintervallen der endogene Gehalt an Jasmonsäure bestimmt. Es wurden jeweils 5 Larven (3. Larvalstadium) pro Pflanze eingesetzt. Um sicherzustellen, daß die Larven sofort bei Beginn des Experiments mit der Fraßaktivität beginnen, wurden sie zuvor 3 h ohne Nahrung gehalten. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abb. 41 dargestellt.

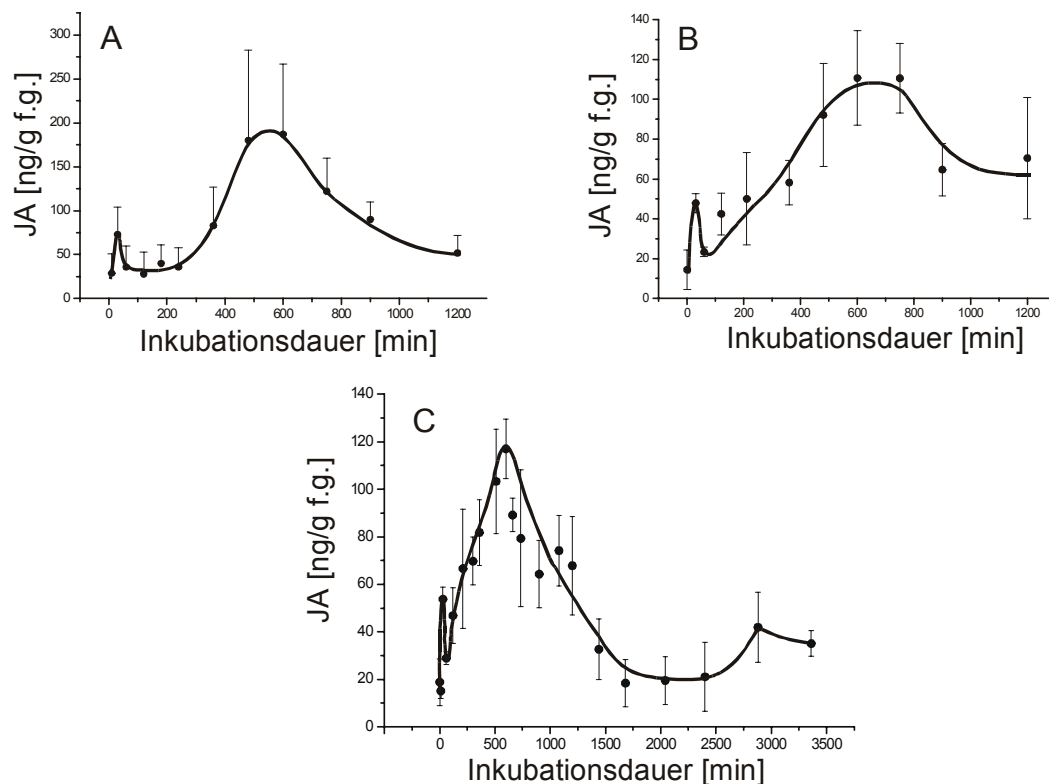


Abb. 41: Verlauf der endogenen Jasmonatkonzentration infolge Herbivorie an der Limabohne durch (A) *Spodoptera frugiperda*, (B) *Heliothis virescens* und (C) *Spodoptera littoralis*; jeweils 5 Larven (3. Larvalstadium) pro Pflanze. (C) stellt ein Langzeitexperiment mit 56 h Fraßdauer dar.

Es ist klar zu erkennen, daß in allen drei Fällen die Herbivorie an der Limabohne zu einer deutlichen Induktion der endogenen JA-Biosynthese führt. Dabei wurden zwischen den einzelnen Raupenarten keine signifikanten Unterschiede im Induktionspotential gefunden. Bereits 10 min nach Beginn der Fraßaktivität war ein deutlicher Anstieg der endogenen JA-Konzentration zu verzeichnen. Aus Verwundungsexperimenten an der Limabohne ist bekannt, daß das erste transiente Maximum, welches nach ca. 30 min erreicht wird, eine Folge der mechanischen Verwundung der Pflanzen ist.^[56] Dabei kann sowohl das Abschneiden der Pflanze als auch der einsetzende mechanische Fraßschaden als Ursache für dieses erste Maximum verantwortlich sein. Im Anschluß an das erste transiente Maximum beobachtete man zunächst einen Abfall der JA-Konzentration bis fast auf den Grundlevel von ca. 20 ng/g Frischgewicht. Während der dann folgenden starken Fraßaktivität der Larven kam es zu einer stetigen Akkumulation endogener JA, die nach ca. 10-12 h ihr Maximum von ca. 140 ng/g Frischgewicht erreichte. In allen Fällen beobachtete man bis ca. 20 h Inkubationszeit erhöhte Jasmonatspiegel. Das Langzeitexperiment (s. Abb. 41C) zeigte allerdings klar den transienten Charakter der herbivorieinduzierten JA-Induktion bei *P. lunatus*. Nach ca. einem Tag Fraßaktivität von *S. littoralis* fiel der JA-Spiegel wieder auf die Größenordnung des Grundgehaltes ab. Vergleicht man diese infolge Herbivorie beobachtete JA-Kinetik mit denen nach Inkubation von Limabohnen mit Alamethicin (s. Abb. 24) oder Cellulysin (s. Abb. 5), so erkennt man deutliche Unterschiede. Nach Herbivorie wird kein massiver schneller Anstieg der endogenen JA-Konzentration, wie nach den beiden letztgenannten Elicitoren beobachtet. Vielmehr erfolgt hier als erste Reaktion nur ein leichter verwundungsbedingter Anstieg des JA-Spiegels, der normalerweise nicht zur Induktion der Duftstoffbiosynthese ausreicht. Zu einem Zeitpunkt, bei dem sich im Fall von ALA oder Cellulysin der endogene JA-Gehalt nach Durchlaufen eines transienten Maximums bereits wieder nahe dem Grundlevel befindet, kommt es infolge Herbivorie zu einem langanhaltenden stetigen Anstieg der Konzentration endogener Jasmonsäure. Die nach 10-12 h erreichten Maximalkonzentrationen von ca. 140-160 ng/g f.g. kommen zwar bei weitem nicht an die transient von ALA induzierten 450 ng/g f.g. heran, dennoch ist die Gesamtmenge der innerhalb der ersten 24 h Herbivorie gebildeten JA größer als die entsprechende Menge nach ALA-Induktion. Diese im Verlauf der zunehmenden Fraßschädigung gebildete Menge an JA ist also höchstwahrscheinlich für die beobachtete massive Induktion JA-responsiver Duftstoffe verantwortlich. Der Octadecanoidweg wird

infolge Herbivorie deutlich induziert und stellt über viele Stunden hinweg eine vergleichsweise große Menge endogener JA zu Verfügung, die die Signaltransduktion zur Genexpression mit anschließender Duftstoffbiosynthese vermittelt. Diese Vorgänge sind dabei vollständig reversibel. Wurden die Larven von bereits induzierten Pflanzen entfernt, so beobachtete man binnen weniger Stunden eine völlige Abschaltung der Biosynthese flüchtiger Verbindungen (Abb. 42). Die Pflanze erkennt also effektiv das Ende eines Befalls und vermeidet einen unnötigen Verbrauch ihrer Ressourcen.

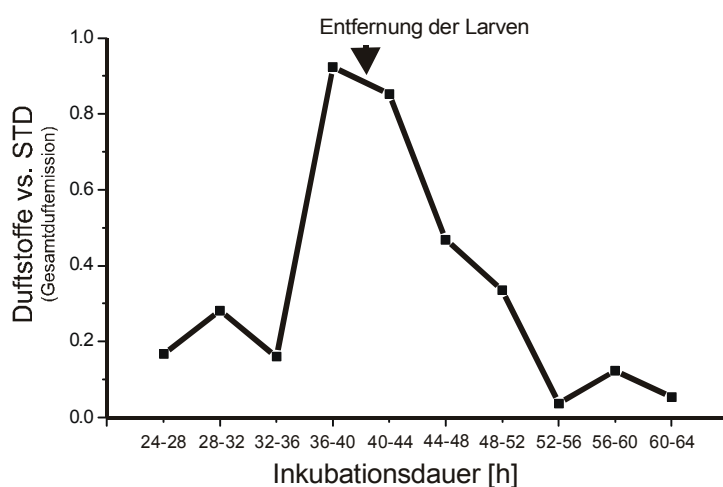


Abb. 42: Gesamtmenge abgegebener Duftstoffe (in Relation zum internen Standard, STD) während der ersten drei Tage eines Befalls von Limabohnen durch *S. frugiperda*. Nach 40 h wurden alle Larven entfernt und man beobachtete einen schnellen Abfall der Duftemission. Demgegenüber wird normalerweise am dritten Tag die größte Menge abgegebener Duftstoffe registriert.

3.6.4 Induktion von Salicylsäure nach Herbivorie

Mit Hilfe der in Kapitel 3.1.3 beschriebenen simultanen analytischen Bestimmung von Jasmonsäure und Salicylsäure wurde gleichzeitig, neben JA, auch SA infolge Herbivorie an der Limabohne zeitlich quantifiziert. Die im folgenden beschriebenen Daten wurden aus den selben Experimenten wie die Daten der JA-Bestimmungen, nach Befall von Limabohnen mit den drei Lepidoptera-Spezies *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens* und *S. littoralis* gewonnen (s. Abb. 43). Auch im Fall der SA-Induktion beobachtete man zwischen den einzelnen Spezies keine statistisch signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zur JA-Induktion begann die Herbivor-induzierte Biosynthese von Salicylsäure etwa zwei Stunden später, nahm im Verlauf weiterer Schädigung des Blattgewebes bis ca. 10-12 h nach Inkubationsbeginn stetig zu und erreichte schließlich ein Maximum von etwa 1000 ng/g f.g..

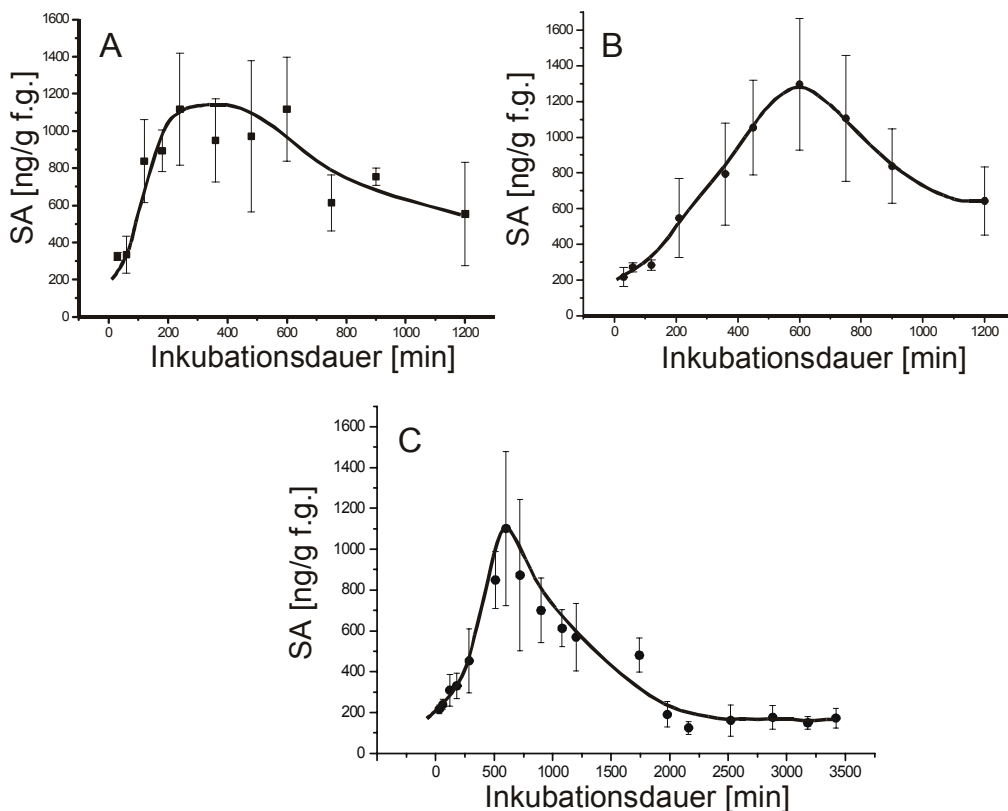


Abb. 43: Verlauf der endogenen Salicylatkonzentration infolge Herbivorie an der Limabohne durch (A) *Spodoptera frugiperda*, (B) *Heliothis virescens* und (C) *Spodoptera littoralis*; jeweils 5 Larven (3. Larvalstadium) pro Pflanze. (C) stellt ein Langzeitexperiment mit 56 h Fraßdauer dar.

Danach fiel die Konzentration endogener Salicylsäure bis 20 h nach dem Start des Experiments auf einen Wert, der in etwa dem Doppelten des Grundgehalts entspricht. Das Langzeitexperiment (s. Abb. 43C) zeigte, daß im weiteren Verlauf der Fraßschädigung der endogene SA-Spiegel weiter absinkt. Am zweiten Tag der Inkubation konnten keine erhöhten Salicylatgehalte mehr festgestellt werden. Ähnlich wie die herbivorieinduzierte JA-Produktion folgt auch die Freisetzung von Salicylsäure einem transienten Verlauf mit Maximalkonzentrationen am ersten Inkubationstag. Der Anstieg der SA-Produktion zeigt im Prinzip ein sehr ähnliches Profil wie bereits für Alamethicin gefunden (vergl. Abb. 24). Auch hier wird nach ca. 10-15 h ein Maximum erreicht. Allerdings sind die im Falle des Alamethicins zu verzeichnenden endogenen SA-Gehalte um ca. den Faktor 5 höher als nach Raupenfraß und nehmen auch nach 40-stündiger Inkubationsdauer nicht signifikant ab. Um den betragsmäßigen Unterschied im SA-Induktionspotential verschiedener Lepidoptera-Larven im Vergleich zu Alamethicin, Cellulysin und dem als elicitoraktive Substanz aus *Spodoptera*-Speichel isolierten

Volicitin (vergl. Kap. 3.5.1) besser herauszuarbeiten, wurde eine parallele SA-Bestimmung nach Inkubation von Limabohnen mit den vorgenannten Larven bzw. Elicitoren durchgeführt und nach 15 h die endogenen Gehalte an Salicylsäure bestimmt. Die so erhaltenen Daten sind zum Vergleich in Abb. 44 einander gegenübergestellt.

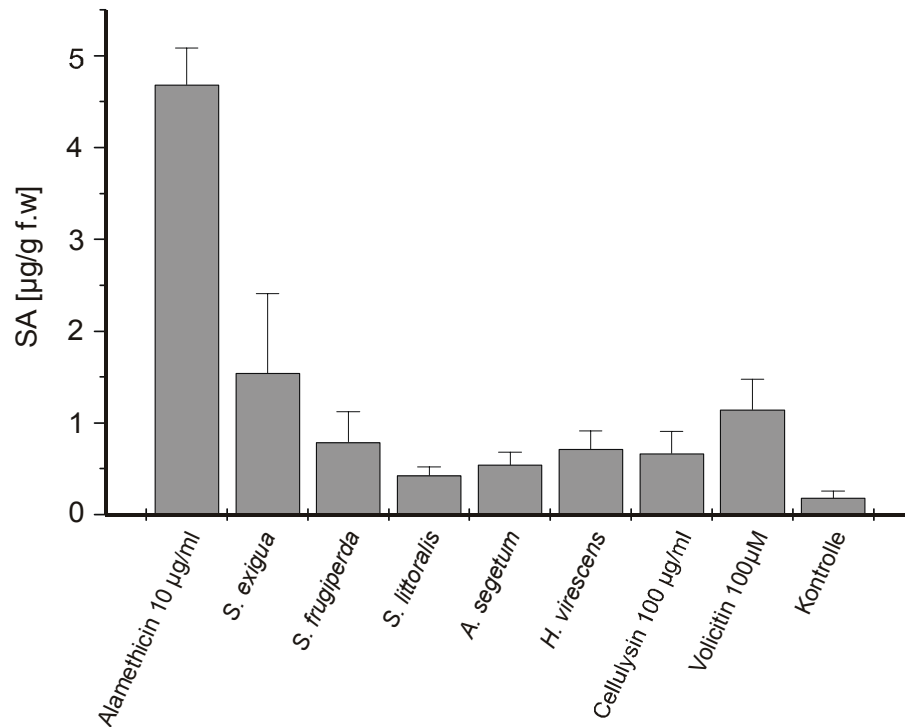


Abb. 44: Endogener Gehalt an Salicylsäure nach 15 h Inkubation von Limabohnen mit den Elicitoren Alamethicin, Cellulysin und Volicitin und nach 15 h Befall durch fünf verschiedene Lepidoptera-Spezies (3. Larvalstadium).

Es ist deutlich zu erkennen, daß Alamethicin mit 4.5 µg/g Frischgewicht die mit Abstand stärkste SA-Induktion auslöst. Die durch Herbivorie induzierten SA-Konzentrationen liegen dagegen lediglich in der Größenordnung von 1 µg/g Frischgewicht. Die einzelnen Larvenarten unterscheiden sich in ihrem Potential zur Induktion der SA-Biosynthese nicht wesentlich. Befall durch *S. exigua* löste mit ca. 1.5 µg/g Frischgewicht im durchgeführten Experiment die deutlichste SA-Akkumulation aus, während Befall durch *S. littoralis* nur zu Gehalten von ca. 0.5 µg/g Frischgewicht führte. Die statistischen Schwankungen sind allerdings z.T. zu groß, als daß man hier von signifikanten artspezifischen SA-Induktionspotentialen ausgehen könnte (Überschneidung der Fehlerbalken führt zur Insignifikanz). Interessanterweise führte die Inkubation von Limabohnen mit synthetischem Volicitin zu einer betragsmäßig ähnlichen SA-Induktion wie Schädlingsbefall selbst. Wenn auch Volicitin zumindest im System der Limabohne

nicht die Duftstoffbiosynthese eliciert, (s. Kap. 3.5.1) so bewirkt es dennoch eine deutliche Steigerung der endogenen Salicylatbiosynthese. Die Konzentration der verwendeten Volicitinlösung entsprach in etwa der Konzentration des Elicitors im Regurgitat der Larven. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß sich für die Larveninduzierte SA-Induktion nach 15 h das im Salivarsekret enthaltene Volicitin verantwortlich zeichnet. 15-stündige Inkubation von Limabohnen mit einer Lösung des Proteinelicitors Cellulysin führte ebenfalls zu einer gewissen Induktion des Salicylat-abhängigen Signalweges. Die beobachteten endogenen SA-Gehalte liegen mit etwa 0.75 µg/g Frischgewicht im Bereich der durch Herbivorie und Volicitin induzierten Beträge. Im Fall des Alamethicins ist die große Menge induzierter SA in der Lage, den Octadecanoidweg effektiv zu inhibieren, was sich in der beobachteten reduzierten Duftstoffemission äußert. Eine Inkubation von Limabohnen mit Cellulysin hat dagegen die Induktion des normalen JA-responsiven Duftstoffgemisches zur Folge. Daher ist eine endogene SA-Konzentration in der Größenordnung von 1 µg/g Frischgewicht offensichtlich für einen wirksamen Block des Octadecanoidweges nicht ausreichend. Dies erklärt ebenfalls das massive Auftreten JA-responsiver flüchtiger Verbindungen im Duftbouquet der Limabohne nach Herbivorie.

3.6.5 Induktion von Stickstoffmonoxid infolge Herbivorie

Neuere Untersuchungen zeigen, daß auch dem Stickstoffmonoxid (NO) eine signifikante Rolle bei der pflanzlichen Abwehr zukommt.^[151] NO wirkt als Neutralisator aktiver Sauerstoffspezies (Radikalfänger) und spielt damit eine wichtige Rolle bei der sog. „hypersensitive response“ (HR).^[152] Die HR-Reaktion tritt hauptsächlich nach Pathogenbefall ein und bewirkt ein kontrolliertes Absterben von Gewebe rund um den Infektionsherd. Dadurch wird eine weitere Ausbreitung der Infektion verhindert. Da die HR durch Wasserstoffperoxid und abgeleitete reaktive Sauerstoffradikale vermittelt wird, spielt NO als Neutralisator überschüssiger Radikale eine wichtige Rolle im Signalgeschehen.^[153] So induziert eine Infektion durch Tabakmosaikvirus (TMV) am Tabak eine deutlich gesteigerte NO-Synthaseaktivität.^[154] Im Gegensatz zur mittlerweile gut dokumentierten Beteiligung von NO an der Pathogenabwehr ist derzeit praktisch nichts zu seiner eventuellen Funktion bei Schädlingsbefall bekannt. Es soll also die Emission des bei Raumtemperatur metastabilen NO an der Limabohne während

Herbivorie bestimmt werden. Da die maximale zu erwartende Emission von NO an die umgebende Luft im Bereich von maximal 1-2 ppb liegt^[155], muß eine hochgradig sensitive Analytik zum Einsatz kommen. Eine solche Methode wurde von ROCKEL am Forschungszentrum Jülich etabliert. Sie nutzt die bei der Reaktion des abgegebenen NO mit zudosiertem Ozon auftretende Chemolumineszens als hochempfindliche Messgröße ($\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2 + \text{O}_2 + h\nu$) und erreicht eine Nachweisgrenze von 20 ppt.^[155] In Kooperation mit ROCKEL wurden NO-Emissionen an Limabohnen mit und ohne Befall durch Lepidoptera-Larven bestimmt. 2 Bohnenpflanzen wurden in die Meßkammer eingebracht und ihre NO-Produktion über 24 h bestimmt. Es zeigte sich tatsächlich eine geringe aber signifikante Emission von ca. 100 ppt NO im Ruhelevel. Nach 24 h wurden 12 Larven von *Spodoptera exigua* (3. Larvalstadium) auf die Pflanzen gesetzt und die NO-Emission für weitere 24 h beobachtet. Es konnte jedoch kein Effekt der auftretenden Fraßschädigung in Bezug auf die NO-Produktion festgestellt werden. Trotz der aktiv fressenden Larven wurde weiterhin eine konstante Menge von ca. 100 ppt NO an die Umgebung abgegeben. Wenn auch eine mit dem Fraßschaden einhergehende Steigerung endogener NO-Konzentrationen nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, so läßt dieses Experiment an der Limabohne dennoch nicht auf eine signifikante Beteiligung von NO am Signalgeschehen nach Herbivorie schließen.

3.6.6 Induktion von Ethylen nach Herbivorie an der Limabohne

Als weiteres wichtiges Pflanzenhormon wurde das Ethylen (Ethen) auf seine Beteiligung an Herbivor-induzierten Abwehrreaktionen bei der Limabohne getestet. Erste experimentelle Daten zur Beteiligung von Ethylen am Herbivorie-induzierten Signalgeschehen liegen bereits vor. So berichten KAHL et al. (2000) von gesteigerter Ethylenemission am Tabak nach Befall durch Larven von *Manduca sexta*.^[46] Hier soll nun am bereits gut charakterisierten System der Limabohne untersucht werden, ob und in welcher zeitlichen Kinetik ein Befall durch verschiedene Herbivore zu einer gesteigerten Emission von Ethylen führt. Eine Analytik zur Bestimmung von Ethylen ermöglicht idealerweise die kontinuierliche Untersuchung einer Einzelpflanze über lange Zeit und unterbindet störende Nebeneffekte, wie sie bei diskontinuierlicher Probennahme (z.B. bei GC-MS-Analytik) auftreten. Voraussetzung dafür ist ein Meßverfahren, welches geringste Mengen des Spurengases (sub ppb-Bereich) schnell und kontinuierlich

nachzuweisen erlaubt. Für diese Anforderungen hat sich die Photoakustikspektroskopie als besonders leistungsfähiges Werkzeug erwiesen.

Exkurs: Photoakustikspektroskopie zur Bestimmung von Spurengasen ^[79]

Der photoakustische Spurengasnachweis basiert auf der Tatsache, daß praktisch alle Moleküle im mittleren infraroten Wellenbereich (2-15 μm) ein Absorptionsspektrum besitzen, das durch die Übergänge zwischen diskreten Rotations-Schwingungszuständen charakterisiert wird. Dieser „Fingerabdruck“ eines Moleküls wird bei verschiedenen IR-spektroskopischen Verfahren zum Nachweis genutzt. Es kommen vor allem Absorptionstechniken zum Einsatz, die die Konzentrationsabhängigkeit der Abschwächung einer eingestrahnten IR-Intensität beim Durchgang durch das Probenvolumen ausnutzen (Lambert-Beersches Gesetz). Bei Konzentrationen im ppb-Bereich (10^{-9}) ist der Grad der Abschwächung allerdings sehr gering, so daß genaue Messungen unrealistische Probenvolumina von mehreren Kubikkilometern erfordern würden. Eine alternative Möglichkeit besteht darin, die von den Molekülen absorbierte Strahlung zu messen. Dies leistet der photoakustische Effekt, der auf der Ausbildung von Schallwellen in einer Gasprobe nach der Strahlungsabsorption beruht. Schwingungsangeregte Moleküle relaxieren bei Normaldruck bevorzugt strahlungslos durch Stöße und die optische Anregungsenergie wird so in kinetische Energie der Moleküle (=Wärme) umgewandelt. Bei einer Modulation der Strahlungsintensität (z.B. mit einem zwischen Laser und Messzelle geschalteten mechanischen drehbaren Chopper) entstehen periodische Temperaturfluktuationen in der Gasprobe, was zur Ausbildung einer Schallwelle im Probenvolumen führt (Abb. 45).

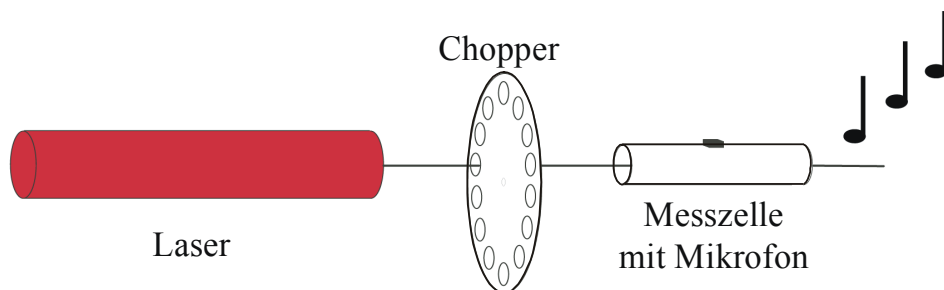


Abb. 45: Aufbau eines PA-Spektrometers. Laserstrahlung geeigneter Wellenlänge wird mit einem Chopper amplitudenmoduliert. Spurengasmoleküle in der Messzelle absorbieren einen Bruchteil der Strahlung. Dadurch entsteht eine Schallwelle, die mit dem Mikrofon aufgezeichnet wird (Abb. mit freundlicher Genehmigung entnommen aus ^[79]).

Während die entsprechenden Temperaturschwankungen nur im Bereich weniger μK liegen, läßt sich das Schallsignal mit einem empfindlichen Mikrofon messen. Die Amplitude der registrierten Schallwelle ist dabei der absorbierten Energie (und damit der Zahl der absorbierenden Moleküle und der Laserleistung) proportional. Um spezifisch einen Analyten in einer komplexen gasförmigen Matrix zu erfassen, muß die Emissionswellenlänge des gewählten Lasers mit einer charakteristischen Hauptabsorptionslinie des zu bestimmenden Spurengases übereinstimmen. Diese Bedingung stellt eine der Haupteinschränkungen für die universelle Anwendbarkeit der Photoakustik zur Spurengasanalytik dar. Die verwendeten leistungsstarken IR-Gaslaser sind nur auf einzelnen Linienübergängen abstimmbare, so daß man auf zufällige Koinzidenzen mit den Absorptionslinien der nachzuweisenden Moleküle angewiesen ist. Für den Ethylen-Nachweis erscheint die PAS allerdings wie maßgeschneidert, da dieser Analyt eine extrem starke Absorption genau im abstimmbaren Bereich des CO_2 -Gaslasers aufweist. Es wird dadurch eine Nachweisgrenze von bis zu 30 ppt in einem Probenvolumen von 10 cm^3 erreicht. Der charakteristische Fingerabdruck des Moleküls auf den Linien des CO_2 -Lasers erlaubt zudem eine einfache Identifizierung des Ethylens in einer komplexen Gasmischung. Die Konzentration des enthaltenen Ethylens wird generell aus der Differenz der Mikrofonssignale zweier unterschiedlich stark absorbierender Laserlinien bestimmt, wodurch Beiträge anderer Gase eliminiert werden können. Neben der hohen Nachweisempfindlichkeit ist die nicht-invasive und kontinuierliche Messung ein wichtiger Vorteil des Verfahrens. Zur Messung läßt man das Meßgas bei Normaldruck durch die photoakustische Zelle strömen. Das geringe Volumen dieser Zelle erfordert nur kleine Probenmengen und ermöglicht durch den schnellen Gasaustausch Messungen bei hoher Zeitauflösung (eine Messung pro 3 min). Diese Eigenschaften machen die Photoakustik bei Ethylenbestimmungen im pflanzenphysiologischen Bereich zur Methode der Wahl. Durch die Wahl geeigneter Laser sind jedoch auch andere in vielen Bereichen bedeutende Spurengase, wie Isopren, Methan, Ethan oder Kohlendioxid, mit Hilfe der PA-Spektroskopie erfassbar.

Das verwendete PA-Spektrometer wird von KÜHNEMANN vom Institut für angewandte Physik der Universität Bonn betrieben und verfügt über zwei Meßzellen. Es arbeitet daher im Zweikanalmodus. Daher ist es möglich, zur gleichen Zeit die

Ethylenkonzentration in zwei Probenkammern (z.B. befallene Pflanze und Kontrolle) zu bestimmen und ggf. miteinander zu verrechnen. Einen schematischen Aufbau der Versuchsanordnung zur Bestimmung von Ethylen zeigt Abb. 46.

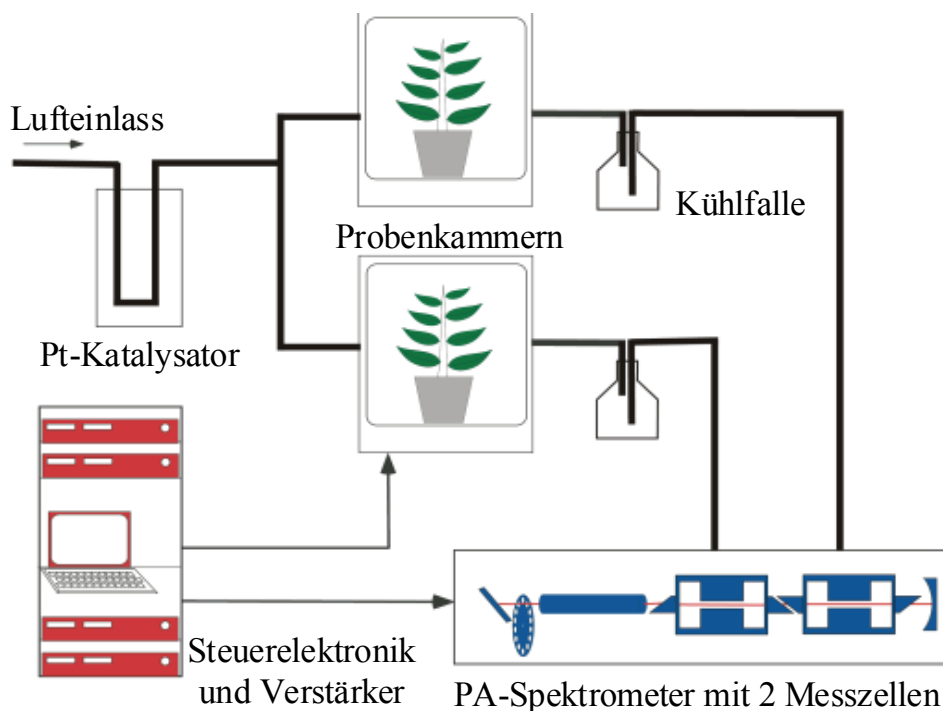


Abb. 46: Aufbau zur photoakustischen Bestimmung von Ethylen. Diese Zweikanalanordnung erlaubt die gleichzeitige Bestimmung von Ethylen aus zwei Probenkammern (Abbildung mit freundlicher Genehmigung entnommen aus^[79]).

Durch den Lufterlaß strömt Umgebungsluft in das System ein. Zur Entfernung aller organischen Moleküle wird die Luft bei 400°C über einen Platinkatalysator geleitet, bevor sie in die beiden Probenkammern eintritt. Die Probenkammern sind gläserne Gefäße von ca. 2.5 – 4.0 l Volumen. Sie befinden sich in einer Klimakammer, in denen die Luftfeuchtigkeit und Lichtverhältnisse definiert einstellbar sind. Nach Passieren der Probenkammern werden die beiden Gasströme durch Kühlfallen geleitet, was durch Ausfrieren zur Beseitigung von Kohlendioxid und größeren organischen Molekülen (z.B. von den Pflanzen abgegebene Duftstoffe) führt. Schließlich wird die Ethylenkonzentration der beiden Probenkammern in den beiden PA-Meßzellen unabhängig voneinander gemessen. Die Verarbeitung und Registrierung der Daten erfolgt rechnergestützt.

Mit Hilfe dieser meßtechnischen Anordnung wurden Limabohnen auf ihre Fähigkeit zur Ethylenemission infolge Herbivorie getestet. Je vier frischgeschnittene Limabohnenpflanzen wurden in Leitungswasser eingestellt und die Anordnungen in die Probenkammern überführt. Nach Abklingen des „Wundethylens“, welches infolge des Abschneidens der Pflanzen während der ersten 1-3 h regelmäßig zu beobachten ist, wurden 20 Larven von *Spodoptera frugiperda* (3. Larvalstadium) in eine der Probenkammern gesetzt. Die Ethylenemissionen der befallenen und der unbefallenen Pflanzen wurden dann zeitgleich und kontinuierlich über einen Zeitraum von sechs Tagen verfolgt. Es zeigte sich, daß Befall durch Lepidoptera-Larven tatsächlich eine deutliche Steigerung der Ethylenbiosynthese und -emission in die Gasphase induziert (s. Abb. 47). Ein klar erkennbarer Anstieg der Ethylenkonzentration in der Probenkammer mit den befallenen Pflanzen setzte bereits ca. zwei Stunden nach Beginn der Fraßaktivität ein.

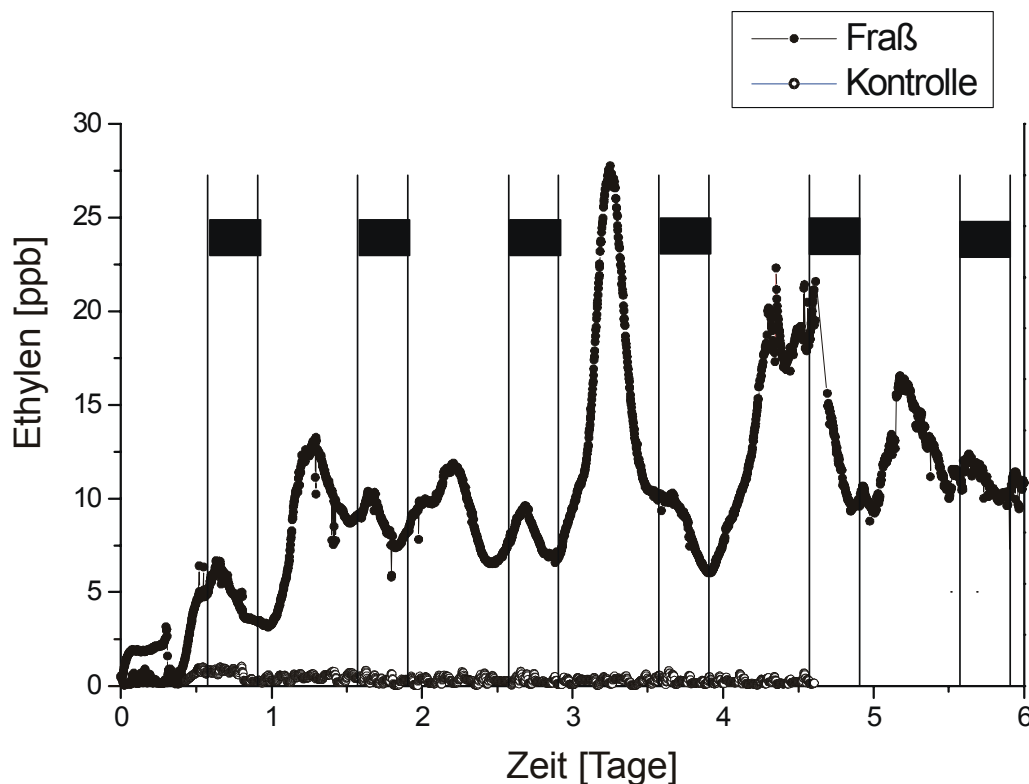


Abb. 47: Verlauf der Ethylenemission nach Befall von Limabohnen mit Larven von *Spodoptera frugiperda* (3. Larvalstadium, 5 Tiere / Pflanze). Die Emission folgt einer tageszeitabhängigen Rhythmik und weist ein deutliches Maximum am dritten Tag der Inkubation auf.

Am Ende der ersten Photophase wurde ein transientes Maximum der Ethylenemission durchlaufen, dem dann ein deutlich kleineres Maximum während der Dunkelperiode folgte. Diese rhythmische Ethylenemission mit zwei aufeinanderfolgenden Maxima innerhalb 24 h wurde für die gesamte Dauer des Experiments (6 Tage) beobachtet. Die Maximalmenge an emittiertem Ethylen trat am dritten Tag auf. Hier wurden während der Photophase Ethylenkonzentrationen von bis zu 30 ppb beobachtet. Im Vergleich dazu war die Ethylenemission der unbefallenen Kontrollpflanzen konstant und lag für die gesamte Dauer des Experiments bei <1 ppb. Herbivorie durch Blattgewebekonsumierende Schädlinge wie *Spodoptera*-Larven verursacht in der Limabohne tatsächlich eine gesteigerte Ethylenbiosynthese. Darüberhinaus erfolgt die Emission rhythmisch und zeigt einen circadian-biphasischen Verlauf mit Maximalemission an Tag drei des Befalls.

Um zu klären, ob auch andere Arten der Herbivorie an der Limabohne eine charakteristische Ethylenemission bewirken, wurde das gleiche Experiment mit Spinnmilben (*Tetranychus urticae*) wiederholt. Spinnmilben zählen nicht zu den Gewebekonsumenten. Sie stechen mit ihren stilettartigen Mundwerkzeugen in eine Pflanzenzelle und saugen sie aus. Auf die zu untersuchenden vier frischgeschnittenen Limabohnenpflanzen wurden ca. 600 Milben gegeben und die Ethylenkonzentration wie oben im Vergleich zu vier unbefallenen Pflanzen gemessen. Das Ergebnis der dreitägigen Studie ist in Abb. 48 dargestellt. Man erkennt wieder eine deutliche Steigerung der Ethylenbiosynthese bei den Spinnmilben-befallenen Bohnen im Vergleich zu den unbefallenen Kontrollen. Interessanterweise wiederholte sich auch der rhythmische Verlauf der Emission. Wieder beobachtete man ein transientes Maximum der Ethylenkonzentration während der Photophase, gefolgt von einem weiteren zu Beginn der Dunkelperiode. Allerdings war die Gesamtmenge an produziertem Ethylen mit Peakwerten von 8-9 ppb deutlich geringer als die nach Spodopterafraß beobachteten Konzentrationen.

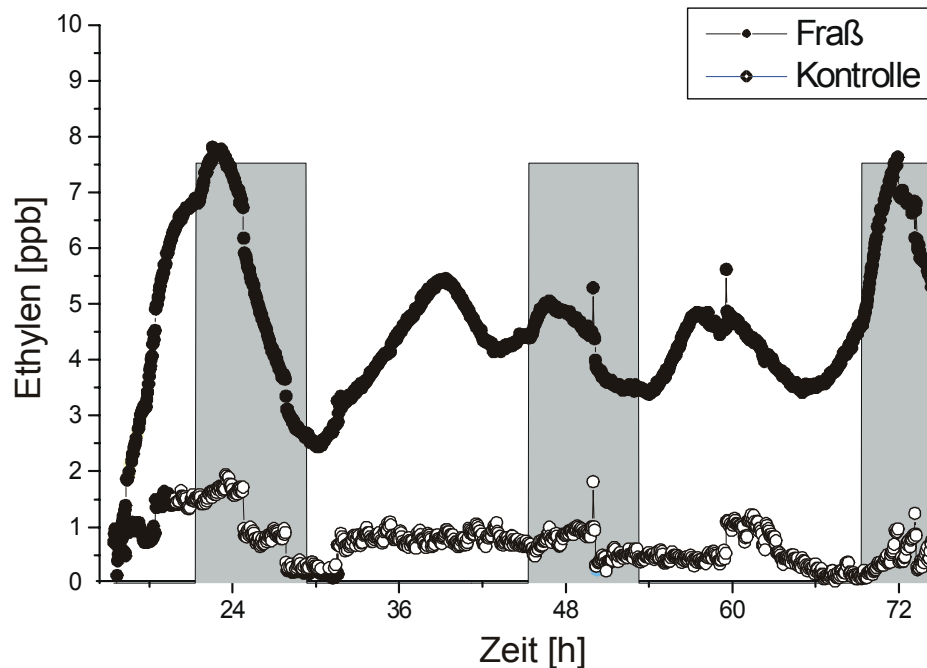


Abb. 48: Verlauf der Ethylenemission nach Befall von Limabohnen mit Spinnmilben (*T. urticae*, 600 Tiere / 4 Pflanzen). Wie bei Raupenfraß beobachtet folgt die Emission einer tageszeitabhängigen Rhythmik mit jeweils einem Maximum während der Photophase und einem zu Beginn der Dunkelperiode. Die Gesamtmenge an emittiertem Ethylen ist allerdings geringer als nach Befall mit *S. frugiperda*.

Unterschiedliche Arten von Herbivorie bewirken in der Limabohne eine deutlich gesteigerte Ethylenbiosynthese, die darüberhinaus einer charakteristischen Periodizität folgt. Diese Beobachtung steht im klaren Gegensatz zu den für die Pathogen-abgeleiteten Elicitoren Cellulysin und Alamethicin erhaltenen Ergebnissen (vergl. Kapitel 3.2). Hier bewirkt Inkubation mit entsprechenden Lösungen der Elicitorpräparationen lediglich einen raschen transienten Anstieg der Ethylenproduktion. Bereits ca. 10 h nach Alamethicinapplikation ist wieder der Ethylen-Grundlevel erreicht und es zeigt sich keine Tendenz für eine periodische Emission (vergl. Abb. 26). Eine Periodizität im Fraßverhalten der eingesetzten Herbivorenarten konnte nicht festgestellt werden und ist für derart unterschiedliche Spezies auch nicht in gleicher Weise zu erwarten. Die genaue Rolle des Ethylens bei der pflanzlichen Abwehr der Limabohne ist allerdings noch weitgehend unbekannt. In *A. thaliana* bewirkt eine verstärkte Ethylenemission die Modulation der Genexpression nach Pathogenbefall.^[156] Die von *M. sexta* induzierte Ethylenbiosynthese in Blättern von *Nicotiana tabacum* hat einen antagonistischen Effekt auf die JA-gesteuerte Nikotinbiosynthese und reduziert dadurch die Effektivität der pflanzlichen Abwehr.^[46]

Interessanterweise ist die Ethylenemission nicht die einzige Reaktion der Limabohne auf Herbivorie, die einer gewissen Periodizität folgt. Auch die Emission der durch Raupenfraß induzierten Duftstoffe verläuft rhythmisch. Dabei wird der größte Teil der Duftstoffe im Verlauf der Photophase abgegeben und ähnlich wie bei *S. frugiperda* induzierter Ethylenproduktion liegt das Maximum der Duftstoffbiosynthese nach Befall durch *Spodoptera*-Larven am dritten Tag (J Engelberth pers. Mitteilung). Diese Periodizität der Duftstoffproduktion ist ebenfalls für Herbivor-geschädigte Mais, Baumwoll- und Tabakpflanzen bekannt.^[157-159] Ob die rhythmische Emission von Duftstoffen und die periodische Ethylenemission ein gemeinsames regulatorisches Element besitzen und ob die Ethylenbiosynthese über eine positive Rückkopplung mit dem JA-Signalweg verknüpft ist, werden zukünftige Studien zeigen.

3.6.7 Interpflanzliche Kommunikation – Gibt es „Talking Beans“?

Die Vielzahl der induzierbaren flüchtigen Verbindungen, die eine Pflanze an ihre Umgebung abzugeben vermag hat schon seit längerer Zeit zur Aufstellung von Hypothesen zur interpflanzlichen Kommunikation geführt. Zusätzlich zur Funktion als Lockstoffe für carnivore Predatoren werden einzelnen flüchtigen Komponenten Eigenschaften als Mediatoren der Kommunikation von Pflanze zu Pflanze zugeschrieben. Die Grundidee basiert auf der Annahme, daß durch Pathogene oder Herbivore befallene Pflanzen diese Information durch flüchtige Verbindungen an ihre eventuell noch unbefallenen Nachbarpflanzen weitergeben, die dann vorzeitig alarmiert ihre Abwehrmaßnahmen einleiten können. Mittlerweile fehlt es nicht an Hinweisen, die diese Hypothese stützen und für einige Verbindungen ist ihre Funktion zur interpflanzlichen Kommunikation zumindest in höheren Konzentrationen gut dokumentiert. So berichten FARMER und RYAN über eine Induktion von Proteinase-Inhibitor-(PI)-Genen in der Tomate nach Begasung mit Methyljasmonat, welches bei vielen Pflanzen als Nebenkomponekte im emittierten Duftbouquet auftritt.^[160] Nach Ergebnissen von BRUIN et al. sind Bohnen und Baumwollpflanzen, die über längere Zeit den Duftstoffen ausgesetzt waren, die von Spinnmilbeninfizierten Pflanzen jeweils gleicher Art emittiert wurden, besser gegen einen Befall durch Spinnmilben geschützt als Pflanzen die diese „Vorwarnung“ nicht erfahren haben.^[161, 162] Auch für Methylsalicylat wird eine Funktion als Infochemikalie angenommen.^[27] In Empfängerpflanzen wird MeSA wieder zu SA hydrolysiert und induziert so die systemische Resistenz gegen Pathogene, die eine

Nachbarnpflanze befallen haben. BIRKETT et al. fanden, daß Bohnenpflanzen, die mit *cis*-Jasmon, einem flüchtigen Abbauprodukt der JA, begast wurden, ihrerseits zur Duftstoffproduktion angeregt werden.^[26] In einer kürzlich erschienenen Arbeit berichten ARIMURA et al., daß unbefallene Limabohnen, die windabwärts von mit Spinnmilben befallenen konspezifischen Pflanzen stehen, fünf Verteidigungs-spezifische Gene verstärkt exprimieren.^[163] Diese Gene bilden ein Subset der in den real befallenen Bohnenpflanzen exprimierten Abwehrgene. Das von Spinnmilben-befallenen Bohnen emittierte Duftbouquet ähnelt in seiner Zusammensetzung stark dem durch Lepidoptera-Larven induzierten (vergl. Abb. 40). Durch Exposition von unbefallenen Limabohnen mit synthetischen Reinstoffen fanden ARIMURA et al. weiterhin, daß für die Induktion dieser Abwehrgene im Wesentlichen wenigstens drei Komponenten des emittierten Bouquets verantwortlich zeichnen. Für die bereits mehrfach erwähnten Homoterpene DMNT und TMTT, sowie für Ocimen konnte eine deutlich Genexpressions-induzierende Wirkung gefunden werden.

Im Verlauf ihrer Experimente fanden ARIMURA et al. auch Hinweise auf eine durch Duftstoffe vermittelte induzierte Expression von Genen des Ethylenbiosyntheseapparates. Es ist also interessant zu untersuchen, ob das Duftbouquet von mit Spinnmilben befallenen Limabohnen („Emitterpflanzen“) in unbefallenen konspezifischen Empfängerpflanzen die Ethylenbiosynthese induziert. Unter Ausnutzung der Photoakustikspektroskopie (vergl. Kap. 3.6.6) und Verwendung einer Anordnung wie in Abb. 49 dargestellt, ließ sich diese Frage beantworten. Dabei kam das gleiche Zweikanal-PA-Spektrometer wie zuvor beschrieben zum Einsatz, jedoch unter Verwendung dreier Probenkammern. Die erste Kammer enthielt stark von Spinnmilben befallene Limabohnen und wurde mit einem Fluß von 2 l/h katalytisch gereinigter Luft durchströht. Hinter dieser Kammer wurde der Luftstrom 1:1 geteilt. Die mit den Duftstoffen und Ethylen der Emitterpflanzen angereicherte Luft floß mit je 1 l/h durch eine leere Probenkammer und eine Probenkammer, die vier frischgeschnittene unbefallene Limabohnen in Leitungswasser enthielt. Die Ethylenkonzentrationen beider Ströme wurden nach Passieren der Kühlfalle unabhängig voneinander in den beiden photoakustischen Zellen aufgezeichnet.

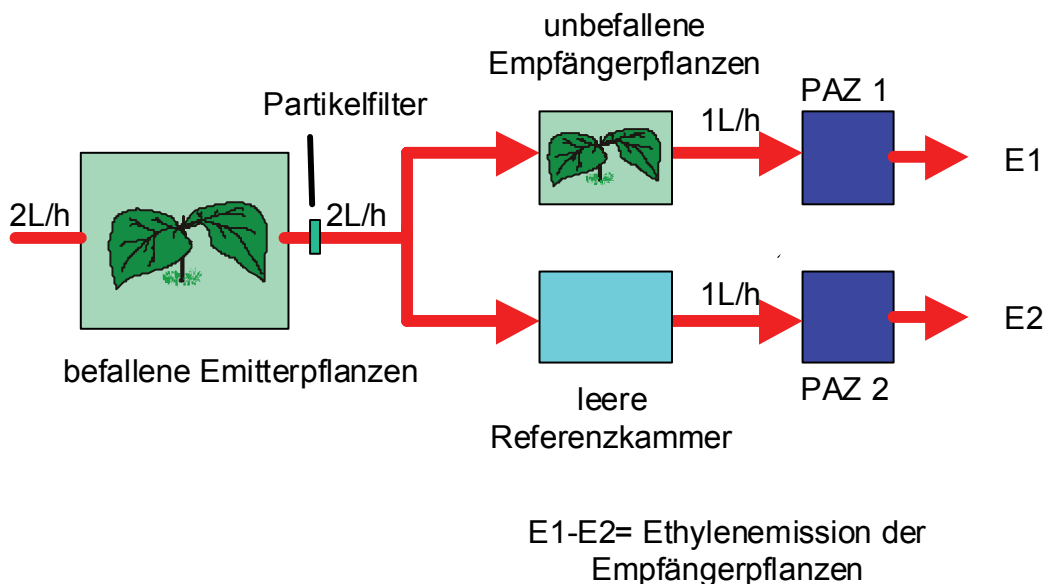


Abb. 49: Versuchsanordnung zur Demonstration der duftvermittelten Ethyleninduktion bei unbefallenen Empfängerpflanzen. Deren Ethylenemission ergibt sich aus der Differenz der in den beiden photoakustischen Zellen (PAZ) registrierten Ethylenkonzentrationen. Ein der ersten Probenkammer nachgeschalteter Partikelfilter verhindert die Kontamination der Empfängerpflanzen mit Spinnmilben oder deren Absonderungen.

Die Ethylenkonzentration, die aus der leeren Referenzkammer ausströmt, entspricht der Menge die von den Emittierpflanzen infolge Herbivorie abgegeben wurde (vergl. Kap. 3.6.6). Die Ethylenmenge, die auf dem anderen Kanal registriert wird, entspricht ebenfalls dieser Konzentration plus eines eventuellen Beitrages von den unbefallenen Bohnen aus der korrespondierenden Probenkammer. Die Ethylenmenge, die von den Empfängerbohnen infolge Duftstoffperzeption abgegeben wird, berechnet sich also aus der gemessenen Differenz der Ethylenkonzentrationen der Kanäle 1 und 2. Es zeigte sich, daß die Empfängerpflanzen tatsächlich bereits kurze Zeit nach Inkubationsbeginn eine kleine aber signifikante Menge Ethylen emittieren (Abb. 50). Über mehrere Tage hinweg blieb die Ethylenemission der Empfängerpflanzen deutlich nachweisbar und steuerte maximal etwa 3 ppb zum Gesamtethylen in der Messkammer bei. Die emittierte Ethylenmenge der Empfängerpflanzen war dabei signifikant größer als die Menge, die in einem wenige Tage später durchgeführten Kontrollexperiment von entsprechenden gleichartigen unexponierten Pflanzen abgegeben wurde (hier <1ppb). Außerdem brach die Ethylenbiosynthese der Empfängerpflanzen im Verlauf weniger Stunden ein, nachdem die Kammer mit den Emittierpflanzen aus dem System ausgekoppelt wurde.

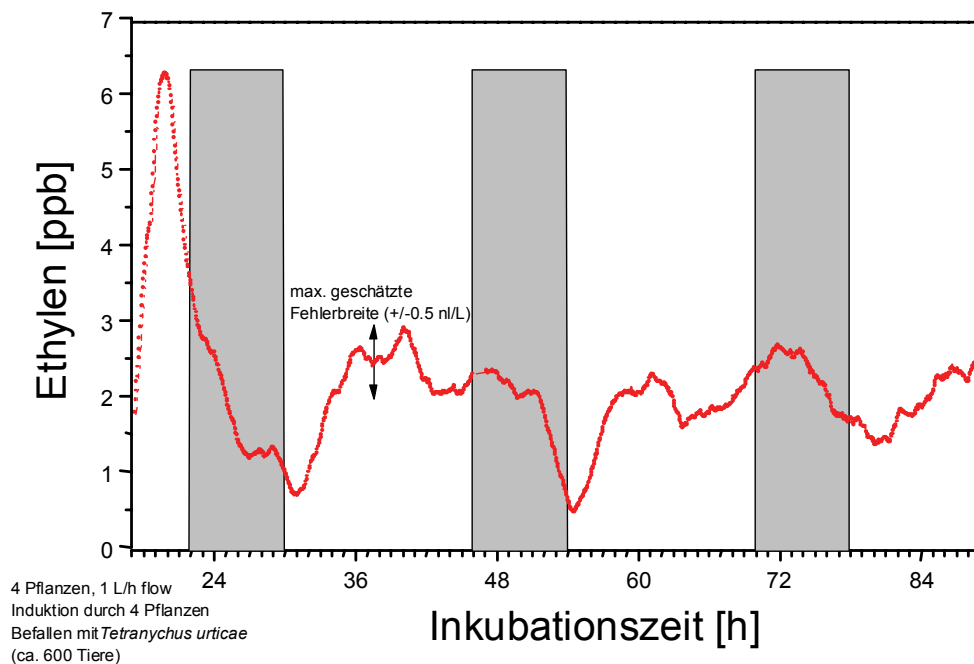


Abb. 50: Ethylenemission von unbefallenen Empfängerpflanzen, die in einer Anordnung wie unter Abb. 49 gezeigt, dem Duft von Spinnmilben-befallenen konspezifischen Limabohnen ausgesetzt sind. Das erste erkennbare Maximum repräsentiert lediglich einen Teil des infolge Abschneidens der Pflanzen emittierten sog. „Wundethylen“. Das Maximum der duftinduzierten Ethylenemission liegt bei ca. 3 ppb. Zusätzlich erkennt man eine gewisse tageszeitabhängige Rhythmik der induzierten Ethylenproduktion. Minima treten jeweils in den frühen Stunden der Photophasen auf. Die bereits durch direkten Spinnmilbenbefall induzierten beiden Maxima zur Tagesmitte und zum Beginn der Dunkelperiode sind andeutungsweise zu erkennen (vergl. Kap. 3.6.6).

Zusammen mit den Ergebnissen von ARIMURA et al. deuten alle Hinweise stark auf eine duftvermittelte Induktion der Ethylenbiosynthese hin. Unbekannt ist aber nach wie vor, welche Komponenten aus der Duftmischung für diese Ethyleninduktion verantwortlich sind. Natürlich kann es sich um eine autokatalytische Ethylen / Ethylen-Induktion handeln. Aus ökologischer Sicht erscheint diese Möglichkeit jedoch wenig sinnvoll, da es in der Natur durch gegenseitige Induktion zu einer ständigen Steigerung der Ethylenemission aller Pflanzen käme. Es ist eher denkbar, daß einige Komponenten der infolge Herbivorie emittierten höheren organischen Verbindungen als Induktoren wirken. Da viele dieser Substanzen nicht spezifisch für die Limabohne sind, sondern auch von anderen Pflanzenarten emittiert werden können, ist ebenfalls eine inter-Spezies-Kommunikation denkbar. Die Ergebnisse weisen augenscheinlich in die gleiche Richtung, wie die molekularbiologischen Daten von ARIMURA et al.. Dennoch sind weitere Experimente, insbesondere mit reinen synthetischen Komponenten des Limabohnen-typischen Duftbouquets, zur Ethyleninduktion nötig, um den beobachteten

Effekt besser deuten zu können. Auch Experimente mit verschiedenen Elicitoren, wie JA oder Alamethicin, die in der Limabohne charakteristische Duftprofile induzieren (vergl. Abb. 40), können sich als sehr hilfreich erweisen.

Mittlerweile scheint klar zu sein, daß eine Exposition von Limabohnen zum Duftgemisch, welches von entsprechenden induzierten Emittierpflanzen abgegeben wird, nicht zur Auslösung der Duftstoffbiosynthese in den Empfängerpflanzen führt. Dies wird durch das folgende Experiment deutlich. Werden frischgeschnittene Limabohnen in eine wässrige Lösung von dideuterierter 1-Deoxy-D-xylulose (2 mg/ml) eingestellt, so wird dieses Intermediat der Mevalonat-unabhängigen Terpenbiosynthese^[52] bei anschließender Induktion der Pflanzen (z.B. durch JA oder Raupenfraß) normalerweise in einen Großteil der emittierten Terpene eingebaut.^[164] Diese Verbindungen weisen dann ein spezifisches vorhersagbares Deuterierungsmuster auf und sind durch Analyse per GC-MS leicht von den „normalen“ undeuterierten Komponenten zu unterscheiden. Zur Entscheidung, ob der Duft einer durch Raupenfraß induzierten Limabohne eine unbefallene benachbarte Kontrollpflanze selbst zur Duftstoffbiosynthese anzuregen vermag, läßt sich dieser Effekt ausnutzen. Vier frischgeschnittene Limabohnen wurden in Leitungswasser gestellt und die Anordnung in eine gläserne Probenkammer (V = ca. 4 l) überführt. Auf diese Emittierpflanzen wurden zur massiven Induktion der Duftstoffbiosynthese 20 Larven von *S. littoralis* gesetzt. Auf ein darübergespanntes Netz aus Gaze wurden dann vier nichtinduzierte Limabohnen, die in einer Lösung aus 2 mg/ml 1-Deoxy-[5,5-²H₂]-D-xylulose eingestellt waren, gegeben. Der verwendete isotopenmarkierte Terpenvorläufer wurde von A JUX synthetisch erhalten.^[165] In diesem geschlossenen System wurde der Gasraum für 48 h per CLS überwacht und alle emittierten Duftstoffe gesammelt. Nach Ablauf der Inkubationsdauer war ein starker Geruch festzustellen, der auf eine große Menge Herbivor-induzierter Duftstoffe hinwies. Massenspektrometrische Analyse des CLS-Filtereluates bestätigte dies. Im entsprechenden gaschromatographischen Profil konnten allerdings nur die undeuterierten Duftkomponenten gefunden werden. Das völlige Fehlen deuterierter Terpene im Duftbouquet beweist klar, daß die Empfängerpflanzen, trotz vorliegender hoher Duftkonzentrationen, nicht induziert wurden. Eine Duftexposition von Limabohnen führt nicht zur Induktion der Terpenbiosynthese. Aus ökologischer Sicht ist dies wieder eine

sinnvolle Reaktion, da sich anderenfalls Duftstoffemissionen unnötigerweise gegenseitig autokatalytisch verstärken würden.

3.6.8 Blattlausbefall induziert die Duftstoffbiosynthese bei Paprika und Aubergine

Wie bereits mehrfach erwähnt, ist die Induktion der Biosynthese von flüchtigen Verbindungen als Reaktion auf Herbivorie bei vielen Pflanzen weit verbreitet. Die emittierten Duftstoffe wirken dabei hochattraktiv auf entsprechende Predatoren, die die Herbivorenpopulation durch Fraß oder Parasitierung dezimieren. Auch Blattläuse (*Macrosiphum euphorbiae*), die auf Paprika- (*Capsicum annuum*) oder Auberginenpflanzen (*Melongena esculentum*) fressen, werden bevorzugt von Wespen parasitiert.^[166] In einem Kooperationsprojekt mit U WYSS von der Universität Kiel konnten viele der im emittierten Bouquet der Paprika und der Aubergine enthaltenen Duftstoffe identifiziert werden. Als Reaktion auf dreitägigen Befall mit 200 adulten Blattläusen emittierte eine Paprikapflanze (*Capsicum annuum*) große Mengen zum Teil ähnlicher Verbindungen wie die Limabohne. Ein gaschromatographisches Profil der gesammelten Duftstoffe ist in Abb. 51 gezeigt. Unter anderem traten Linalool, Methylsalicylat und eine homologe Reihe aliphatischer Aldehyde im Bouquet auf. Aber auch die beiden von der Limabohne bekannten Homoterpene DMNT und TMTT waren enthalten.

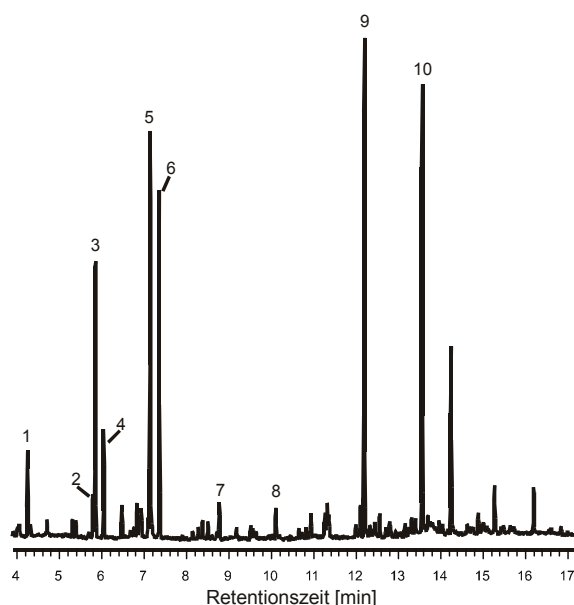


Abb. 51: Gaschromatographisches Profil der nach 48 h Befall von Paprika mit Blattläusen (*Macrosiphum euphorbiae*) gesammelten Duftstoffe. Identifikation von Verbindungen: (1) Octanal, (2) Linalool, (3) Nonanal, (4) DMNT, (5) Methylsalicylat, (6) Decanal, (7) Undecanal, (8) Tetradecanal, (9) TMTT, (10) Heptadecan = Standard.

Des gleichen wurden auch bei der Aubergine nach Blattlausbefall deutliche Duftstoffemissionen beobachtet. Hier wurden ebenfalls homologe Aldehyde und TMTT gefunden. Die Emission von DMNT konnte nicht beobachtet werden.

Diese Beispiele unterstreichen die Universalität des Konzepts der Duftstoffemission höherer Pflanzen infolge von Herbivorie. Die an die Umgebung abgegebenen flüchtigen Verbindungen dienen als Lockstoffe für carnivore Predatoren und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch als Signale zur interplantlichen Kommunikation.

3.7 Induktion der extrafloralen Nektarproduktion bei *Macaranga tanarius*

Pflanzenarten in wenigstens 66 Familien produzieren extrafloralen Nektar (EFN) auf ihren Blättern oder Trieben^[80], um damit carnivore oder parasitoide Insekten wie Ameisen oder Wespen anzulocken, die im Gegenzug die Pflanze vor Herbivorie schützen. Hier wirkt also nicht wie in den vorangegangenen Beispielen ein Bouquet flüchtiger Verbindungen, sondern extrafloral produzierter Nektar als Lockstoff für Feinde der Herbivoren. *Per definitionem* sind extraflorale Nektarien nektarproduzierende Drüsen, die keine Rolle bei Bestäubungsprozessen spielen.^[167] In vielen Studien wurde bereits die bedeutende Rolle von EFN bei pflanzlichen Abwehrreaktionen eindrucksvoll demonstriert.^[81] Wahlexperimente zeigen, daß Ameisen eher in Pflanzen mit extrafloralen Nektarien nisten als in solchen ohne^[168], und für diverse Ameisen- und Wespenarten ist eine aktive Verteidigung der EFN-produzierenden Pflanzen gegen Herbivore dokumentiert.^[169] Beide Insektenarten reduzieren die Zahl der Herbivoren und verringern dadurch den Fraßschaden an den betroffenen Pflanzen.^[168-173] Mehrere Studien zeigten bereits, daß infolge Herbivorie die Menge des produzierten extrafloralen Nektars stark zunimmt und die Aminosäurekonzentration im EFN steigt.^[171, 174] Nach einer Studie von WÄCKERS et al. handelt es sich jedoch zumindest an der Baumwolle (*Gossypium herbaceum*) um eine unspezifische Reaktion, die keines Elicitors zu ihrer Induktion bedarf. Ein rein mechanisch herbeigeführter Schaden bedingt nach WÄCKERS et al. eine betragsmäßig gleiche Induktion der EFN-Produktion wie Herbivorie durch *Spodoptera littoralis*.^[175] Wegen dieser fehlenden Spezifität ist unklar, ob es sich bei der Induktion der EFN-Produktion tatsächlich um eine gegen Herbivorie

gerichtete spezifische Abwehrreaktion der Pflanze handelt. Darüberhinaus ist nichts über die zugrundeliegenden innerpflanzlichen Signalwege bekannt, die von der Erkennung eines Schadens zur Induktion der EFN-Produktion führen. Für Studien zur EFN-Induktion wirkt sich erschwerend aus, daß unter Laborbedingungen die Produktion von EFN häufig nur in deutlich geringerem Ausmaß beobachtet wird als im Freiland (M Heil pers. Mitteilung). Zusätzlich ist es praktisch unmöglich, die vielfältigen Wechselbeziehungen mit unterschiedlichen Herbivoren und Predatoren im natürlichen Habitat unter Laborbedingungen zu simulieren. Daher gelangt man zu gesicherten und im ökologischen Kontext sinnvollen Aussagen in diesem Fall idealerweise durch eine Feldstudie. Eine solche Studie zur Klärung der Frage, ob eine infolge Herbivorie gesteigerte EFN-Produktion tatsächlich als induzierte indirekte Verteidigung der Pflanze zu werten ist, wurde von M HEIL im natürlichen Habitat der gewählten Testspezies *Macaranga tanarius* in der Nähe von Tampin (Malaysia) durchgeführt. Die im Rahmen dieser Studie notwendigen endogenen Jasmonatbestimmungen erfolgten in Kooperation mit dem Autor dieser Arbeit unter Laborbedingungen in Jena.

Macaranga tanarius ist ein in Südostasien beheimateter Pionierbaum aus der Familie der Euphorbiaceae. Als myrmecophile (Ameisen-liebende) Art lebt dieser Baum in enger Assoziation zu Ameisen und produziert zusätzlich zu extrafloralem Nektar nährstoffreiche Futterkörper an den Blattunterseiten und -stielen.^[176] Diese werden von den Ameisen, die häufig in den Bäumen nisten, als tägliche Nahrung konsumiert. Bedingt durch den großen Herbivorendruck seines natürlichen Habitats ist *M. tanarius* stark auf die Verteidigung durch Ameisen und andere Nektarien-besuchende Insekten angewiesen.^[176] Unter natürlichen Feldbedingungen konnte M HEIL zeigen, daß die EFN-Produktion bei *M. tanarius* durch mechanische Schädigung der Blätter, Herbivorie und auch durch Applikation des Phytohormons Jasmonsäure stark induzierbar ist (vergl. Abb. 52A). Die Tatsache, daß sowohl mechanische Verwundung der Blätter (100 Nadelstiche pro Blatt) als auch Herbivorie (Befall durch Blattkäfer und Heuschrecken aus dem natürlichen Habitat) zu einer ähnlichen Induktion der EFN-Produktion führt, bestätigt die Ergebnisse von WÄCKERS et al. und deutet nicht auf eine Beteiligung von herbivorspezifischen Elicitoren am Signalgeschehen hin. Auf der anderen Seite zeigt die deutliche EFN-Induktion nach Applikation von JA durch Besprühen der Blätter mit einer 1 mM wässrigen Lösung, daß bei der innerpflanzlichen Signalweiterleitung zur EFN-

Biosynthese der Octadecanoidweg eine Rolle spielen könnte. Kontrollpflanzen, die lediglich mit Wasser besprüht wurden, zeigen keinen Effekt.

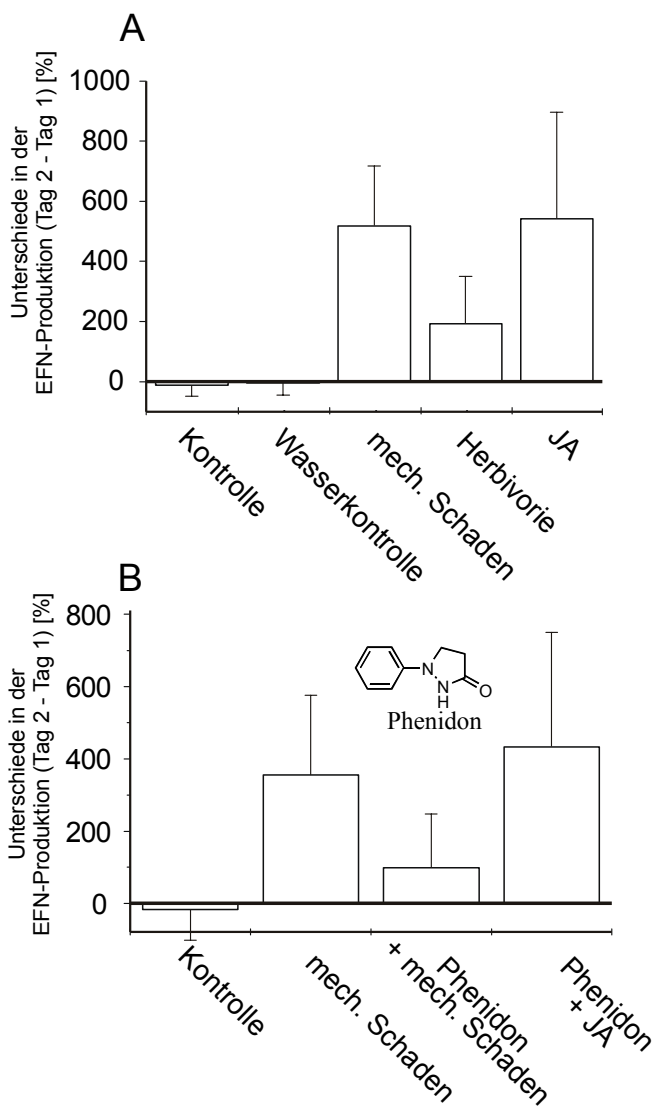


Abb. 52: Prozentuale Änderung der EFN-Produktion 24 h nach der jeweiligen Behandlung von je 10 Pflanzen (Mittelwerte + SD). (A) zeigt eine ca. 550 %ige Steigerung der EFN-Produktion infolge mechanischem Schaden und JA-Behandlung. Herbivorie führt nur zu einem Anstieg um 200%. Unbehandelte Pflanzen und mit Wasser besprühte zeigen keinen Effekt bzw. eine leicht reduzierte EFN-Produktion am 2. Tag. (B) zeigt eindrucksvoll den Effekt einer Vorinkubation mit dem Lipoxigenaseinhibitor Phenidon. Besprühen der Pflanzen mit einer 2 mM Phenidonlösung 24 h vor mechanischer Schädigung führt nach weiteren 24 h im Vergleich zu reinem mechanischen Schaden zu einer Reduktion der EFN-Produktion um ca 2/3. Die JA-induzierte EFN-Produktion wird dagegen durch Phenidon nicht beeinflusst. Die auch hier durchgeführte Kontrolle verhält sich wie unter (A).

Um die Beteiligung von Jasmonsäure an der Induktion der EFN-Produktion von *M. tanarius* zu verdeutlichen, wurden Laborexperimente zur JA-Induktion nach mechanischem Schaden gemacht. Die verwendeten Pflanzen stammten aus dem botanischen Garten der Universität Würzburg. Alle untersuchten Blätter wurden durch jeweils 300 Nadelstiche verletzt und der endogene JA-Gehalt nach 10, 30, 45, 60, 120, 180, 360 und 600 Minuten bestimmt. Infolge der Verwundung wurde tatsächlich bereits innerhalb von 30 min ein deutlicher Anstieg endogener JA-Konzentration von 20-30 ng/g Frischgewicht (Ausgangswert) auf 120 ng/g Frischgewicht beobachtet (s. Abb. 53).

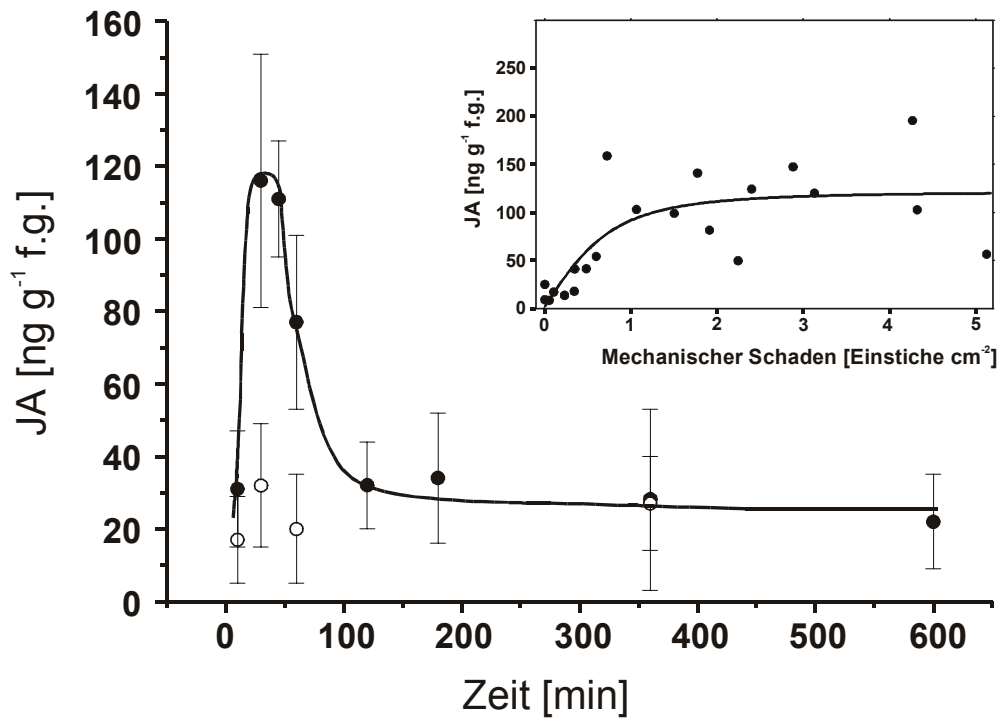


Abb. 53: Nach mechanischer Schädigung kommt es bei *M. tanarius* zur deutlichen und transienten Induktion der JA-Biosynthese (Mittelwerte \pm SD). Das Maximum der endogenen JA-Konzentration ist ca. 30-45 min nach der Verletzung erreicht. Die Menge der nach 30 min gebildeten JA ist außerdem von der „Dosis“ des beigebrachten Schadens abhängig. Eine Sättigungskinetik wie eingezeichnet erklärt hier 68% der Varianz. Unverletzte Kontrollblätter (\circ) zeigen erwartungsgemäß keinen Effekt.

Die JA-Ausschüttung war transient und der endogene Gehalt nahm innerhalb von 2 h stetig ab, um danach auf den Grundspiegel zurückzukehren. Wie das eingefügte Bild in Abb. 53 zeigt, ist der Betrag der JA-Induktion von der Dosis des zugefügten mechanischen Schadens abhängig und folgt in etwa einer Sättigungskinetik. Dieses Experiment zeigt eindeutig, daß eine mechanische Verwundung des Blattgewebes von *M. tanarius* eine deutliche Induktion des endogenen JA-Spiegels nach sich zieht. Da im weiteren Verlauf nach der Verwundung verstärkt EFN gebildet wird, und da diese EFN-Produktion im Freiland JA-induzierbar ist, liegt die Vermutung nahe, daß der Jasmonsäure eine Schlüsselrolle bei der Induktion der EFN-Produktion zukommt. Um diese Hypothese weiter zu untermauern, wurden Vorinkubationsexperimente mit Phenidon (1-Phenyl-3-pyrazolidinon), einem an der Lipoxigenase wirkenden Inhibitor der JA-Biosynthese^[116], durchgeführt. Unter Laborbedingungen zeigte sich, daß Besprühen von Blättern mit einer 2 mM wässrigen Phenidonlösung 24 h vor der mechanischen Schädigung die anschließende JA-Induktion um ca. 2/3 reduziert. Im Freiland wurden nun nach gleichem Protokoll Blätter von *M. tanarius* mit

Phenidonlösung besprüht und nach 24 h entweder mechanisch verletzt oder mit Jasmonsäurelösung behandelt. Ein Teil der Phenidon-vorbehandelten Blätter verblieb als Kontrollen. Weitere 24 h später wurde die sezernierte EFN-Menge bestimmt und mit der entsprechenden gebildeten Menge von lediglich mechanisch verwundeten Blättern (ohne Phenidonbehandlung) verglichen (s. Abb. 52B). Es zeigte sich, daß i) Phenidon allein keinen Einfluß auf die EFN-Produktion hat (Kontrolle), ii) reine mechanische Schädigung die EFN-Produktion um ca. 400 % steigert, iii) sich in den phenidonvorbehandelten und dann verwundeten Blättern die EFN-Produktionsrate lediglich verdoppelt, und daß iv) JA-Applikation den durch Phenidon gesetzten Block im Octadecanoidweg wie erwartet umgeht und zu einer 400 %igen Steigerung der EFN-Produktion führt. Phenidon reduziert also nicht nur die infolge Verwundung gebildete Menge an endogener JA um ca. 2/3. Es reduziert genauso die infolge Verwundung gebildete Menge an EFN um einen ähnlichen Faktor. Dieses Ergebnis demonstriert, zusammen mit der verwundungsinduzierten endogenen JA-Induktion und der JA-induzierten EFN-Produktion, klar eine Beteiligung von Jasmonsäure an der Induktion der EFN-Produktion in *M. tanarius*.

Feldexperimente von M HEIL zeigen weiterhin einen signifikanten Einfluß von Jasmonsäure auf die Zahl und Art der die Nektarien aufsuchenden Insekten. Auf Pflanzen die mit Jasmonsäurelösung besprüht wurden, werden am folgenden Tag deutlich weniger herbivore Arthropoden gezählt als auf entsprechenden unbehandelten Kontrollpflanzen. Demgegenüber ist die Zahl der Predatoren (Ameisen, Wespen) auf den JA-besprühten Pflanzen bis ca. dreimal höher als auf den Kontrollen. Dieses Ergebnis deutet auf einen signifikanten Nutzen für die Pflanzen hin, die aufgrund der JA-Behandlung eine erhöhte EFN-Produktion zeigen. Werden die extrafloralen Nektarien von den Blättern entfernt, so zeigen die Pflanzen auch nach JA-Behandlung keine erhöhte Attraktivität für die genannten Predatoren. Dieses Ergebnis schließt JA- oder verletzungsinduzierte Duftstoffe, wie sie bei vielen anderen Pflanzen gefunden werden (s.o.) als Lockmittel für carnivore Insekten aus und unterstreicht die Bedeutung des EFN in der induzierten Verteidigung von *M. tanarius*. In einem sechswöchigen Langzeitexperiment konnte eindrucksvoll gezeigt werden, daß eine wiederholte Behandlung von Pflanzen mit JA oder mechanischer Verwundung, die Herbivorie auf <10 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen reduziert (Abb. 54).

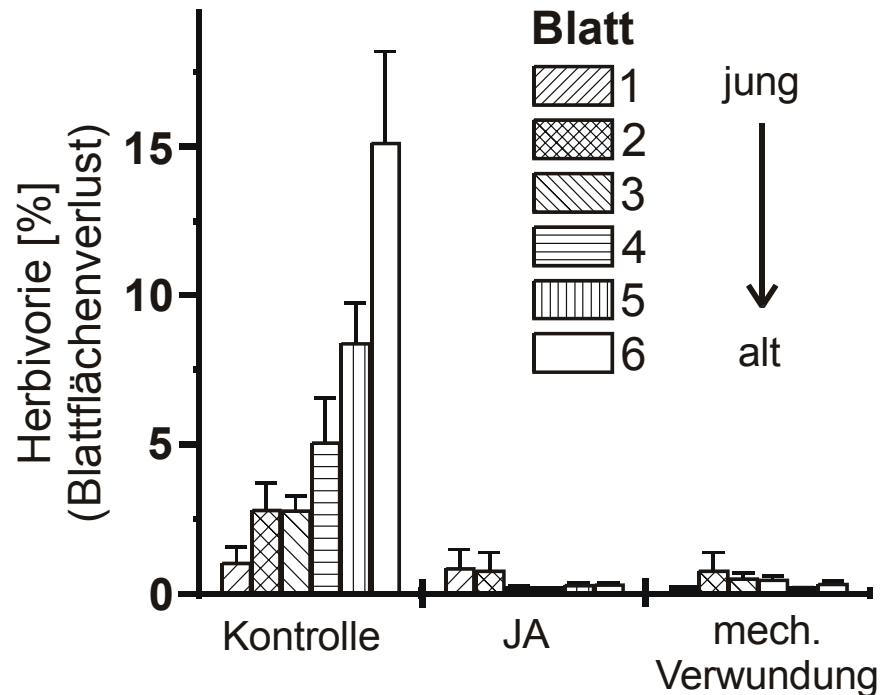


Abb. 54: Herbivorie auf Blättern von Kontrollpflanzen, JA-behandelten Pflanzen und mechanisch verwundeten Pflanzen sechs Wochen nach Beginn des Experiments (Mittelwerte +SD). Die durch Herbivorie verlorene Blattfläche wurde bei den jeweils 6 jüngsten Blättern von 15 Pflanzen je Behandlungsgruppe bestimmt. Man erkennt eine signifikante Reduktion der Herbivorie in den JA-behandelten (2.5 ml einer 1mM Lösung pro Blatt, alle 4 Tage) und den mechanisch verwundeten Pflanzen (100 Einstiche mit einer Nadel, alle 4 Tage) im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollen.

Bei diesem Experiment wurden 45 Pflanzen willkürlich in drei Gruppen zu je 15 Individuen eingeteilt. Eine Gruppe diente als unbehandelte Kontrolle. Die sechs jeweils jüngsten Blätter der übrigen beiden Gruppen wurden entweder mit JA-Lösung (1 mM) besprüht, oder 100 Mal mit einer Nadel verletzt. Die Behandlungen wurden alle vier Tage wiederholt. Sechs Wochen nach Beginn des Experiments wurden alle behandelten und als Kontrolle dienenden Blätter gesammelt und die jeweils durch Herbivorie verlorene Blattfläche bestimmt. Es ist klar zu erkennen, daß der durch Herbivorie angerichtete Schaden bei den unbehandelten Kontrollblättern deutlich größer ist als bei den behandelten. Das älteste Kontrollblatt büßt im Mittel während sechs Wochen etwa 15 % seiner Fläche ein. Demgegenüber liegt der Schaden bei den mechanisch verletzten oder JA-behandelten ältesten Blättern bei deutlich unter 1 %. Um ausschließen zu können, daß nicht eventuell andere JA-induzierbare Sekundärstoffe (z.B. Proteinaseinhibitoren) für diesen Effekt verantwortlich sind, werden Versuche zur Herbivorie unter Predator-freien Bedingungen durchgeführt und der Blattflächenverlust zwischen Kontrollen und JA-behandelten Blättern ermittelt. Hier zeigt sich kein

Unterschied. JA scheint also in *M. tanarius* neben der Steigerung der EFN-Produktion keine weitere sich signifikant auswirkende Art der Verteidigung zu induzieren. Eine wie auch immer induzierte Steigerung der EFN-Produktion führt unter Freilandbedingungen also tatsächlich zu einer signifikanten Reduktion des durch Herbivorie verursachten Fraßschadens.

Zusammengenommen zeigt diese Studie, daß die EFN-Produktion des südostasiatischen myrmecophilen Baumes *Macaranga tanarius* durch Behandlung mit Jasmonsäure oder durch artifizielle Verwundung um bis zu 500 % gesteigert wird. Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit früheren Studien, die eine Induktion des EFN-Flusses annehmen, ohne daß dafür ein spezieller Elicitor erforderlich ist.^[175, 177] Darüberhinaus konnte unter Laborbedingungen eine deutliche und dosisabhängige Steigerung des endogenen JA-Spiegels bei *M. tanarius* infolge Verwundung festgestellt werden. Unabhängig voneinander wurden quantitative Beziehungen hergestellt zwischen i) der Intensität des Schadens und der Menge an endogen produzierter JA, ii) der Menge an exogen applizierter JA und der Intensität der Steigerung der EFN-Produktion und iii) der Intensität des Schadens und der Intensität der Steigerung der EFN-Produktion. Schließlich bewirkt eine Inhibition der JA-Biosynthese durch Vorinkubation mit dem LOX-Inhibitor Phenidon eine dramatische Reduktion sowohl der verwundungsabhängigen endogenen JA-Induktion, als auch der EFN-Produktion nach mechanischer Schädigung unter Freilandbedingungen. Die durch Phenidon ausgelösten Effekte lassen sich dabei durch exogene JA-Applikation umgehen. Obwohl eine Beteiligung anderer innerpflanzlicher Signalwege keineswegs ausgeschlossen werden kann, legen diese Daten nahe, daß es sich bei der EFN-Produktion von *M. tanarius* um eine induzierte Sekundärreaktion handelt, die über die Octadecanoidsignalkaskade vermittelt wird. Darüberhinaus demonstrieren die Freilandexperimente von HEIL, daß die Induktion der EFN-Produktion zur deutlichen Herbivoriereduktion führt. Die betroffenen Pflanzen profitieren daher von einer Steigerung ihrer EFN-Produktion. Aussagen über eine Steigerung der reproduktiven Fitness erlauben diese Ergebnisse wegen der langen Lebens- und Entwicklungszeit der Macarangabäume allerdings nicht. Bisher konnten jedoch nur wenige Studien zeigen, daß eine induzierte Antwort bei Pflanzen unter Freilandbedingungen überhaupt zu einem Vorteil führt.^[178-180] Eine noch geringere Anzahl von Arbeiten existiert, die Kosten oder Nutzen von *indirekten*, induzierten Abwehrreaktionen, welche im allgemeinen über höhere trophische Ebenen wirken,

adressieren. Kürzlich konnte THALER zeigen, daß JA-induzierte Duftstoffe von Tomaten in einem landwirtschaftlichen Feld die Parasitierung von Herbivoren verstärken, und daß die JA-induzierten Pflanzen in geringerem Maß von Herbivorie betroffen sind als entsprechende Kontrollen.^[21] Bezogen auf EFN demonstriert die hier dargestellte Studie zum ersten Mal eine Reduktion der Herbivorie unter Bedingungen des natürlichen Habitats. In Analogie zur gut etablierten, über Herbivor-induzierte Duftstoffe vermittelten indirekten Verteidigung wirkt auch die Induktion der EFN-Produktion als Attraktans für Predatoren, die im Gegenzug die Herbivorie an ihrer als Nektarquelle dienenden Futterpflanze signifikant reduzieren. Daher ist die EFN-Produktion tatsächlich als induzierte indirekte Abwehrreaktion anzusehen. Im Gegensatz zur Induktion der flüchtigen Duftstoffe wirkt hier ein flüssiges und wenig flüchtiges pflanzliches Sekret, durch sein Potential zur Erhöhung der Attraktivität der Pflanze für Predatoren als Mediator der Abwehrreaktion. Genau wie die Induktion der Duftstoffbiosynthese wird auch die induzierte indirekte Verteidigung via EFN über den Octadecanoidweg und das Phytohormon Jasmonsäure gesteuert. Zukünftige Studien mit anderen Pflanzen und Insekten müssen zeigen, ob es sich bei der EFN-Produktion als induzierte Verteidigung um ein ähnlich generelles Phänomen handelt, wie es die Induktion der Duftstoffbiosynthese darstellt.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Unter Anwendung von Aminopropyl-Festphasenextraktion zur Probenvorbereitung und GC-(SIM)-MS zur Analytik wurden zuverlässige Quantifizierungsmethoden für die Bestimmung der endogenen pflanzlichen Signalstoffe Jasmonsäure und Salicylsäure aus Blattgewebe etabliert. Das Verfahren gestattet die simultane Quantifizierung beider Analyten aus einer Probe und in einer GC-MS-Messung. Die Analytik mittels GC-(SIM)-MS ist für den Routinebetrieb gut geeignet und verfügt dank der gewählten Detektion im SIM Modus über ausreichende Selektivität und Empfindlichkeit, um beide Analyten und die entsprechenden zugesetzten Standards neben der komplexen Probenmatrix zu detektieren. Unter Ausnutzung einer ähnlichen SPE-basierten Probenvorbereitung konnten außerdem quantitative und semiquantitative analytische Verfahren zur Bestimmung von 12-Oxophytodiensäure, Abscisinsäure und 1-Oxoindancarbonsäure entwickelt werden. Diese Beispiele unterstreichen die hohe Effizienz der Aminopropyl-Festphasenextraktion zur Anreicherung saurer Sekundärmetaboliten aus pflanzlichen Geweben. Während die Analytik der 1-Oxoindancarbonsäure und Abscisinsäure, ähnlich wie die der JA und SA, GC-(SIM)-MS-gestützt erfolgte, erwies sich für die Bestimmung der 12-OPDA ein flüssigchromatographisches Verfahren (HPLC) mit UV-Detektion als günstiger. Für die Analyse des von Pflanzen als Spurengas abgegebenen Signalstoffs Ethylen wurde die von F. KÜHNEMANN etablierte Photoakustikspektroskopie erfolgreich eingesetzt.

Mit Hilfe der zeitlichen Quantifizierung von Phytohormonen nach Behandlung mit dem Pathogen-abgeleiteten Elicitor Alamethicin wurden wertvolle Erkenntnisse über die Aktivierung von Signaltransduktionswegen und ihren Interaktionen in der Limabohne (*Phaseolus lunatus*) gewonnen. Es konnte klar gezeigt werden, daß eine Behandlung der Limabohne mit dem Ionenkanal-bildenden Peptaibol die Biosynthese wenigstens dreier Phytohormone induziert. Bereits im Verlauf weniger Minuten nach Inkubationsbeginn kam es zu einer raschen Zunahme der Konzentration endogener Jasmonsäure. Der Anstieg war jedoch transient und erreichte nach 45 min eine Maximalkonzentration von ca. 450 ng/g f.g. JA in den elicitierten Pflanzen. Wenig später begann der JA-Gehalt wieder zu fallen und erreichte ca. 6 h nach Inkubationsbeginn die Größenordnung des Grundgehalts von 20-30 ng/g f.g.. Zu dieser Zeit nahm der Gehalt endogener Salicylsäure stark zu und erreichte nach ca. 6 h einen Betrag von ca. 4,5 µg/g f.g., was einer

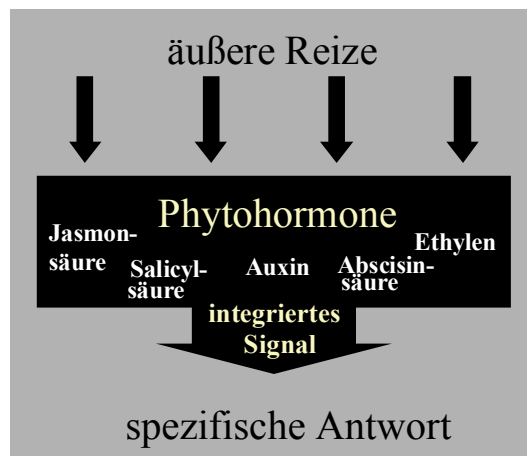
Verneunzigfachung ihres Grundgehaltes entspricht. Im Verlauf der gesamten Inkubationsdauer (20h) ging diese Konzentration nicht signifikant zurück. Gleichzeitig wurden große Mengen Methylsalicylat von der betroffenen Pflanze freigesetzt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die gebildete Menge an Salicylsäure wenige Stunden nach Alamethicinbehandlung den Octadecanoidweg effektiv inhibiert. Vergleichende JA- und 12-OPDA-Bestimmungen in AcSA-vorbehandelten Limabohnen demonstrieren, daß der SA-induzierte Block des Octadecanoidweges der 12-OPDA nachgeschaltet ist, aber stromaufwärts von JA liegt. Eine derartige Inhibition der JA-Produktion erklärt das fast vollständige Fehlen von JA-responsiven Komponenten im ALA-induzierten Duftmuster.

Auf der Suche nach dem lipidabgeleiteten endogenen Signalmolekül, das anstelle der Jasmonsäure für die Vermittlung des ALA-induzierten Duftbouquets verantwortlich ist, wurden mehrere Oxylipine synthetisiert und an der Limabohne auf ihre Fähigkeit zur Induktion der Duftstoffbiosynthese untersucht. Jedoch konnte weder für 9- noch für 13-Oxo-octadecatriensäure oder ihre korrespondierenden Hydroxide eine Aktivität gefunden werden. Lediglich die entsprechenden Hydroperoxide erwiesen sich im Duftassay als ähnlich aktiv wie Linolensäure. Um einen Überblick über die Gesamtheit der Oxylipine im Blattgewebe der Limabohne zu erhalten, wurde mittels RP-18-Festphasenextraktion und GC-MS-Analytik eine Methode zur Aufnahme von Oxylipinsignaturen etabliert. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen konnten jedoch bislang keine reproduzierbaren Unterschiede in den infolge ALA- oder Cellulysinbehandlung erhaltenen Oxylipinsignaturen gefunden werden. In der Zukunft sind hier weitere Messungen und die Identifikation aussichtsreicher Kandidaten geplant. Als hochaktiv, bzgl. der Induktion ALA-responsiver Duftstoffe (DMNT, TMTT, MeSA) erwies sich eine Mischung synthetisch durch Fe(II)-katalysierte Oxidation von Linolensäure erhaltener Oxylipine. Die höchste Aktivität konnte in einer Fraktion nach dünnschichtchromatographischer Antrennung des Gemisches gefunden werden. Deren r_f -Wert weist auf eine mono- oder bis-oxygenierte signalgebende Spezies hin. Eine HPLC-gestützte weitere Reinigung dieses oder ähnlicher Gemische ist allerdings erforderlich und könnte zur Identifizierung der gesuchten aktiven Oxylipin(e) führen.

Die Phytohormonanalytik wurde auch erfolgreich zur Charakterisierung des endogenen Signalsystems eingesetzt, das in der Limabohne zur Abwehr von Frassfeinden eingeleitet

wird. Es konnte gezeigt werden, daß ein Befall durch Lepidopteren bei der Limabohne wenigstens drei wichtige Signalschienen induziert: I) JA und den Octadecanoidweg, ii) Salicylsäure und iii) Ethylen. Dabei unterscheidet sich die Herbivorie-induzierte Signaltransduktion sowohl in den beobachteten Quantitäten als auch im zeitlichen Verlauf des Auftretens der einzelnen Phytohormone deutlich vom Alamethicin-induzierten Signalgeschehen. Im Verlauf eines Befalls durch herbivore Insekten wurde keine vergleichbare Zunahme der endogenen JA-Konzentration innerhalb der ersten Minuten der Inkubation beobachtet, sondern eine langanhaltende kontinuierliche JA-Produktion während des gesamten ersten Inkubationstages. Der Gehalt endogener SA vervünffachte sich infolge Herbivorie lediglich und die Kinetik des Auftretens der SA-Induktion zeigte einen transienten Verlauf. Befall durch *Spodoptera*-Larven oder Spinnmilben induzierte in der Limabohne auch die Emission von Ethylen. Darüberhinaus folgte die Kinetik der Ethylenfreisetzung einer circadianen Rhythmik mit jeweils einem Maximum in der Photophase und einem kleineren zu Beginn der Dunkelperiode. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation der Limabohne mit Elicitorpräparationen wie Cellulysin oder Alamethicin lediglich zu einer kurzen transienten Ethylenfreisetzung. Vorversuche zur Etablierung von analytischen Verfahren für die Bestimmung von Abscisinsäure und Auxin sind erfolgt. Zukünftige Messungen sollen den Einfluß auch dieser wichtigen endogenen Signalstoffe im Kontext der vielschichtigen Verteidigungsstrategien der Limabohne zeigen. Es ist anzunehmen, daß die bei der Limabohne beobachtete differentielle Induktion von Duftstoffen auch eine Folge von differentieller Induktion und Interaktion einzelner Phytohormon-basierter Signaltransduktionsschienen ist (Abb. 55).

Abb. 55: Jeder spezifische Reiz bewirkt eine spezifische Änderung des Phytohormonhaushalts. Die Aktionen und Interaktionen der induziert ausgeschütteten einzelnen Signalträger führen über im einzelnen bislang unbekannte Mechanismen der Signalintegration zur beobachteten differenzierten Antwort der Pflanze.



Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Studien zur Wirkungsweise von Linolensäurekonjugaten aus den Salivarsekreten herbivorer Insekten bei der Induktion der Duftstoffbiosynthese von *P. lunatus* durchgeführt. Synthese und Untersuchung des von ALBORN et al. als signalvermittelnde Komponente identifizierten Volicitins ergab im Duftassay jedoch keine Aktivität der genannten Verbindung in der Limabohne. Es konnte allerdings ein gewisses SA-Induktionspotential des Volicitins gefunden werden, welches in etwa dem von fressenden Larven gleichkommt. Synthese und Aktivitätstest eines nichthydrolysierbaren Konjugates der Linolensäure mit α -Methylisoleucin, legen nahe, daß die Konjugate keine eigenständigen Signalstoffe darstellen und erst die nach Hydrolyse endogen freigesetzte Linolensäure für die geringe Aktivität derartiger Verbindungen verantwortlich zeichnet. Das synthetisierte Konjugat *N*-(Linolenoyl)- α -methylisoleucin erwies sich als vollkommen inaktiv.

Interessante Ergebnisse zur interplantlichen Kommunikation durch flüchtige Verbindungen wurden aus photoakustischen Ethylenmessungen erhalten. Werden Limabohnen dem Bouquet aus flüchtigen Verbindungen ausgesetzt, das von stromaufwärts platzierten spinnmilbenbefallenen konspezifischen Pflanzen emittiert wird, so beginnen diese unbefallenen 'Empfängerpflanzen' kurze Zeit später mit einer geringen aber signifikanten Emission von Ethylen. Einige Komponenten des infolge Herbivorie-Stress freigesetzten Gemisches an flüchtigen Verbindungen werden also tatsächlich von völlig gesunden Nachbarpflanzen registriert und lösen spezifische Reaktionen aus. Zur Aufklärung der Identität dieser flüchtigen Signale sind in naher Zukunft weitere Experimente unter Verwendung synthetischer Duftkomponenten als Induktoren geplant.

Durch Quantifizierung endogener Jasmonatgehalte an der südostasiatischen 'Ameisenpflanze' *Macaranga tanarius* konnte die Beteiligung der Jasmonsäure am Signalstoffwechsel, der zum herbivorieinduzierten Anstieg der Produktion extrafloralen Nektars führt, demonstriert werden. In Verbindung mit Freilandversuchen von HEIL konnte herausgearbeitet werden, daß die Produktion von EFN eine alternative *indirekte* induzierte Verteidigungsreaktion von Pflanzen ist, die genau wie die Induktion der Duftstoffbiosynthese über die Octadecanoidkaskade vermittelt wird. Ob die Induktion der EFN-Produktion allerdings eine ähnliche große Bedeutung im Kontext pflanzlicher Verteidigungsstrategien besitzt wie letztere wird die Zukunft zeigen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien und Geräte

Kernresonanzspektroskopie ^1H - und ^{13}C : Bruker Avance DRX 500. Als interner Standard dient das deuterierte Lösungsmittel.

Gaschromatographie / Massenspektrometrie (GC/MS):

- I) GC: Finnigan GC (Trägergas He)
MS: Finnigan GCQ (70eV, EI & CI (MeOH))
Trennsäule: „Fused Silica“ Optima 5 MS, 15m x 0,25mm (Macherey-Nagel, Düren). (Headspaceanalytik)
- II) GC: Thermoquest Trace GC 2000 series (Trägergas He).
MS: Thermoquest Trace MS 2000 series (70eV, EI).
Trennsäule: Econo-cap[®] EC-5 (SE 54), 15m x 0,25mm, (Alltech, Deerfield).
(Phytohormonanalytik, Oxylipinsignaturen, Screening biologischer Proben)
- III) GC: Varian (Trägergas He).
MS: Magnum, Finnigan Mat (70eV, EI).
Trennsäule: Heliflex[®] AT5, 15m x 0,25mm, (Alltech, Deerfield).
(Routineanalytik für die organische Synthese)

Massenspektren von Syntheseprodukten und HR-MS: Micromass Masspec.

Infrarotspektroskopie: Bruker Equinox 55 FTIR Spektrophotometer

Flüssigchromatographie / Massenspektrometrie (LC/MS):

HPLC: Hewlett Packard HP 1100.

MS: Finnigan LCQ mit Finnigan LC/MS APCI interface.

Trennsäule: Merck LiChrospher[®] 100 RP-18, 250 x 4 mm, Körnung 5 μm .

Laufmittel: Wasser G Chromasolv[®] für die Gradientenelution (Riedel de Haen, Seelze),

Acetonitril G Chromasolv[®] super gradient grade (Riedel de Haen, Seelze), Essigsäure

(Merck, Darmstadt).

HPLC: Kontron 525 Pumpe, 560 Autosampler, 440 Dioden- Array-Detektor, JASCO

FP-1520 Fluoreszenzdetektor.

Analytische Dünnschichtchromatographie: Fertigfolien, Kieselgel 60 F₂₅₄, 0,2 mm (Merck, Darmstadt). Die Detektion erfolgt unter UV-Licht (254 nm) und/oder durch Anfärbung mittels *Seebach*-Reagenz.

Präparative Dünnschichtchromatographie: PSC Fertigplatten, Kieselgel 60 F₂₅₄, 2 mm (Merck, Darmstadt). Die Detektion erfolgt unter UV-Licht (254 nm).

Präparative Säulenchromatographie: Kieselgel 60, Körnung 60 – 100 µm (Merck, Darmstadt).

Strippingpumpen: Miniaturdrehschieberpumpen, Nennspannung 12 V, Betriebsspannung 9 V (Fa. Fürgut, Aitrach).

Aktivkohlefilter: 1,5 mg Aktivkohle, Länge 60 mm, Ø 5 mm (CLSA, Le Ruisseau de Montbrun, F-0935 Daumazan sur Arize, Frankreich).

Homogenisierung biologischen Gewebes: Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik).

Festphasenextraktion (SPE): NH₂- und C₁₈-SPE Kartuschen; Vakuumkammer zur simultanen Extraktion von 12 Proben mit Aufsatz zum Abblasen von Lösungsmitteln unter Argon (Macherey-Nagel, Düren).

Software: Microcal Origin[®] 5.0 zur Auswertung der Daten; Thermoquest Xcalibur[®] 1.1 zur Aufnahme, Verwaltung und Auswertung der Chromatogramme.

Lösungsmittel: Es werden nur Lösungsmittel in p.a.-Qualität verwendet, die ggf. zuvor getrocknet wurden (Merck, Darmstadt).

Inkubationssubstanzen und Spezialchemikalien: Cellulysin wurde von Calbiochem erworben. Abscisinsäure, Alamethicin, Aristolochiasäure und Phenidon stammen von Sigma. 12-OPDA wurde von Campro-Scientific (Veenendal) erworben. α-Methylisoleucin stammt von Prof. Dr. Altenbach (Univ. Wuppertal). 1-Deoxy-[5,5-²H₂]-D-xylulose wurde von A Jux synthetisiert.

5.2 Allgemeine Anzuchtbedingungen der Versuchspflanzen

Zur Anzucht wird zuvor sterilisierte Pflanzerde der Firma Capriflor verwendet. Die Sterilisation erfolgt durch dreiminütige Mikrowellenbestrahlung in einem handelsüblichen Mikrowellenofen (Daewoo, Quick Cookmate).

Limabohne (*Phaseolus lunatus*):

Die Samen von *Phaseolus lunatus* 'Ferry Morse' cv. *Jackson Wonder Bush* wurden von der Landwirtschaftlichen Versuchsanstalt Limburgerhof der BASF AG zur Verfügung gestellt. Sie werden in Gefäßen mit einem Durchmesser von 5.5 cm auf einen ca. 5 cm hohen Belag der Pflanzerde gelegt und anschließend mit Erde in doppelter Samenstärke überschichtet. 12-15 Tage alte Pflanzen werden für Inkubationen verwendet. Die Anzucht erfolgt in einer Klimakammer bei 23°C und 80% Luftfeuchtigkeit. Die Pflanzen werden in einer Photophase von 14 Stunden/Tag durch Leuchtstoffröhren mit einer Leistung von ca. $270\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichtet.

Mais (*Zea mays*) und Baumwolle (*Gossypium hirsutum*):

Die Samen von *Zea mays* (cv. LG11) wurden von Prof. Dr. Jim Tumlinson (Gainesville, Florida, USA) zur Verfügung gestellt. Sie werden in Pflanzschalen (40 x 30 cm) angezogen und nach ca. drei Wochen für Experimente verwendet. Die Anzucht erfolgt in einer Klimakammer bei 22°C und 65% Luftfeuchtigkeit. Die Pflanzen werden in einer Photophase von 16 Stunden/Tag durch Lampen mit einer Leistung von ca. $4700 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichtet. Baumwollpflanzen werden unter den gleichen Bedingungen aus Samen gezogen. Sechs Wochen alte Pflanzen werden für Experimente verwendet.

Paprika (*Capsicum annuum*):

Die Samen von *Capsicum annuum* cv. 'Pushtagold' wurden von Prof. Dr. Urs Wyss (Universität Kiel, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Anzucht erfolgt analog zur Limabohne. Sechs Wochen alte Pflanzen werden für Strippings verwendet.

Farn (*Dryopteris filix-mas*):

Die Pflanzen stammen aus dem Botanischen Garten der Universität Jena und wurden von Frau Dr. H. Dittrich zur Verfügung gestellt.

Ameisenpflanze (*Macaranga tanarius*):

Für die von HEIL durchgeführten Freilandversuche wurden im natürlichen Habitat (Tampin, Malaysia) gewachsene Pflanzen herangezogen. Für die Laborexperimente wurden Stecklinge des Botanischen Gartens der Universität Würzburg verwendet. Sie wurden bei einer Photophase von 12 h, einer Lichtstärke von $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und bei 60% Luftfeuchtigkeit gehalten.

5.3 Kultur von Insektenlarven und Spinnmilben

Eier von *Heliothis virescens*, *Agrotis segetum*, *Spodoptera exigua* und *Spodoptera frugiperda* werden von Dr. A. Elbert, Zentrum für tierische Schädlinge der Firma Bayer (Monheim) bezogen. Eier von *Spodoptera littoralis* wurden zum Aufbau einer eigenen Zucht von Prof. Dr. P. Proksch (Universität Würzburg) zu Verfügung gestellt. Anzucht und Kultur der Larven erfolgt auf frischen Bohnenblättern oder auf einer künstlichen Diät aus Bohnenbrei analog der Literatur^[181]. Für Experimente werden Tiere im 3. Larvalstadium verwendet. Spinnmilben *Tetranychus urticae* wurden ebenfalls von Herrn Dr. Elbert (Bayer AG, Monheim) zur Verfügung gestellt und auf Bohnenpflanzen (*Phaseolus vulgaris*) vermehrt. Alle Spezies werden bei einer Temperatur von 23-25°C mit einer Photophase von 16 h gehalten.

5.4 Durchführung der Inkubationsexperimente

5.4.1 Gasphasenanalytik mittels CLS

Zur Untersuchung flüchtiger induzierter Blattinhaltsstoffe wird das „Closed-Loop-Stripping“ (CLS) nach Grob und Zürcher angewendet.^[182] Die zu untersuchenden Pflanzen werden mit einem Skalpell am Trieb oder Blattstiel abgeschnitten und schnell in ein Präparateglas überführt, das mit der entsprechenden Blind- oder Inkubationslösung gefüllt ist, so daß die Lösung über den Blattstiel aufgenommen werden kann. Diese Anordnung wird in einen geschlossenen Exsikkator (750 oder 1500 ml) überführt. In die obere Exsikkatoröffnung wird eine Miniaturdrehchieberpumpe eingeführt, die im geschlossenen Kreislauf die Luft über einen Aktivkohlefilter pumpt. In einer Photophase von 16 h wird die Apparatur durch Leuchtstoffröhren mit einer Lichtintensität von $270 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beleuchtet. Die von der Pflanze während der Versuchszeit von 48 h (Elicitoren) bzw. 72 h (Herbivorie) freigesetzten flüchtigen organischen Verbindungen

werden an der Aktivkohle adsorbiert. Zur Desorption dieser Substanzen wird nach Beendigung des Experiments der Filter entnommen und 2 x mit je 15 µl Dichlormethan gespült. Dem Eluat werden 5 µl n-Bromdecanlösung (7.2 mM in Dichlormethan) als interner Standard zugesetzt und das Probenvolumen durch Zugabe von weiterem Dichlormethan auf 40 µl eingestellt. 1 µl dieser Lösung wird dann per GC/MS analysiert.

GC/MS-Bedingungen zur Vermessung der Filtereluate:

Temperaturprogramm: 50 °C (2 min), 10 °C/min, 200 °C (0 min), 30 °C/min, 280 °C (3 min)

Injektortemperatur:	220 °C
Injektionsvolumen:	1 µl
Scanbereich:	50 – 470 amu
Solvent delay:	2 min
Splitverhältnis:	1 : 10
Interface:	260 °C
Trägergas:	He, 3 ml/min

5.4.2 Inkubationen an *Phaseolus lunatus*

Das zu untersuchende Pflanzenmaterial muß mechanisch unversehrt und frei von Blattfraß oder Schädlingsbefall sein. Die Pflanzen werden verwendet, wenn die Primärblätter vollständig ausgebildet sind und der Ansatz der nächsten Blattgeneration zu erkennen ist. Im allgemeinen ist dieses Entwicklungsstadium nach 12-15 Tagen erreicht.

Für Duftmessungen wird entweder ein einzelnes Primärblatt (am Anfang des Blattstiels abgetrennt) oder die gesamte 2 cm unter den Keimblättern abgeschnittene Pflanze verwendet. Die Pflanze bzw. das Primärblatt werden dann in die entsprechende Inkubationslösung eingestellt oder mit Herbivoren besetzt und der umgebende Gasraum wie unter 5.4.1 beschrieben analysiert.

Inkubationen zur Duft / Duft – Induktion werden in einer größeren Meßkammer aus Glas (V=3,5 L) durchgeführt. In den unteren Teil werden 4 Bohnen gestellt, die mit je 3 Larven von *Spodoptera exigua* befallen sind, und vom Rest der Kammer durch ein feinmaschiges GazeNetz abgetrennt. Darüber werden drei frischgeschnittene

Bohnenpflanzen, die mit 1-Deoxy-[5,5-²H₂]-D-xylulose (2 mg/ml) inkubiert werden, plaziert. Der Gasraum wird für 48 h lang wie unter 5.4.1 beschrieben analysiert und danach per GC/MS auf den Gehalt an deuterierten Terpenen getestet.

Für Phytohormonquantifizierungen wird immer die gesamte unterhalb der Keimblätter abgetrennte Pflanze verwendet und das Experiment nach der entsprechenden Inkubationszeit abgebrochen.

5.4.3 Inkubationen an *M. tanarius*, *Capsicum annuum*, *Gossypium hirsutum*, *Dypteris filix-mas* und *Zea meize*

Im Fall von Paprika (*Capsicum annuum*), Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) und *M. tanarius* wird jeweils ein einzelnes Blatt für Inkubationen verwendet.

Drei Wochen alte Maispflanzen werden 4 cm über der Erde abgeschnitten und als Ganzes in die entsprechende Inkubationslösung eingestellt oder mit Herbivoren besetzt.

Beim Farn werden mehrere Seitentriebe abgetrennt und zusammen in einer Inkubation verwendet.

5.4.4 Zusammensetzung der Inkubationslösungen und Besatzdichte bei Herbivorie

- | | | |
|-----|----------------------------|---|
| 1) | Cellulysin: | 100 µg/ml in Leitungswasser |
| 2) | Alamethicin: | 10 µg/ml in Leitungswasser |
| 3) | Volicitin: | 100 pM – 1mM in Leitungswasser |
| 4) | Coronatin: | 100 µM in Leitungswasser |
| 5) | Linolensäurekonjugate: | 2 mM in Leitungswasser + 0.1% DMSO |
| 6) | Jasmonsäure: | 1 mM in Leitungswasser |
| 7) | Phenidon: | 1 mM in Leitungswasser |
| 8) | Inlle: | 1 mM in Leitungswasser |
| 9) | 12-OPDA: | 1 mM in Leitungswasser |
| 10) | Acetylsalicylsäure: | 0.5 mM in Leitungswasser |
| 11) | Kontrolle: | Leitungswasser, ggf. Zusatz von 0.1% DMSO |
| 12) | <i>T. urticae</i> : | 200 Tiere / Pflanze |
| 13) | <i>Lepidoptera</i> Larven: | 4 Tiere / Pflanze (3. Larvalstadium) |

5.5 Simultane Quantifizierung von Jasmonsäure (JA) und Salicylsäure (SA)

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationsdauern werden mit einem Skalpell die Blattstiele abgetrennt, die Blattmasse auf ein Gramm eingewogen und unverzüglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach gibt man das noch gefrorene Material in ein Präparateglas (ca. 50 ml) und versetzt es mit 30 ml Aceton-Zitronensäurelösung (70% Aceton, 30% 50 mM wäßrige Zitronensäurelösung (v/v)). Zu dieser Mischung gibt man 146 ng der als interner Standard für JA verwendeten $[9,10\text{-}^2\text{H}_2]$ -9,10-Dihydrojasmonsäure und 500 ng $[3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_4]$ -Salicylsäure als Standard für SA (je 1 ml Lösung der Standards in Aceton; 146 ng/ml respektive 500 ng/ml). Nun wird die Pflanzenmasse durch zehninütige Behandlung mit einem Ultra-Turrax (24000 U/min) mechanisch aufgeschlossen und homogenisiert. Zur Entfernung des Acetons wird die Suspension in einer Kristallisierschale über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen.

Die verbleibende wäßrige Lösung wird durch Filtration von den festen Bestandteilen befreit und anschließend dreimal mit je 10 ml Diethylether extrahiert. Danach werden die vereinigten organischen Phasen auf eine Aminopropyl-Festphasen-Extraktions-Kartusche (Macherey-Nagel, Düren) geladen. Zum Erreichen einer konstanten Durchlaufrate hat sich das Anlegen eines leichten Unterdruckes bewährt. Danach wird die Kartusche mit 6 ml Chloroform : Isopropanol 2:1 (v/v) gewaschen und anschließend wird mit 12 ml Diethylether : Essigsäure 98:2 (v/v) eluiert. Die Probe wird im Argonstrom zur Trockene eingengt, der Probenrückstand dann in ca. 1 ml Diethylether aufgenommen und mit Diazomethan verestert. Nach ca. 5 Minuten Einwirken der Diazomethanlösung wird das Lösungsmittel abermals abgeblasen und der Rückstand für die GC-MS-Analyse in 50 μ l Dichlormethan aufgenommen. Pro Messung wird 1 μ l dieser Lösung in das GC/MS-System eingegeben. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit werden Routinemessungen im „Single Ion Monitoring Mode (SIM)“ aufgenommen, wobei zur Detektion der enthaltenen SA und $[3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_4]$ -SA die Ionen 120 bzw. 124 detektiert werden. Zur Detektion von JA und $[9,10\text{-}^2\text{H}_2]$ -9,10-Dihydro-JA werden dann zu einem späteren Zeitpunkt im Messprogramm nur Ionen der Masse 83 aufgezeichnet.

GC/MS-Bedingungen zur simultanen Quantifizierung von JA und SA:

Temperaturprogramm: 80 °C (2 min), 8 °C/min, 127 °C (5 min), 30 °C/min, 280 °C (3 min).

Injektortemperatur:	260 °C
Injektionsvolumen:	1 µl
Scanbereich:	120, 124 amu (2 – 5 min); 83 amu (8 – 14 min)
Solvent delay:	2 min
Splitverhältnis:	1 : 10
Interface:	260 °C
Trägergas:	He, 3 ml/min

Retentionszeiten (als Methylester):

Salicylsäure:	3.64 min
[3,4,5,6- ² H ₄]-Salicylsäure:	3.61 min
Jasmonsäure:	12.15 min
[9,10- ² H ₂]-9,10-Dihydro-JA:	12.35 min

Zur Evaluierung der Säulentrennleistung, der Empfindlichkeit des GC/MS-Systems und zur exakten Retentionszeitbestimmung wird täglich eine Standardprobe bekannter Konzentration aller Analyten und Standards vermessen. Die Bestimmung des absoluten Gehaltes an endogener JA und SA erfolgt durch Vergleich der Peakflächenverhältnisse (Analyt/Standard) mit unabhängig aufgenommenen Eichgeraden (s. Kapitel 3.1).

Unter Anwendung der gleichen Probenvorbereitung läßt sich auch Abscisinsäure (ABA) in einer Probe anreichern. Zur Quantifizierung werden jeweils 1000 ng der als Standard verwendeten 3-Methyl-[²H₃]-*t*-Abscisinsäure zugesetzt. Bei Verwendung des gleichen GC-Programms mit simultaner Detektion von Ionen der Massen 190 und 193 amu, werden ABA und trideuterierter Standard bei RT=16.02 min registriert.

5.6 Quantifizierung von 12-Oxophytodiensäure (12-OPDA)

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationsdauern werden mit einem Skalpell die Blattstiele abgetrennt, die Blattmasse auf ein Gramm eingewogen und unverzüglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das gutgemörserte Gewebepulver wird dann mit 25 ml Diethylether eine Stunde lang extrahiert, nach weiteren zwei Extraktionen mit je 10 ml Diethylether (je 1 h) abzentrifugiert und das Gesamtlösungsmittelvolumen im Argonstrom auf ca. 25 ml eingestellt. Die etherische Lösung wird auf eine Aminopropyl-

Festphasen-Extraktions-Kartusche (Macherey-Nagel, Düren) geladen, die Kartusche mit 6 ml Chloroform : Isopropanol 2:1 (v/v) gewaschen und anschließend mit 10 ml Diethylether : Essigsäure 98:2 (v/v) eluiert. Die Probe wird im Argonstrom zur Trockene eingengt und der Probenrückstand dann in 100 µl Methanol aufgenommen. 60 µl dieser Lösung werden dann per HPLC auf einer RP-18 – Säule analysiert.

HPLC-Bedingungen zur Quantifizierung von 12-OPDA:

Trennsäule: CC25014 Nucleosil 100-5-C18 (RP-18), Macherey-Nagel (Düren)

Injektionsvolumen: 60 µl

Mobile Phasen: A = Wasser + 0,2 % Trifluoressigsäure

B = Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure

Gradient: B: 40 % (1min), in 5 min auf 50 %, in 15 min auf 60 %, in 35 min auf 98 % (5 min).

Retentionszeit 12-OPDA: 17.6 min

Die Quantifizierung der enthaltenen endogenen 12-OPDA erfolgt durch Vergleich der Peakflächen mit einer unabhängig aufgenommenen Eichgerade.

5.7 Quantifizierung von Indanoncarbonsäure

Frischgeschnittene Bohnenpflanzen werden über die Petiole mit 1 mM Lösung von Indanoyl-isoleucin (In-Ile) inkubiert. Nach Ablauf der gewünschten Inkubationsdauern (1 – 10 h) wird das Blattmaterial zu je ein Gramm eingewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zu einem feinen Pulver zermahlen. Das Gewebepulver wird dann mit 30 ml Diethylether 2 h lang extrahiert, abzentrifugiert und der Überstand auf eine Aminopropyl-Festphasen-Extraktions-Kartusche (Macherey-Nagel, Düren) geladen. Die Kartusche wird mit 6 ml Chloroform : Isopropanol 2:1 (v/v) gewaschen und anschließend mit 10 ml Diethylether : Essigsäure 98:2 (v/v) eluiert. Die Probe wird im Argonstrom zur Trockene eingengt und der Probenrückstand dann mit etherischer Diazomethanlösung verestert. Nach erfolgter Derivatisierung wird in 50 µl Dichlormethan aufgenommen und die Probe per GC/MS vermessen. Die Menge der aus dem aufgenommenen Konjugat freigesetzten Indanoncarbonsäure (als Methylester) kann durch Aufnahme von Chromatogrammen im SIM-Modus (s.o.) abgeschätzt werden. Dabei werden über die

gesamte Messzeit nur Ionen der Masse 190 amu detektiert. Die Überprüfung der Retentionszeit erfolgt mit authentischem Standard.

GC/MS-Bedingungen zur Analytik von Indanoncarbonsäure:

Temperaturprogramm: 50 °C (2 min), 10 °C/min, 280 °C (3 min).

Injektortemperatur: 260 °C

Injektionsvolumen: 1 µl

Scanbereich: 190 amu

Solvent delay: 2 min

Splitverhältnis: 1 : 10

Interface: 260 °C

Trärgas: He, 3 ml/min

Retentionszeit (Indanoncarbonsäure-methylester): 11,67 min

5.8 Aufnahme von Oxylipinsignaturen

Zur Extraktion der im Pflanzengewebe enthaltenen Oxylipine werden nach entsprechender Inkubation 2 g feingemörseretes tiefgefrorenes Gewebepulver in 5 ml eiskaltem Methanol suspendiert. Nach Zufügen von internem Standard (438 ng Dihydrodideutero-JA) wird die Suspension 2 min bei 24000 U/min im Ultra-Turrax homogenisiert und dann für 2 h extrahiert. Nach Zugabe von 3,5 ml Wasser und 1,5 ml Methanol wird die Probe für 5 min auf Eis stengelassen und dann bei 4500 g 15 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und mit 100 µl 1 M Ammoniaklösung auf pH 8-9 eingestellt. Diese Lösung wird dann auf eine C18-SPE Kartusche (Macherey-Nagel, Düren) gegeben und der Durchlauf gesammelt. Die Kartusche wird mit 7 ml Methanol/Wasser (70/30, v/v) nachgewaschen, die kombinierten Eluate mit 100 µl 10%iger Salzsäure angesäuert und 3x mit je 10 ml kaltem Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden zusammengegeben, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird nun in 300 µl Methanol aufgenommen und mit Trimethylphosphit, Diazomethan und MSTFA verestert (vergl. 5.11.1). Nach erfolgter Derivatisierung wird in 10-30 µl Dichlormethan aufgenommen und per GC/MS vermessen.

GC/MS-Bedingungen zur Aufnahme von Oxylipinsignaturen:

Temperaturprogramm: 60 °C (2 min), 5 °C/min, 160 °C, 3 °C/min, 280 °C (1 min).

Injektortemperatur: 270 °C

Injektionsvolumen: 1 µl

Scanbereich: 50 – 470 amu

Solvent delay: 3 min

Splitverhältnis: splitless (2 min)

Interface: 270 °C

Trärgas: He, 1.5 ml/min

5.9 Messung von Ethylen mittels Photoakustikspektroskopie***Induktion von Ethylen durch Elicitoren oder Herbivorie***

Ethylen wird in Echtzeit mit Hilfe der nicht-invasiven Photoakustikspektroskopie (PAS) gemessen. Es stehen zwei Messkammern aus Glas ($V=2,5$ L) zur Verfügung, so daß im Zweikanalmodus gleichzeitig eine Messung an induzierten Pflanzen und eine Kontrollmessung durchgeführt werden kann. Für die Kontrolle werden 2-4 frischgeschnittene Limabohnen in ein Präparategläschen mit Leitungswasser eingestellt und in eine der Messkammern überführt. In der zweiten Messkammer werden entsprechend 2-4 Pflanzen in Inkubationslösung eingestellt oder mit Herbivoren besetzt. Beide Kammern werden dann verschlossen und mit einem konstanten Fluss von 1 L/h katalytisch gereinigter Luft durchströmt. Hinter der jeweiligen Kammer passiert der Luftstrom eine Kühlfalle (Ausfrieren des enthaltenen Kohlendioxids, Wassers und höherer organischer Verbindungen) bevor er die photoakustische Messzelle erreicht. In der Messzelle wird die Ethylenkonzentration alle 3 min aufgezeichnet.

Duftvermittelte Ethyleninduktion

Zur Messung der Ethyleninduktion, hervorgerufen durch das emittierte Duftbouquet einer herbivorenbefallenen oder Elicitor-induzierten Limabohne, wird das selbe Zweikanal-PA-Spektrometer mit drei Messkammern verwendet. In eine vorgeschaltete Kammer ($V=3,5$ L) werden vier induzierte „Duftemitter“-Pflanzen gestellt und der Gasfluss (2 L/h) hinter dieser Kammer geteilt. 50% des Flusses wird in eine Messkammer geleitet, die vier unbefallene „Duftempfänger“-Pflanzen in Leitungswasser

enthält und die übrigen 50% passieren eine leere Referenzkammer gleicher Dimension (2,5 L). Die Menge an Ethylen, die von den Empfängerpflanzen abgegeben wurde ergibt sich als Differenz der Ethylenmengen beider Kanäle.

5.10 Messung von Stickstoffmonoxid mittels Chemolumineszenz

Die Echtzeitmessung des von der Limabohne abgegebenen Stickstoffmonoxids NO nutzt die bei der Radikalreaktion von NO mit Ozon auftretende Chemolumineszenz. Zur Messung der NO-Emission bei Herbivorie werden 2 Bohnenpflanzen in eine Messkammer aus Glas ($V = 4L$) eingestellt und nach 24 h mit 12 Larven von *Spodoptera exigua* besetzt. Katalytisch gereinigte Luft wird mit einem Fluß von 1 L/h durch die Messkammer und in das Chemolumineszenzspektrometer geleitet, wo die NO-Konzentration kontinuierlich aufgezeichnet wird.

5.11 Synthesevorschriften

5.11.1 Allgemeine Vorschrift zur Derivatisierung von Fettsäuren und Oxylipinen für die GC/MS-Analytik

Reine Fettsäuren lassen sich bequem und quantitativ mit etherischer Diazomethanlösung in die flüchtigen Methylester überführen. Dazu nimmt man in einem Chromatographiegläschen (mit 100 µl-Einsatz) ca. 10 µg der Säure in 10 µl Methanol auf und versetzt mit 20 µl etherischer Diazomethanlösung (aus Diazald[®], Aldrich). Nach 5 min wird das Lösungsmittel im Argonstrom abgeblasen und der Rückstand in 10 µl Dichlormethan aufgenommen.

Enthält das zu untersuchende Oxylipin(-gemisch) Hydroperoxide und/oder Hydroxide so hat sich eine Derivatisierungssequenz aus Reduktion, Methylierung und anschließender Silylierung bewährt. 10 µg des Oxylipingemisches werden in einem Chromatographiegläschen mit 20 µl Trimethylphosphit versetzt. Nach 5 min wird im Argonstrom abgeblasen und mit Diazomethan verestert (s.o.). Die nun noch freien Hydroxylfunktionen werden durch Zusatz von 20 µl MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid) bei 50 °C 40 min lang silyliert. Schließlich wird überschüssiges MSTFA abgeblasen und der Rückstand in 20 µl Dichlormethan aufgenommen.

5.11.2 Darstellung von Linolenoyl- α -methyl-isoleucin

39 mg (0.14 mM) Linolensäure und 16 mg (0.16 mM, 22 μ l) Triethylamin werden bei -10 °C unter Argon in 2.5 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Dann wird mit 17 mg (0.16 mM, 15 μ l) Chlorameisensäureethylester versetzt und nach 5 min Rühren eine Lösung von 10 mg (0.07 mM) α -Methylisoleucin in 150 μ l 0.3 M Natronlauge hinzugegeben. Das Kühlbad wird entfernt, und nach 15 min Rühren bei rt. wird die Reaktionsmischung mit 2 M Salzsäure angesäuert und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wird der Rückstand durch viermaliges Waschen mit Diethylether und anschließend per MPLC (RP-18; Acetonitril / Wasser 90:10) gereinigt.

Ausbeute: 2.6 mg (6.4 μ M, 9.1%).

IR (KBr): 3400, 335, 3011, 2980, 2926, 2850, 1696, 1622, 1530, 1440, 1243, 990, 669.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 0.84-0.94 (m, 9H), 1.07-1.33 (m, 12H), 1.36-1.49 (m, 1H), 1.51-1.63 (m, 2H), 1.82-2.05 (m, 5H), 2.12-2.25 (m, 2H), 2.67-2.80 (m, 4H), 5.20-5.37 (m, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 14.0, 14.5, 14.7, 21.0, 23.1, 24.0, 25.9, 26.0, 27.6, 29.5, 29.5, 29.6, 29.8, 30.0, 30.1, 32.3, 37.4, 127.5, 128.2, 128.6, 128.7, 130.6, 132.4, 175.8, 180.2 ppm.

MS (EI, 70eV): 405 (M^+ , 12), 387 (23), 360 (15), 258 (15), 158 (13), 149 (24), 146 (57), 129 (24), 107 (25), 101 (26), 100 (100), 95 (38), 83 (30), 79 (52), 67 (54), 57 (51), 55 (67) m/z.

HR-MS: 405.3256 ($\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{NO}_3$, calc. 405.3243).

5.11.3 Darstellung von [3,4,5,6- $^2\text{H}_4$]-Salicylaldehyd

3,5 g (150 mM) Natrium-Metall werden vorsichtig zu 8.2 ml eisgekühltem Deuteriumoxid (D_2O) gegeben. Nach Ende der heftigen Reaktion wird 1 g (10 mM) Phenol- d_6 zugegeben und auf 80 °C erhitzt. Nach 10 min wird bei 65 °C 1,7 ml (20 mM) Chloroform zugefügt und für 90 min bei 65 °C gehalten. Nach dem Erkalten auf rt. wird mit 5 N Schwefelsäure auf pH 1 angesäuert und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen werden mit konz. Kochsalzlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das nach Entfernung des Lösungsmittels erhaltene Rohprodukt

wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel; Laufmittel: Petrolether / Diethylether 95:5).

Ausbeute: 190 mg (1.51 mM, 15%).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 11.05 (s, 1H, CHO) ppm.

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 118.5 (t), 120.5 (t), 121.9, 134.2 (t), 138 (t), 163.3, 198 (s + t, CHO, CDO) ppm.

MS (EI, 70eV): 127 (M⁺+1, 100), 126 (M⁺, 42), 125 (69), 108 (14), 99 (18), 97 (20), 82 (24), 80 (15), 71 (21), 70 (18), 69 (25), 57 (26) m/z.

HR-MS: 126.0620 (C₇H₂²H₄O₂, calc. 126.0619).

5.11.4 Darstellung von [3,4,5,6-²H₄]-Salicylsäure

Eine Lösung von 66 mg (0.7 mM) Natriumchlorit (NaClO₂) in 600 µl Wasser wird tropfenweise bei rt. zu einer gekühlten Mischung aus 50 mg (0.4 mM) [3,4,5,6-²H₄]-Salicylaldehyd in 400 µl Dimethylsulfoxid und 12 mg Natriumdihydrogenphosphat in 150 µl Wasser gegeben. Die Mischung wird über Nacht bei rt. belassen, dann mit 3 ml 10 %iger wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt und dreimal mit Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wird nun mit 2 M Salzsäure angesäuert und dreimal mit Essigsäureethylester (EE) extrahiert. Die vereinigten EE-Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird aus Wasser umkristallisiert und per MPLC (RP-18, Acetonitril / Wasser 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 15 mg (0.11 mM, 28%).

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄): kein Signal.

¹³C-NMR (500 MHz, MeOH-d₄): 114, 118 (t), 119.5 (t), 131 (t), 136.3 (t), 163, 173.5 ppm.

MS (EI, 70eV): 142 (M⁺, 49), 124 (100), 96 (50), 69 (9), 68 (17) m/z.

HR-MS: 142.0566 (C₇H₂²H₄O₃, calc. 142.0568).

5.11.5 Darstellung von [9,10-²H₂]-9,10-Dihydrojasmonsäure

Eine Spatelspitze Platindioxid wird in einem Rundkolben unter absoluten Bedingungen mit Deuterium überströmt. Nach Aktivierung des Platins (Schwarzfärbung) werden 15 ml trockener Ether und 1,0 g (4,46 mM) Methyljasmonat, gelöst in 10 ml Ether, zugesetzt. Nach vollständiger Umsetzung (GC/MS-Kontrolle) wird der Katalysator durch Filtration

abgetrennt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Zwischenprodukt (641 mg, 2,81 mM) wird nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Petrolether/Ether 80:20) in 10 ml Methanol gelöst und 620 mg Kaliumcarbonat sowie 0.2 ml Wasser zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wird eine Stunde unter Rückfluss erhitzt und danach zu 80 ml Wasser gegeben. Die wässrige Phase wird fünfmal mit Pentan gewaschen, danach mit konzentrierter Salzsäure auf pH 4.5 angesäuert und mit Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 534,2 mg (2,5 mM, 56%).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturwerten überein.^[92]

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0.84-0.90 (t, 3H), 1.18-1.44 (m, 4H), 1.44-1.62 (m, 3H), 1.78-1.85 (m, 1H), 2.08-2.20 (m, 1H), 2.20-2.43 (m, 3H), 2.64-2.73 (m, 1H), 3.50 (q, 1H) ppm.

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 14 (t), 22.3 (td), 25.9 (m), 27.2, 27.7, 29.7 (m), 38.7, 39.8, 40.8, 56.1, 180.4, 222.9 ppm.

MS (als Methylester, EI, 70eV): 156 (12), 97 (12), 96 (12), 84 (32), 83 (100), 82 (30), 74 (10), 67 (11), 55 (25) m/z.

5.11.6 Darstellung eines Gemisches aus Linolensäure-abgeleiteten Oxylipinen

60 mg (216 µM) Linolensäure werden im Ultraschallbad in einem Gemisch aus 90 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) und 180 ml 0,2 M Kaliumchloridlösung suspendiert. Anschließend wird die Reaktion bei 37 °C durch Zugabe von 60 mg (0,2 mM) Eisen-(II)-sulfat-heptahydrat gestartet. Nach 18 h Rühren bei 37 °C wird mit 0,2 M Salzsäure auf pH 3-4 angesäuert und die Reaktionsmischung dreimal mit je 100 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der gelbe Rückstand aus Oxidationsprodukten wird in zwei Teile geteilt (1:1). Ein Teil wird direkt für Inkubationen verwendet und der andere wird zur Entfernung von Hydroperoxiden durch Zugabe von 300 µl Trimethylphosphit zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert. Das stabilere reduzierte Gemisch wird dann ebenfalls für Inkubationen an der Limabohne verwendet. Das Dünnschichtchromatogramm der Reaktionsmischung vor der Reduktion (Laufmittel: Hexan/Essigsäureethylester 1:1 + 1% Essigsäure) zeigt einen vollständigen Umsatz der

eingesetzten Linolensäure an. Das entstandene Gemisch aus Oxidationsprodukten weist eine breite Bande mit r_f -Werten von 0,13 – 0,63 auf.

Antrennung des Gemischs mittels präparativer Dünnschichtchromatographie:

30 mg des erhaltenen Rohgemisches werden per präparativer Dünnschichtchromatographie in sechs Fraktionen getrennt (Kieselgel 60, Schichtdicke 2 mm, Laufmittel: Hexan / Essigsäureethylester 1:1 + 0.1% Essigsäure). Nach Detektion der Banden per UV (254 nm) wird das ausgelöste Kieselgel mit Chloroform und Methanol extrahiert. Alle erhaltenen sechs Fraktionen werden für Inkubationen verwendet.

Ausbeute und r_f -Werte:

Fraktion 1:	2,4 mg,	$r_f = 0,06$
Fraktion 2:	2.9 mg,	$r_f = 0,15$
Fraktion 3:	8,4 mg,	$r_f = 0,29$
Fraktion 4:	6.5 mg,	$r_f = 0,41$
Fraktion 5:	1.2 mg,	$r_f = 0,62$
Fraktion 6:	1.8 mg,	$r_f = 0,79$

5.11.7 Darstellung von (9S,10E,12Z,15Z)-9-Hydroperoxy-10,12,15-octadecatriensäure

1,0 Kg handelsübliche Strauchtomaten werden in 600 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 5,7) homogenisiert und das Homogenat unter gleichzeitiger Einleitung von Luft gerührt. Zu dieser Mischung wird 1,0 g (3,6 mM) Linolensäure, emulgiert in 300 ml 0,1 M Phosphatpuffer, gegeben. Zur Herstellung der Linolensäureemulsion ist der Zusatz von 1 ml Tween 20 und 30 min Behandlung mit Ultraschall erforderlich. Nach 4 h starkem Rühren unter Luftzutritt wird die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 20 ml 0,2 M Salzsäure abgebrochen und die wässrige Phase dreimal mit je 800 ml Diethylether extrahiert. Phasentrennung wird durch Zentrifugation bei 2500 U/min erreicht. Die aus festen Zellbestandteilen bestehende Zwischenphase wird gesammelt und dreimal mit Ether gewaschen. Die vereinigten etherischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei 20 °C im Vakuum entfernt.

Rohausbeute: 0.727 g (65%), gelbrotes Öl.

100 mg des Rohproduktes werden per präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt (Kieselgel 60, Schichtdicke 2 mm, Laufmittel: Hexan / Essigsäureethylester / Essigsäure 600:400:1). Die unter UV (254 nm) gut sichtbare Produktbande ($r_f = 0.34$) wird ausgelöst und dreimal mit je 30 ml Essigsäureethylester extrahiert.

Ausbeute: 58 mg (187 μ M, 58%), gelbes Öl.

MS (nach Derivatisierung, s. 5.11.1): 380 (M^+ , 4), 311 (58), 223 (72), 157 (19), 133 (22), 91 (26), 79 (29), 75 (34), 73 (100), 55 (14) m/z.

5.11.8 Darstellung von (9S,10E,12Z,15Z)-9-Hydroxy-10,12,15-octadecatriensäure

58 mg (187 μ M) 9S-Hydroperoxyoctadecatriensäure werden in 8 ml Dichlormethan gelöst und 100 μ l (806 μ M) Trimethylphosphit zugegeben. Nach 10 min Rühren bei rt. wird das Lösungsmittel und überschüssiges Reagenz im Vakuum entfernt und das entstandene Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60, Laufmittel: Hexan / Essigsäureethylester / Essigsäure 600:400:1).

Ausbeute: 29 mg (99 μ M, 53%).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 0.9 (t, 3H), 1.18-1.38 (m, 8H), 1.40-1.60 (m, 4H), 2.0 (m, 2H), 2.28 (t, 2H), 2.87 (t, 2H), 4.1 (m, 1H), 5.20-5.30 (m, 1H), 5.30-5.40 (m, 2H), 5.57-5.67 (dd, 1H), 5.87-5.97 (t, 1H), 6.40-6.50 (t, 1H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 14.5, 20.5, 24.5, 25.0, 25.5, 29.2, 29.6, 29.7, 34.0, 37.0, 73.0, 125.5, 126.0, 127.7, 130.5, 132.5, 136.3, 179.9 ppm.

MS (EI, 70eV): 294 (M^+ , 5), 276 (84), 247 (18), 207 (24), 171 (40), 151 (30), 147 (35), 133 (50), 125 (22), 119 (37), 109 (40), 108 (91), 105 (54), 95 (47), 93 (63), 91 (79), 83 (38), 81 (62), 80 (62), 79 (100), 77 (37), 67 (64), 55 (64) m/z.

HR-MS: 294.2197 ($\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3$, calc. 294.2195).

5.11.9 Darstellung von (10E,12Z,15Z)-9-Oxo-10,12,15-octadecatriensäure

8.7 mg (29.7 μ M) (9S,10E,12Z,15Z)-9-Hydroxy-10,12,15-octadecatriensäure werden in 300 μ l Dichlormethan gelöst und 10 mg Bobbitts Reagenz (4-Acetylamino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxoammoniumperchlorat) und 5 mg Kieselgel 60 zugegeben. Nach 35 min Rühren bei rt. wird das Lösungsmittel im Argonstrom entfernt, der Rückstand in Hexan / Essigsäureethylester / Essigsäure (1:1 + 0.1%) aufgenommen und in diesem Lösungsmittel säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60).

Ausbeute: 6 mg (20.5 μ M, 69%).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 0.9 (t, 3H), 1.15-1.35 (m, 6H), 1.47-1.61 (m, 4H), 2.0 (m, 2H), 2.25 (t, 2H), 2.5 (t, 2H), 3.0 (t, 2H), 5.25 (m, 1H), 5.4 (m, 1H), 5.79 (m, 1H), 6.00-6.18 (m, 2H), 7.45 (dd, 1H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 14.0, 20.7, 24.0, 24.3, 24.7, 26.5, 28.9, 29.2, 34.0, 41.2, 125.2, 127.0, 129.9, 133.3, 136.8, 140.3, 179.9, 201.2 ppm.

MS (EI, 70eV): 292 (M^+ , 75), 274 (17), 223 (64), 171 (74), 149 (55), 135 (17), 125 (46), 121 (51), 107 (50), 97 (38), 95 (46), 93 (46), 83 (49), 81 (54), 79 (77), 77 (32), 69 (23), 67 (36), 55 (100) m/z.

HR-MS: 292.2037 ($\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_3$, calc. 292.2038).

5.11.10 Darstellung von (13S,9Z,11E,15E)-13-Hydroperoxy-9,11,15-octadecatriensäure

1.00 g (3.6 mM) Linolensäure werden in 600 ml 0.1 M Boratpuffer (pH 9.0) in einem Ultraschallbad emulgiert. Die Emulsion wird bei 20°C kräftig gerührt und mit 100 mg Sojabohnen-Lipoxygenase (5.3 U) versetzt. Nach einigen Minuten entsteht eine klare Lösung. Die Reaktion wird nach 1 h durch Zugabe von 10 ml 2 M Salzsäure abgebrochen und dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und bei 20°C im Vakuum eingengt. Rohausbeute: 830 mg (2.7 mM, 75%), farbloses Öl.

270 mg (0,88 mM) Rohprodukt werden säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60, Laufmittel: Hexan / Essigsäureethylester / Essigsäure 600:400:1).

Ausbeute: 104 mg (0.34 mM, 39%).

MS (EI, 70eV, nach Derivatisierung, s. 5.11.1): 380 (M^+ , 1), 311 (100), 207 (15), 189 (8), 171 (17), 161 (15), 149 (15), 129 (10), 93 (15), 91 (10), 73 (97), 67 (15), 55 (13) m/z.

5.11.11 Darstellung von (13S,9Z,11E,15E)-13-Hydroxy-9,11,15-octadecatriensäure

Die Darstellung erfolgt analog zu 5.11.8. 60 mg (196 μ M) (13S,9Z,11E,15E)-13-Hydroperoxy-9,11,15-octadecatriensäure werden mit 100 μ l (806 μ M) Trimethylphosphit umgesetzt.

Ausbeute: 33 mg (112 μ M, 57%).

MS (EI, 70eV, nach Derivatisierung, s. 5.11.1): 380 (M^+ , 1), 311 (100), 207 (15), 189 (8), 171 (17), 161 (15), 149 (15), 129 (10), 93 (15), 91 (10), 73 (97), 67 (15), 55 (13) m/z.

5.11.12 Darstellung von (9Z,11E,15E)-13-Oxo-9,11,15-octadecatriensäure

Die Darstellung erfolgt analog zu 5.11.9. 22,9 mg (77,7 μ M) (13S,9Z,11E,15E)-13-Hydroxy-9,11,15-octadecatriensäure werden mit 27 mg (0,09 mM) Bobbitts Reagenz umgesetzt.

Ausbeute: 13.3 mg (45.4 μ M, 58,4%).

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): 0.9 (t, 3H), 1.15-1.4 (m, 8H), 1.50-1.62 (m, 2H), 2.0 (m, 2H), 2.20-2.33 (m, 4H), 3.25 (d, 2H), 5.43-5.59 (m, 2H), 5.75-5.90 (m, 1H), 6.02-6.17 (m, 2H), 7.42-7.5 (t, 1H) ppm.

^{13}C -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): 14.0, 20.5, 24.5, 28.0, 28.3, 28.7, 29.0, 29.5, 34.0, 40.0, 120.5, 127.0, 128.5, 135.0, 137.7, 143.0, 179.3, 198.7 ppm.

MS (EI, 70eV): 292 (M^+ , 7), 224 (16), 223 (100), 149 (29), 135 (10), 123 (12), 109 (15), 107 (17), 97 (14), 95 (27), 83 (17), 81 (64), 79 (19), 69 (24), 67 (30), 57 (23), 55 (45) m/z.

HR-MS: 292.2039 ($C_{18}H_{28}O_3$, calc. 292.2038).

6 Literaturverzeichnis

- [1] G. Tembrock, *Biokommunikation*, Vieweg & Sohn, Berlin, **1971**.
- [2] International Society of Chemical Ecology, www.chemecol.org, **2001**.
- [3] J. B. Harborne, *Nat. Prod. Reports* **1999**, *16*, 509-523.
- [4] J. Leon, E. Rojo, J. J. Sanchez-Serrano, *J. Exp. Botany* **2001**, *52*, 1-9.
- [5] J. Nielsen, J. J. Boomsma, N. J. Oldham, H. C. Petersen, E. D. Morgan, *Insectes Sociaux* **1999**, *46*, 58-65.
- [6] A. E. Hillery, R. D. Fell, *Annals of the Entomological Society of America* **2000**, *93*, 1294-1299.
- [7] R. Moranz, L. P. Brower, *J. Chem. Ecol.* **1998**, *24*, 905-932.
- [8] T. Eisner, M. Eisner, E. R. Hoebeker, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1998**, *95*, 4410-4414.
- [9] B. F. Hagele, E. Wildi, J. Harmatha, M. Pavlik, M. Rowell-Rahier, *J. Chem. Ecol.* **1998**, *24*, 1733-1743.
- [10] W. M. Daniewski, M. Gumulka, W. Anczewski, M. Masnyk, E. Bloszyk, K. K. Gupta, *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1279-1282.
- [11] C. Nozzolillo, J. T. Arnason, F. Campos, N. Donskov, M. Jurzysta, *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 995-1002.
- [12] I. T. Baldwin, E. A. Schmelz, Z. P. Zhang, *J. Chem. Ecol.* **1996**, *22*, 61-74.
- [13] J. L. Bi, J. B. Murphy, G. W. Felton, *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 97-117.
- [14] C. R. Roseland, T. J. Grosz, *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 517-542.
- [15] J. A. Casaretto, L. J. Corcuera, *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2279-2286.
- [16] G. Pohnert, *Angew. Chemie-Intl. Ed.* **2000**, *39*, 4352.
- [17] M. Dicke, R. Gols, D. Ludeking, M. A. Posthumus, *J. Chem. Ecol.* **1999**, *25*, 1907-1922.
- [18] M. Dicke, M. W. Sabelis, J. Takabayashi, J. Bruin, M. A. Posthumus, *J. Chem. Ecol.* **1990**, *16*, 3091-3118.
- [19] T. C. J. Turlings, J. H. Tumlinson, W. J. Lewis, *Science* **1990**, *250*, 1251-1253.
- [20] T. C. J. Turlings, P. J. McCall, H. T. Alborn, J. H. Tumlinson, *J. Chem. Ecol.* **1993**, *19*, 411-425.
- [21] J. S. Thaler, *Nature* **1999**, *399*, 686-688.
- [22] T. Alborn, T. C. J. Turlings, T. H. Jones, G. Stenhagen, J. H. Loughrin, J. H. Tumlinson, *Science* **1997**, *276*, 945-949.
- [23] A. B. Bleecker, H. Kende, *Ann. Rev. Cell and Dev. Biology* **2000**, *16*, 1.
- [24] R. Karban, I. T. Baldwin, K. J. Baxter, G. Laue, G. W. Felton, *Oecologia* **2000**, *125*, 66-71.
- [25] M. Miksch, W. Boland, *Experientia* **1996**, *52*, 739-743.
- [26] M. A. Birkett, C. A. M. Campbell, K. Chamberlain, E. Guerrieri, A. J. Hick, J. L. Martin, M. Matthes, J. A. Napier, J. Pettersson, J. A. Pickett, G. M. Poppy, E. M. Pow, B. J. Pye, L. E. Smart, G. H. Wadhams, L. J. Wadhams, C. M. Woodcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **2000**, *97*, 9329-9334.
- [27] V. Shulaev, P. Silverman, I. Raskin, *Nature* **1997**, *385*, 718-721.
- [28] E. F. Elstner, W. Oßwald, I. Schneider, *Phytopathologie*, 1 ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1996**.

- [29] R. K. Cameron, *Physiological and Molecular Plant Pathology* **2000**, *56*, 91-93.
- [30] E. Demole, E. Lederer, D. Mercier, *Helvetica Chimica Acta* **1962**, *45*, 675.
- [31] A. Meyer, O. Miersch, C. Buttner, W. Dathe, G. Sembdner, *J. Plant Growth Regulation* **1984**, *3*, 1-8.
- [32] J. Ueda, J. Kato, H. Yamane, N. Takahashi, *Physiologia Plantarum* **1981**, *52*, 305-309.
- [33] R. A. Weidhase, J. Lehmann, H. Kramell, G. Sembdner, B. Parthier, *Physiologia Plantarum* **1987**, *69*, 161-166.
- [34] H. Yamane, J. Sugawara, Y. Suzuki, E. Shimamura, N. Takahashi, *Agricultural and Biological Chemistry* **1980**, *44*, 2857-2864.
- [35] R. A. Creelman, J. E. Mullet, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1995**, *92*, 4114-4119.
- [36] D. Bowles, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **1998**, *353*, 1495-1510.
- [37] H. Koiwa, R. A. Bressan, P. M. Hasegawa, *Trends in Plant Science* **1997**, *2*, 379-384.
- [38] B. A. Vick, D. C. Zimmerman, *Plant Phys.* **1984**, *75*, 458-461.
- [39] M. J. Mueller, *Physiologia Plantarum* **1997**, *100*, 653-663.
- [40] L. L. Walling, *J. Plant Growth Regulation* **2000**, *19*, 195-216.
- [41] I. T. Baldwin, C. A. Preston, *Planta* **1999**, *208*, 137-145.
- [42] E. Carrera, S. Prat, *Plant Journal* **1998**, *15*, 765-771.
- [43] W. S. Chao, Y. Q. Gu, V. Pautot, E. A. Bray, L. L. Walling, *Plant Phys.* **1999**, *120*, 979-992.
- [44] H. PenaCortes, S. Prat, R. Atzorn, C. Wasternack, L. Willmitzer, *Planta* **1996**, *198*, 447-451.
- [45] P. J. Odonnell, C. Calvert, R. Atzorn, C. Wasternack, H. M. O. Leyser, D. J. Bowles, *Science* **1996**, *274*, 1914-1917.
- [46] J. Kahl, D. H. Siemens, R. J. Aerts, R. Gäbler, F. Kühnemann, C. A. Preston, I. T. Baldwin, *Planta* **2000**, *210*, 336-342.
- [47] A. Kernan, R. W. Thornburg, *Plant Phys.* **1989**, *91*, 73-78.
- [48] E. W. Weiler, T. Albrecht, B. Groth, Z. Q. Xia, M. Luxem, H. Liss, L. Andert, P. Spengler, *Phytochemistry* **1993**, *32*, 591-600.
- [49] H. W. Gardner, *Biochimica et Biophysica Acta* **1991**, *1084*, 221-239.
- [50] E. Blee, *Progress in Lipid Research* **1998**, *37*, 33-72.
- [51] W. Boland, J. Hopke, J. Donath, J. Nüske, F. Bublitz, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1995**, *34*, 1600-1602.
- [52] M. Rohmer, *Nat. Prod. Reports* **1999**, *16*, 565-574.
- [53] W. Boland, A. Gaebler, *Helvetica Chimica Acta* **1989**, *72*, 247-253.
- [54] C. Bender, D. Palmer, A. Penalzoza-Vazquez, V. Rangswamy, M. Ullrich, *Archives of Microbiology* **1996**, *166*, 71-75.
- [55] J. Piel, R. Atzorn, R. Gäbler, F. Kühnemann, W. Boland, *FEBS Letters* **1997**, *416*, 143-148.
- [56] T. Koch, Diplomarbeit, Rheinische Friedrich Willhelms Universität Bonn, **1998**.
- [57] B. B. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Pathologists, Rockville, Maryland, **2000**.
- [58] I. Raskin, A. Ehmann, W. R. Melander, B. J. D. Meeuse, *Science* **1987**, *237*, 1601-1602.
- [59] E. Warm, *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **1980**, *99*, 325-330.
- [60] N. Li, B. L. Parsons, D. R. Liu, A. K. Mattoo, *Plant Mol. Biol.* **1992**, *18*, 477-487.

- [61] A. P. Jarvis, O. Schaaf, N. J. Oldham, *Planta* **2000**, *212*, 119-126.
- [62] K. Kleczkowski, J. Schell, *Critical Reviews in Plant Sciences* **1995**, *14*, 283-298.
- [63] M. E. Alvarez, *Plant Mol. Biol.* **2000**, *44*, 429-442.
- [64] L. Sticher, B. MauchMani, J. P. Metraux, *Ann. Rev. Phytopathology* **1997**, *35*, 235-270.
- [65] J. A. Ryals, U. H. Neuenschwander, M. G. Willits, A. Molina, H. Y. Steiner, M. D. Hunt, *Plant Cell* **1996**, *8*, 1809-1819.
- [66] M. Schneider, P. Schweizer, P. Meuwly, J. P. Metraux, in *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 168, Vol. 168*, Academic Press Inc, San Diego, **1996**, pp. 303-340.
- [67] E. Hoffland, G. J. Niemann, J. A. VanPelt, J. B. M. Pureveen, G. B. Eijkel, J. J. Boon, H. Lambers, *Plant Cell and Environment* **1996**, *19*, 1281-1290.
- [68] J. A. Pallas, N. L. Paiva, C. Lamb, R. A. Dixon, *Plant Journal* **1996**, *10*, 281-293.
- [69] V. Shulaev, J. Leon, I. Raskin, *Plant Cell* **1995**, *7*, 1691-1701.
- [70] R. M. Bostock, *Physiol. and Mol. Plant Pathology* **1999**, *55*, 99-109.
- [71] G. W. Felton, K. L. Korth, J. L. Bi, S. V. Wesley, D. V. Huhman, M. C. Mathews, J. B. Murphy, C. Lamb, R. A. Dixon, *Curr. Biology* **1999**, *9*, 317-320.
- [72] M. Heil, A. Hilpert, W. Kaiser, K. E. Linsenmair, *J. Ecology* **2000**, *88*, 645-654.
- [73] J. R. Ecker, *Science* **1995**, *268*, 667-675.
- [74] L. Stella, S. Wouters, F. Baldellon, *Bulletin De La Societe Chimique De France* **1996**, *133*, 441-455.
- [75] H. U. Stotz, B. R. Pittendrigh, J. Kroymann, K. Weniger, J. Fritsche, A. Bauke, T. Mitchell-Olds, *Plant Phys.* **2000**, *124*, 1007-1017.
- [76] C. M. J. Pieterse, S. C. M. van Wees, J. A. van Pelt, M. Knoester, R. Laan, N. Gerrits, P. J. Weisbeek, L. C. van Loon, *Plant Cell* **1998**, *10*, 1571-1580.
- [77] T. Krumm, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **1998**.
- [78] C. L. Bender, F. Alarcon-Chaidez, D. C. Gross, *Microbiology and Mol. Biol. Reviews* **1999**, *63*, 266.
- [79] F. Kühnemann, W. Urban, *Physikalische Blätter* **2000**, *56 Nr.1*, 43-46.
- [80] T. S. Elias, *The Biology of Nectaries*, Columbia University Press, New York, **1983**.
- [81] S. Koptur, *Insect-Plant Interactions, Vol. 4*, CRC Press, Boca Raton, **1992**.
- [82] A. Crozier, *Principles and Practice of Plant Hormone Analysis, Vol. 1 u. 2*, Academic Press, London, **1987**.
- [83] R. A. Creelman, M. L. Tierney, J. E. Mullet, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1992**, *89*, 4938-4941.
- [84] N. Mirjalili, J. C. Linden, *Biotechnology Progress* **1996**, *12*, 110-118.
- [85] T. Albrecht, A. Kehlen, K. Stahl, H. D. Knofel, G. Sembdner, E. W. Weiler, *Planta* **1993**, *191*, 86-94.
- [86] E. S. McCloud, I. T. Baldwin, *Planta* **1997**, *203*, 430-435.
- [87] H. Nojiri, H. Yamane, H. Seto, I. Yamaguchi, N. Murofushi, T. Yoshihara, H. Shibaoka, *Plant Cell Physiology* **1992**, 1225-1231.
- [88] M. J. Mueller, W. Brodschelm, *Analytical Biochemistry* **1994**, *218*, 425-435.
- [89] S. Parchmann, H. Gundlach, M. J. Mueller, *Plant Phys.* **1997**, *115*, 1057-1064.
- [90] S. M. Wilbert, L. H. Ericsson, M. P. Gordon, *Analytical Biochemistry* **1998**, *257*, 186-194.
- [91] I. T. Baldwin, Z. P. Zhang, N. Diab, T. E. Ohnmeiss, E. S. McCloud, G. Y. Lynds, E. A. Schmelz, *Planta* **1997**, *201*, 397-404.

- [92] T. Gehrke, Diplomarbeit, Universität Bonn, **1997**.
- [93] Skoog, Leary, *Instrumentelle Analytik*, Springer, Hamburg, **1996**.
- [94] H. G. Zachmann, *Mathematik für Chemiker*, VCH, Weinheim, **1990**.
- [95] J. B. Rasmussen, R. Hammerschmidt, M. N. Zook, *Plant Phys.* **1991**, *97*, 1342-1347.
- [96] C. Martinez, J. C. Baccou, E. Bresson, Y. Baissac, J. F. Daniel, A. Jalloul, J. L. Montillet, J. P. Geiger, K. Assigbetse, M. Nicole, *Plant Phys.* **2000**, *122*, 757-766.
- [97] T. Kakkar, M. Mayersohn, *J. Chromatography B* **1998**, *718*, 69-75.
- [98] I. M. Scott, H. Yamamoto, *Phytochemistry* **1994**, *37*, 335-336.
- [99] M. Veith, N. J. Oldham, K. Dettner, J. M. Pasteels, W. Boland, *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 429-443.
- [100] D. Laudert, P. Hennig, B. A. Stelmach, A. Müller, L. Andert, E. W. Weiler, *Analytical Biochemistry* **1997**, *246*, 211-217.
- [101] B. A. Stelmach, A. Müller, P. Hennig, D. Laudert, L. Andert, E. W. Weiler, *Phytochemistry* **1998**, *47*, 539-546.
- [102] B. A. Stelmach, A. Müller, E. W. Weiler, *Phytochemistry* **1999**, *51*, 187-192.
- [103] P. M. Swamy, B. N. Smith, *Current Science* **1999**, *76*, 1220-1227.
- [104] J. Leung, J. Giraudat, *Ann. Rev. Plant Phys. and Plant Mol. Biol.* **1998**, *49*, 199-222.
- [105] T. Krumm, K. Bandemer, W. Boland, *FEBS Letters* **1995**, *377*, 523-529.
- [106] G. Schüler, Dissertation, FSU-Jena (Jena), **2001**.
- [107] M. G. Hahn, *Ann. Rev. of Phytopathology* **1996**, *34*, 387-412.
- [108] P. W. Pare, J. H. Tumlinson, *Florida Entomologist* **1996**, *79*, 93-103.
- [109] T. Jabs, M. Tschöpe, C. Colling, K. Hahlbrock, D. Scheel, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1997**, *94*, 4800-4805.
- [110] J. L. Dangl, K. D. Hauffe, S. Lipphardt, K. Hahlbrock, D. Scheel, *Embo Journal* **1987**, *6*, 2551-2556.
- [111] Y. Matthieu, A. Kurkdjian, Y. Xia, J. Guern, A. Koller, M. D. Spiro, M. O'Neill, P. Albersheim, A. G. Darvill, *Plant Journal* **1991**, *1*, 333-343.
- [112] B. Klüsener, E. W. Weiler, *Febs Letters* **1999**, *459*, 263-266.
- [113] D. S. Cafiso, *Ann. Rev. of Biophysics and Biomol. Structure* **1994**, *23*, 141-165.
- [114] M. S. P. Sansom, *Quarterly Reviews of Biophysics* **1993**, *26*, 365-421.
- [115] T. Koch, T. Krumm, V. Jung, J. Engelberth, W. Boland, *Plant Phys.* **1999**, *121*, 153-162.
- [116] C. Cucurou, J. P. Battioni, D. C. Thang, N. H. Nam, D. Mansuy, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8964-8970.
- [117] M. D. Rosenthal, B. S. Vishwanath, R. C. Franson, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1989**, *1001*, 1-8.
- [118] M. Ritzau, S. Heinze, K. Dornberger, A. Berg, W. Fleck, B. Schlegel, A. Hartl, U. Gräfe, *J. Antibiotics* **1997**, *50*, 722-728.
- [119] A. Berg, B. Schlegel, W. Ihn, U. Demuth, U. Gräfe, *J. Antibiotics* **1999**, *52*, 666-669.
- [120] K. Dornberger, W. Ihn, M. Ritzau, U. Gräfe, B. Schlegel, W. F. Fleck, J. W. Metzger, *J. Antibiotics* **1995**, *48*, 977-989.
- [121] R. M. Bostock, R. Karban, J. S. Thaler, P. D. Weyman, D. Gilchrist, *European J. Plant Pathology* **2001**, *107*, 103-111.

- [122] H. Penacortes, T. Albrecht, S. Prat, E. W. Weiler, L. Willmitzer, *Planta* **1993**, *191*, 123-128.
- [123] D. Laudert, E. W. Weiler, *Plant Journal* **1998**, *15*, 675-684.
- [124] S. H. Doares, J. Narvaezvasquez, A. Conconi, C. A. Ryan, *Plant Phys.* **1995**, *108*, 1741-1746.
- [125] K. Maleck, R. A. Dietrich, *Trends in Plant Science* **1999**, *4*, 215-219.
- [126] R. Koljak, O. Boutaud, B. H. Shieh, N. Samel, A. R. Brash, *Science* **1997**, *277*, 1994-1996.
- [127] E. Blee, *Fett-Lipid* **1998**, *100*, 121-127.
- [128] S. Vollenweider, H. Weber, S. Stolz, A. Chetelat, E. E. Farmer, *Plant Journal* **2000**, *24*, 467-476.
- [129] P. U. M. Devi, P. S. Reddy, N. R. U. Rani, K. J. Reddy, M. N. Reddy, P. Reddanna, *European J. Plant Pathology* **2000**, *106*, 857-865.
- [130] M. Hamberg, Samuelss.B, *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 5329.
- [131] J. A. Matthew, H. W. S. Chan, T. Galliard, *Lipids* **1977**, *12*, 324-326.
- [132] J. M. Bobbitt, *J. Organic Chemistry* **1998**, *63*, 9367-9374.
- [133] R. Kramell, O. Miersch, R. Atzorn, B. Parthier, C. Wasternack, *Plant Phys.* **2000**, *123*, 177-187.
- [134] B. Hause, I. Stenzel, O. Miersch, H. Maucher, R. Kramell, J. Ziegler, C. Wasternack, *Plant Journal* **2000**, *24*, 113-126.
- [135] E. E. Farmer, H. Weber, S. Vollenweider, *Planta* **1998**, *206*, 167-174.
- [136] P. Spiteller, Diplomarbeit, Bayreuth **1997**.
- [137] G. Pohnert, V. Jung, E. Haukioja, K. Lempa, W. Boland, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11275-11280.
- [138] H. T. Alborn, T. H. Jones, G. S. Stenhagen, J. H. Tumlinson, *J. Chem. Ecol.* **2000**, *26*, 203-220.
- [139] G. Pohnert, T. Koch, W. Boland, *Chem. Comm.* **1999**, 1087-1088.
- [140] S. Gouinguene, T. Degen, T. C. J. Turlings, *Chemoecology* **2001**, *11*, 9-16.
- [141] K. G. Collatz, T. Mommsen, *J. Comparative Physiology* **1974**, *94*, 339-352.
- [142] D. Spiteller, K. Dettner, W. Boland, *Biological Chemistry* **2000**, *381*, 755-762.
- [143] C. H. Stammer, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 2231-2254.
- [144] A. Kessler, I. T. Baldwin, *Science* **2001**, *291*, 2141-2144.
- [145] C. Lamb, R. A. Dixon, *Ann.l Rev. Plant Phys. and Plant Mol. Biol.* **1997**, *48*, 251-275.
- [146] J. M. McDowell, J. L. Dangl, *Trends in Biochemical Sciences* **2000**, *25*, 79-82.
- [147] S. Blechert, W. Brodschelm, S. Holder, L. Kammerer, T. M. Kutchan, M. J. Mueller, Z. Q. Xia, M. H. Zenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1995**, *92*, 4099-4105.
- [148] R. Karban, I. T. Baldwin, *Induced Responses to Herbivory*, University of Chicago Press, Chicago, **1997**.
- [149] A. J. van der Westhuizen, X. M. Qian, A. M. Botha, *Plant Cell Reports* **1998**, *18*, 132-137.
- [150] U. Schittko, C. A. Preston, I. T. Baldwin, *Planta* **2000**, *210*, 343-346.
- [151] J. Durner, D. F. Klessig, *Current Opinion in Plant Biology* **1999**, *2*, 369-374.
- [152] M. V. Beligni, L. Lamattina, *Planta* **1999**, *208*, 337-344.
- [153] M. Delledonne, Y. J. Xia, R. A. Dixon, C. Lamb, *Nature* **1998**, *394*, 585-588.
- [154] J. Durner, D. Wendehenne, D. F. Klessig, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1998**, *95*, 10328-10333.

- [155] J. Wildt, D. Kley, A. Rockel, P. Rockel, H. J. Segschneider, *J. Geophysical Research-Atmospheres* **1997**, *102*, 5919-5927.
- [156] B. Thomma, K. Eggermont, I. Penninckx, B. Mauch-Mani, R. Vogelsang, B. P. A. Cammue, W. F. Broekaert, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1998**, *95*, 15107-15111.
- [157] T. C. J. Turlings, U. B. Lengwiler, M. L. Bernasconi, D. Wechsler, *Planta* **1998**, *207*, 146-152.
- [158] J. H. Loughrin, A. Manukian, R. R. Heath, T. C. J. Turlings, J. H. Tumlinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1994**, *91*, 11836-11840.
- [159] C. M. De Moraes, W. J. Lewis, P. W. Pare, H. T. Alborn, J. H. Tumlinson, *Nature* **1998**, *393*, 570-573.
- [160] E. E. Farmer, C. A. Ryan, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1990**, *87*, 7713-7716.
- [161] J. Bruin, M. Dicke, M. W. Sabelis, *Experientia* **1992**, *48*, 525-529.
- [162] J. Bruin, M. W. Sabelis, M. Dicke, *Trends in Ecology & Evolution* **1995**, *10*, 371-371.
- [163] G. Arimura, R. Ozawa, T. Shimoda, T. Nishioka, W. Boland, J. Takabayashi, *Nature* **2000**, *406*, 512-515.
- [164] J. Piel, J. Donath, K. Bandemer, W. Boland, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1998**, *37*, 2478-2481.
- [165] A. Jux, W. Boland, *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 6913-6914.
- [166] G. Molck, H. Pinn, U. Wyss, *European J. Entomology* **2000**, *97*, 533-538.
- [167] B. L. Bentley, *Ann. Rev. Ecology and Systematics* **1977**, *8*, 407-427.
- [168] A. M. Barton, *Ecology* **1986**, *67*, 495-504.
- [169] D. J. Odowd, *Oecologia* **1979**, *43*, 233-248.
- [170] C. H. Pickett, W. D. Clark, *American J. Botany* **1979**, *66*, 618-625.
- [171] A. G. Stephenson, *Ecology* **1982**, *63*, 663-669.
- [172] S. Koptur, *Ecology* **1984**, *65*, 1787-1793.
- [173] P. S. Oliveira, A. F. Dasilva, A. B. Martins, *Oecologia* **1987**, *74*, 228-230.
- [174] L. L. Smith, J. Lanza, G. C. Smith, *Ecology* **1990**, *71*, 107-115.
- [175] F. L. Wäckers, R. Wunderlin, *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **1999**, *91*, 149-154.
- [176] B. Fiala, H. Grunsky, U. Maschwitz, K. E. Linsenmair, *Oecologia* **1994**, *97*, 186-192.
- [177] M. Heil, B. Fiala, B. Baumann, K. E. Linsenmair, *Funct. Ecology* **2000**, *14*, 749-757.
- [178] I. T. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1998**, *95*, 8113-8118.
- [179] A. A. Agrawal, M. T. Rutter, *Oikos* **1998**, *83*, 227-236.
- [180] A. A. Agrawal, *Science* **1998**, *279*, 1201-1202.
- [181] V. Jung, Diplomarbeit, Universität Jena, **1999**.
- [182] K. Grob, F. Zurcher, *J. Chromatography* **1976**, *117*, 285-294.