

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Fakultät für Biowissenschaften

Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie

Abteilung Biochemie

Arbeitsgruppe Pflanze-Blattlaus-Interaktionen



**Induzierbarkeit der chemischen Verteidigung von Färberginster
(*Genista tinctoria*) durch Blattlausbefall**

Bachelorarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Bachelor of Science im Studiengang

Biochemie / Molekularbiologie

(B. Sc.)

vorgelegt von

Elena Büttner

aus Aschaffenburg

Jena, im Juni 2023

Gutachter:

1. Dr. Grit Kunert
2. Dr. Alexandra Furch

Betreuer:

Dr. Felix Feistel

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung	1
1.1. Warum müssen Pflanzen sich verteidigen?	1
1.1.1. Mechanische und chemische Verteidigungsstrategien	1
1.1.2. Direkte und indirekte Verteidigungsstrategien	2
1.1.3. Konstitutive und induzierte Verteidigungsstrategien	2
1.2. Wogegen müssen sich Pflanzen verteidigen?.....	4
1.2.1. Antagonisten von Pflanzen	4
1.2.2. Blattläuse als Vertreter der Herbivoren.....	6
1.3. Chinolizidin Alkaloide als konkretes Beispiel der Pflanzenverteidigung.....	7
2. Material und Methoden.....	11
2.1. Chemikalien.....	11
2.2. Pflanzenmaterial	11
2.3. Blattläuse	12
2.4. Experiment (Blattlausbefall und Probenahme)	12
2.5. Probenvorbereitung.....	13
2.6. Instrumente und Messung.....	14
2.7. Statistik.....	15
2.7.1. Ändert sich der QA-Gehalt in Abhängigkeit vom Treatment?	15
2.7.2. Ändert sich der QA-Gehalt bei Blattlausbefall über die Zeit?.....	16
3. Ergebnisse	17
3.1. Ändert sich der QA-Gehalt in Abhängigkeit vom Treatment?	17
3.2. Ändert sich der QA-Gehalt bei Blattlausbefall über die Zeit?.....	20
4. Diskussion	23
4.1. Ändert sich der QA-Gehalt in Abhängigkeit vom Treatment?	23
4.1.1. Die meisten QAs zeigen keine Induktion	23
4.1.2. Es gibt eine Induktion in der Produktion von Epi-Baptifolin.....	24
4.2. Ändert sich der QA-Gehalt bei Blattlausbefall über die Zeit?.....	26
4.2.1. Keine weitere Induktion der QAs bei einem längeren Zeitraum	26
4.2.2. Abfall der Konzentration einiger QAs über die Zeit	27
4.3. Zusammenfassung und Ausblick.....	28
5. Literaturverzeichnis	30
6. Anhang	33
Selbstständigkeitserklärung	36
Danksagung.....	37

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. pisum</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>
AIC.....	Akaike Informationskriterium
CuAO.....	kupferhaltige Aminoxidase
d. h.	das heißt
FACs.....	aus Fettsäuren gewonnene Chemikalien
<i>G. tinctoria</i>	<i>Genista tinctoria</i>
h	Stunde
LDC.....	Lys Decarboxylase
lme-Modell.....	mixed effect model
nAChR.....	nikotinerger Acetylcholinrezeptor
QAs.....	Chinolizidin-Alkaloide
v. a.....	vor allem
<i>V. faba</i>	<i>Vicia faba</i>
z. B.....	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Warum müssen Pflanzen sich verteidigen?

Pflanzen sind einer Vielzahl von Gefahren ausgesetzt. Da die Pflanzen sessil sind und keine motorischen Fähigkeiten haben, um sich aktiv von einem Ort zum anderen zu bewegen, schränkt sie dies vor allem (v. a.) in ihrer Verteidigung gegen die Umwelt ein (Lüttge, 2017).

Daher haben Pflanzen im Laufe der Evolution andere Verteidigungsmechanismen entwickelt, um sich gegen ihre Angreifer zu wehren. Diese Verteidigungsmechanismen dienen dazu, die Fitness der Pflanzen, das heißt (d. h.) ihre Fähigkeit sich erfolgreich fortzupflanzen und ihre Gene weiterzugeben, zu erhöhen (Begon et al., 2006). Somit soll das Überleben der Pflanzen abgesichert werden. Da Fraß, Krankheitserreger und auch Konkurrenten diese Fitness verringern können, müssen sich die Pflanzen schützen. Die bekannten Verteidigungsstrategien der Pflanzen können entweder nach der Art (mechanisch und chemisch), nach der Wirkung (direkt und indirekt) oder nach der Aktivierung der Verteidigung (konstitutiv und induziert) unterschieden werden.

1.1.1. Mechanische und chemische Verteidigungsstrategien

Eine Unterscheidungsmöglichkeit der pflanzlichen Verteidigungsstrategien ist die in mechanische und chemische Verteidigung. Während die mechanische Verteidigung auf physischen Merkmalen wie Dornen, Stacheln, Härchen (Trichome) oder harten Oberflächen beruht, um den Zugang der Angreifer durch physische Barrieren oder schmerzhaft Reize zu erschweren, umfasst die chemische Verteidigung die Produktion von toxischen oder abschreckenden Substanzen (Nentwig, 2017). Für die chemische Verteidigung sind v. a. spezialisierte Metabolite (in der Fachliteratur auch bekannt als Sekundärmetabolite) von Bedeutung (Nentwig, 2017). Hierzu gehört eine Vielzahl von Stoffen, welche nicht dem Primärmetabolismus zugeordnet werden können. Der Definition nach, sichern spezialisierte Metabolite im Gegensatz zu Primärmetaboliten auch das langfristige Überleben durch das Schaffen von Selektionsvorteilen (Ku et al., 2020). Diese spezialisierten Metabolite können potenzielle Angreifer davon abhalten, Pflanzen zu fressen oder sie können für die Angreifer schädlich oder ungenießbar sein, wenn sie konsumiert werden. Beispiele für chemische Verteidigungssubstanzen sind unter anderem Alkaloide, Terpene, Phenole sowie cyanogene oder Senfölglykoside, die jeweils in verschiedenen

Pflanzenarten vorkommen und eine breite Palette von Wirkungen auf Fressfeinde haben können (Nuhn, 2006).

1.1.2. Direkte und indirekte Verteidigungsstrategien

Des Weiteren lassen sich Verteidigungsmechanismen aufgrund ihrer direkten und indirekten Wirkung unterteilen.

Direkte Verteidigungsmechanismen sind solche, bei denen die Pflanze physische oder chemische Abwehrreaktionen unmittelbar gegen den Angreifer einsetzt. Dabei kann unter anderem das Überleben, das Wachstum oder die Reproduktion des Angreifers beeinträchtigt werden. Dies kann die Produktion von Toxinen (chemische Abwehr) oder die Bildung von Strukturen wie Dornen oder Stacheln (physische Abwehr) beinhalten (Nentwig, 2017). Ein bekanntes Beispiel für direkte Verteidigung sind die giftigen (Tropan-) Alkaloide in den Blättern der Tollkirsche *Atropa belladonna*, die Fressfeinde abschrecken oder töten. Das darin enthaltene Hauptalkaloid L-Hyoscyamin sowie dessen Racemat (D- und L-Hyoscyamin), welches auch als Atropin bekannt ist, wirken als Parasympathikolytika, da sie die Wirkung von Acetylcholin hemmen (Habermehl, 2002).

Im Gegensatz dazu beruht die indirekte Verteidigung auf der Nutzung von Interaktionen mit anderen Organismen, um die Angreifer abzuwehren. Eine häufige Form der indirekten Verteidigung ist die Freisetzung von Synomonen (Allelochemikalien, die sowohl vorteilhaft für den Emitter als auch den Empfänger sind), welche dann Nützlinge anlocken, die anschließend die Angreifer der Pflanze fressen oder parasitieren können (Cipollini et al., 2003; Kessler & Baldwin, 2002).

1.1.3. Konstitutive und induzierte Verteidigungsstrategien

Alle bisher genannten Verteidigungsmechanismen benötigen Ressourcen, wobei Pflanzen aufgrund ihrer Standortgebundenheit im Vergleich zu Tieren deutlich effizienter mit lokal begrenzten Ressourcen, zum Beispiel (z. B.) Stickstoff umgehen müssen. Pflanzen aus der Familie der Hülsenfrüchtler (Leguminosen; *Fabacea*) haben die Möglichkeit durch symbiotische Knöllchenbakterien (*Rhizobiaceen*) molekularen Stickstoff zu fixieren (Weiler, 2008). Dadurch ist die Produktion von stickstoffhaltigen spezialisierten Metaboliten wie z. B. Alkaloiden, die zur Abwehr von Antagonisten eingesetzt werden, ressourcentechnisch weniger limitiert. Jedoch werden Stickstoff sowie weitere möglicherweise limitierte Mikronährstoffe (z. B. Phosphor) und Wasser auch für den Wachstumsprozess gebraucht (Agren et al., 2012). Das kann dazu führen, dass Nährstoffe, welche für das Wachstum eingesetzt wurden, für die Verteidigung fehlen oder andersherum.

Außerdem teilen sich Primärmetabolismus und spezieller Metabolismus neben den begrenzten Ausgangsstoffen gemeinsame Vorläufermoleküle. Dies erhöht die Konkurrenz der verschiedenen Stoffwechselforgänge, da die Produktion der Vorläufermoleküle z. B. durch Enzymaktivitäten begrenzt sein kann. Es wurde herausgefunden, dass z. B. mindestens 5 g CO₂ nötig sind um 1 g Alkaloid zu biosynthetisieren (Herms & Mattson, 1992). Da Alkaloide außerdem Aminosäuren als Vorläufer haben, konkurriert dieser Verbrauch an Aminosäuren direkt mit der Proteinbiosynthese aus dem Primärmetabolismus (Habermehl, 2002). So muss ein gutes Abwägen zwischen Primärmetabolismus und speziellem Metabolismus gefunden werden, da beide für das Überleben einer Pflanze nötig sind. Dabei kommt es zu einem Kompromiss zwischen Verteidigung und Wachstum. Die Pflanze muss physiologische Anpassungen vornehmen, um in der Gegenwart von Antagonisten zu überleben und dennoch schnell genug wachsen, um konkurrieren zu können (Herms & Mattson, 1992).

Konstitutive Verteidigungsmechanismen verbrauchen kontinuierlich Ressourcen der Pflanze, da sie auch bei Abwesenheit von Antagonisten aktiv sind. Dafür können Pflanzen mithilfe der konstitutiven Verteidigung aber auch augenblicklich Antagonisten bekämpfen (Nentwig, 2017). Dazu zählt z. B. die bereits genannte Ausbildung von Stacheln oder Dornen während des ständig anhaltenden Wachstumsprozesses der Pflanze.

Eine Möglichkeit, um Ressourcen zu sparen ist, die Verteidigung nur zu aktivieren, wenn sie wirklich benötigt wird. Registriert die Pflanze einen Antagonisten, setzt sie spezifische Abwehrmechanismen in Gang. Das kann sich sowohl auf die Produktion von giftigen Chemikalien oder physischen Barrieren (direkte Verteidigung), als auch auf die Freisetzung von Lockstoffen für natürliche Feinde der Angreifer (indirekte Verteidigung) auswirken (Herms & Mattson, 1992). Dabei lohnt sich die induzierte Verteidigung v. a. für schnell wachsende Pflanzen oder Gewebe, welche somit zeitnah auf Angriffe reagieren können (Herms & Mattson, 1992).

Jedoch darf bei einem Vergleich der Kosten von konstitutiven und induzierten Verteidigungsmechanismen nicht vergessen werden, dass auch die Induzierbarkeit der Verteidigung der Pflanze Kosten verursacht. Schließlich braucht die Pflanze Mechanismen, um Verwundungen und Angriffe zu erkennen, um auf diese reagieren zu können (z. B. Wunderkennungswege, Vorläufermoleküle für Abwehrstoffe, Vesikel zum Speichern der Stoffe) (Cipollini et al., 2003; Heil & Baldwin, 2002). Sowohl die konstitutive als auch die induzierte

Verteidigung haben also Vor- und Nachteile und Beide haben sich im Laufe der Evolution etabliert.

Welche Art und welcher Mechanismus der Verteidigung in konkreten Situationen in Bezug auf die Fitness der Pflanze vorteilhaft wären, könnte z. B. davon abhängen, wie oft die Pflanze angegriffen wird, wie effizient der jeweilige Verteidigungsmechanismus gegen den Angreifer ist beziehungsweise welcher Antagonist angreift.

1.2. Wogegen müssen sich Pflanzen verteidigen?

1.2.1. Antagonisten von Pflanzen

Die Vielfalt der Verteidigungsmechanismen von Pflanzen korreliert mit der Vielfalt der Angreifer, denen sie ausgesetzt sind (Richards et al., 2015). Dabei stellt jeder dieser Angreifer eine gesonderte Herausforderung dar, auf die die Pflanzen mit entsprechenden Verteidigungsstrategien reagieren müssen.

Die Antagonisten einer Pflanze lassen sich dabei grob in die drei Kategorien Konkurrenten, Pathogene und Fressfeinde (Herbivore) einteilen. Unter Konkurrenten versteht man dabei andere Pflanzen, die um die gleichen limitierten Ressourcen (z. B. Nahrung oder Raum) konkurrieren (Schaefer, 2012). Dadurch kann das Wachstum der Pflanzen begrenzt werden. Zur Kategorie der Pathogene werden Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilze gezählt, die in einem Wirt eine Krankheit verursachen können (Schaefer, 2012). Dadurch führen diese zu Schäden der Pflanze und können ein Absterben von Pflanzenteilen oder der ganzen Pflanze zu Folge haben.

Die dritte Kategorie der Antagonisten, die Herbivoren, lässt sich weiter in Generalisten und Spezialisten aufteilen (Schaefer, 2012). Diese Unterscheidung beruht auf den Fresspräferenzen und den Anpassungen der Herbivoren, sowie deren Reaktion auf die Verteidigungsmechanismen der Pflanzen. Generalisten können je nach Verfügbarkeit und Umweltbedingungen auf ein breites Spektrum an Pflanzen als Nahrungsquelle zurückgreifen (Schaefer, 2012). Spezialisten haben sich im Gegensatz dazu an bestimmte Pflanzenarten (Wirtspflanzen) mit bestimmten Bedingungen angepasst, wobei zwischen den beiden Begriffen ein fließender Übergang besteht (Nentwig, 2017; Schaefer, 2012), siehe Abbildung 1). Es wird postuliert, dass Spezialisten pflanzliche Verteidigung (z. B. direkte Verteidigung über Alkaloide oder indirekte Verteidigung über das Anlocken von Nützlingen) besser tolerieren oder umgehen sowie Pflanzen zu ihren Gunsten manipulieren können (Ali & Agrawal, 2012). Dadurch sind Spezialisten im

Durchschnitt weniger negativ von der Verteidigung der Pflanze betroffen als es bei Generalisten der Fall ist (Ali & Agrawal, 2012). Um dies zu erreichen, nutzt der Spezialist Wege um die Abwehrstoffe der Wirtspflanze zu detoxifizieren (z. B. durch Cytochrom-P-450-mischfunktionelle-Oxidase-Enzyme) oder die Abwehrstoffe im Körper einzulagern (sequestrieren), um sich anschließend selbst damit zu verteidigen (siehe Abbildung 1, (Ali & Agrawal, 2012; Nentwig, 2017).

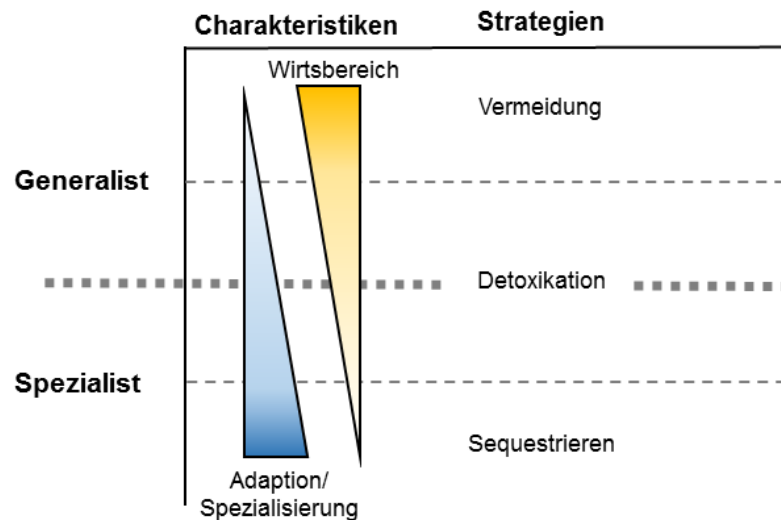


Abbildung 1: Gegenüberstellung der Generalisten und Spezialisten; adaptiert von Dr. Felix Feistel.

Um die Fitness der Pflanze zu maximieren, wäre es für diese vorteilhaft, Generalisten und (sequestrierende oder nicht-sequestrierende) Spezialisten unterscheiden zu können, um zielgenau auf diese zu reagieren. So könnte die Pflanze den Verteidigungsmechanismus, gegen den der Spezialist resistent ist, einstellen, um ressourceneffizient zu handeln. Sequestriert der Spezialist die Verteidigungsstoffe der Pflanze (z. B. Alkaloide), verschafft die Pflanze dem Spezialisten bis zu einem gewissen Konzentrationslevel der Alkaloide sogar einen Selektionsvorteil (Ali & Agrawal, 2012). Es wurde z. B. beschrieben, dass fleischfressende Käfer, welche Blattläuse, die auf alkaloidhaltigen Pflanzen gefressen hatten, konsumiert haben, für über 48 Stunden (h) betäubt waren (Wink, 1987).

Die Unterscheidung zwischen Generalisten und Spezialisten ist also ein Ansatz, um die Abwehrreaktionen der Pflanze einsortieren und analysieren zu können. Des Weiteren ist auch die Unterscheidung der Fraßgilden der Herbivoren wichtig, da diese den Pflanzen in anderem Umfang und auf verschiedene Art und Weisen schaden. Zur Gruppe der Herbivoren zählen sowohl Wirbeltiere wie Hasen und Rehe, v. a. aber auch Insekten (wirbellose Tiere). Insekten ernähren sich dabei entweder beißend-kauend und fressen das gesamte Pflanzenmaterial wie z. B. Schmetterlingsraupen, oder sie ernähren sich stechend-saugend (Hemiptera) vom

Pflanzensaft. Zu den Hemiptera gehören beispielsweise die Wanzen und Zikaden, aber auch die Pflanzenläuse, welche sich in Blattflöhe, Mottenschildläuse, Schildläuse und Blattläuse unterteilen (Clauss, 2021).

1.2.2. Blattläuse als Vertreter der Herbivoren

Blattläuse (*Aphidina*) gehören zu den bekanntesten Vertretern der Herbivoren und einige davon, wie z. B. die grüne Pfirsichblattlaus *Myzus persicae* oder die russische Weizenblattlaus *Diuraphis noxia* spielen eine große Rolle als Pflanzenschädlinge (Richards et al., 2010). Sie ernähren sich vom Pflanzensaft (Phloem) und haben damit eine direkte Auswirkung auf die Pflanzen, indem sie diese schwächen. Des Weiteren können Blattläuse die Pflanzen auch indirekt durch Virustransmission schaden (Furch et al., 2015).

Die Nahrungsaufnahme erfolgt bei Blattläusen durch Verwendung ihres Rüssels (Stilett). Durch eine stechende Bewegung und mit der Abgabe von gelartigem Speichel stecken die Blattläuse ihr Stilett in das Blatt und navigieren entlang der Zellzwischenräume (Apoplast). Auf dem Weg beproben sie immer wieder Zellen und injizieren wässrigen Speichel in die Zellen, bis sie schließlich das Phloem erreichen. Der Phloemsaft enthält wichtige Nährstoffe (Zucker, Proteine, sowie einzelne Aminosäuren), von denen sich die Blattläuse ernähren (Will et al., 2013). Da der Phloemsaft aber nicht alle für die Blattlaus überlebenswichtigen Stoffe enthält, geht die Blattlaus mit Mikroorganismen Symbiosen ein. In fast allen Blattlausarten ist dabei *Buchnera aphidicola* ein obligater Symbiont, der für die Blattlaus den Mangel an Aminosäuren und anderen Stoffen kompensieren kann (Douglas, 2003). Außerdem gibt es weitere fakultative Symbionten, z. B. *Regiella insecticola*, *Hamitonella defensa* und *Serratia symbiotica*, welche in vielen Individuen der Erbsenblattlaus *Acyrtosiphon pisum* Harris (*A. pisum*) vorkommen (Guo et al., 2017). Fakultative Symbionten können die Fitness der Blattlaus weiter steigern, z. B. durch eine Erhöhung der Lebensspanne, oder den Schutz vor Parasitoiden. Auch ein Einfluss auf die Wahl der Futterpflanze sowie die Flügelbildung bei Blattläusen wird diskutiert (McLean et al., 2011).

Eine Besonderheit der Blattläuse ist die extreme phänotypische Plastizität, mit der sie sich an unterschiedliche Bedingungen anpassen können. Ausgehend von einem Genotyp, können sie sich zu asexuellen lebend-gebärenden Weibchen, sowie sexuellen Männchen und sexuellen eierlegenden Weibchen entwickeln. Zusätzlich gibt es ungeflügelte und geflügelte Formen. Die ungeflügelten Formen sind bei allen Entwicklungsstufen vorhanden, während die geflügelten Formen bei

allen außer den sexuellen eierlegenden Weibchen auftreten können. In einigen Blattlauspopulationen, z. B. in Gegenden mit milden Wintern und durchgehend ausreichend guten Umweltbedingungen reproduzieren sich die Blattläuse ausschließlich durch Parthenogenese, sodass der sexuelle Teil des Lebenszyklus nicht zum Vorschein kommt. (Richards et al., 2010).

Auch unter Laborbedingungen kann der sexuelle Teil des Lebenszyklus der Blattläuse unterdrückt werden. Dies ist z. B. oft bei der Erbsenblattlaus *A. pisum* der Fall. Diese ist eine eher große Blattlaus, welche pink oder grün sein kann (Emden & Harrington, 2007). Sie ein Modellorganismus für Blattläuse und andere stechend-saugende Insekten. *A. pisum* ist die erste Blattlaus, dessen Genom vollständig sequenziert wurde. Der Artenkomplex von *A. pisum* setzt sich dabei aus vielen dazugehörigen Biotypen zusammen. Auch wenn die einzelnen Biotypen auf bestimmte Leguminosen spezialisiert sind und diese bevorzugen, können alle bis dato erfassten Erbsenblattlausbiotypen auf der Ackerbohne *Vicia faba* (*V. faba*) überleben. Diese wird in der Literatur daher als universelle Wirtspflanze von *A. pisum* angesehen (Schwarzkopf et al., 2013). *A. pisum* wird zusammen mit den heimischen Wirtspflanzen und der universellen Wirtspflanze besonders für Studien zur Symbiose, Entwicklung und Wirtspflanzenspezialisierung verwendet (Richards et al., 2010). Bei Letzterem wird beispielsweise der Einfluss der von der Pflanze hergestellten spezialisierten Metabolite, wie Alkaloiden, auf die Antagonisten untersucht.

1.3. Chinolizidin Alkaloide als konkretes Beispiel der Pflanzenverteidigung

Wie bereits erwähnt sind die spezialisierten Metabolite ein sehr diverses und großes Feld. Alkaloide bilden darunter eine der größten Stoffgruppen überhaupt. Diese sind schätzungsweise in 20 % aller Pflanzen zu finden, wobei mittlerweile rund 12 000 Alkaloide aus Pflanzen identifiziert wurden (Ziegler & Facchini, 2008). Der Begriff Alkaloide wurde 1819 von Meissner definiert und bezog sich damals nur auf basisch reagierende Pflanzenstoffe, die für den Mensch bitter schmecken und eine physiologische Aktivität beim Menschen hervorrufen (Lee et al., 2007; Nuhn, 2006). Nach der modernen Definition von Pelletier ist „ein Alkaloid [...] eine cyclische organische Verbindung, die Stickstoff in negativer Oxidationsstufe enthält und unter Organismen nur begrenzt verbreitet ist“ (Nuhn, 2006). Dabei bezieht sich die Herstellung von Alkaloiden hauptsächlich auf höhere Pflanzen (z. B. Morphin aus dem Schlafmohn) und Tiere (z. B. Tetrodotoxin aus dem japanischen Kugelfisch) (Nuhn, 2006). Eine der Untergruppen von Alkaloiden ist die der sogenannten Chinolizidin-Alkaloide (QAs von engl. quinolizidine alkaloids),

welche aus der Aminosäure Lysin biosynthetisiert werden (siehe Abbildung 2). L-Lysin decarboxyliert mithilfe des Enzyms Lys Decarboxylase (LDC, EC 4.1.1.18) zu dem biogenen Amin Cadaverin, welches anschließend mithilfe der kupferhaltigen Aminoxidase (CuAO, EC 1.4.3.22) oxidativ deaminiert. Das entstehende 5-Aminopentanal cyclisiert in einer spontanen Reaktion zu Δ^1 -Piperidein. Dieses Intermediat kann nun durch viele verschiedene Reaktionen modifiziert werden, um mehrere hunderte verschiedene QAs zu erhalten (Bunsupa et al., 2012). Je nach der weiteren Modifizierung, teilen sich die QAs strukturell weiter in tri- und tetrazyklische QAs auf. Jedoch ist in allen QAs das Chinolizidin Grundgerüst zu finden (siehe Abbildung 2). Strukturell besteht dieses aus einem bicyclischem Ringsystem. Dieses ist aus zwei 6-Ringen aufgebaut, die sich ein gemeinsames Stickstoffatom teilen. In dieser Arbeit wird im speziellen auf die in Abbildung 2 dargestellten tri- und tetrazyklischen QAs eingegangen.

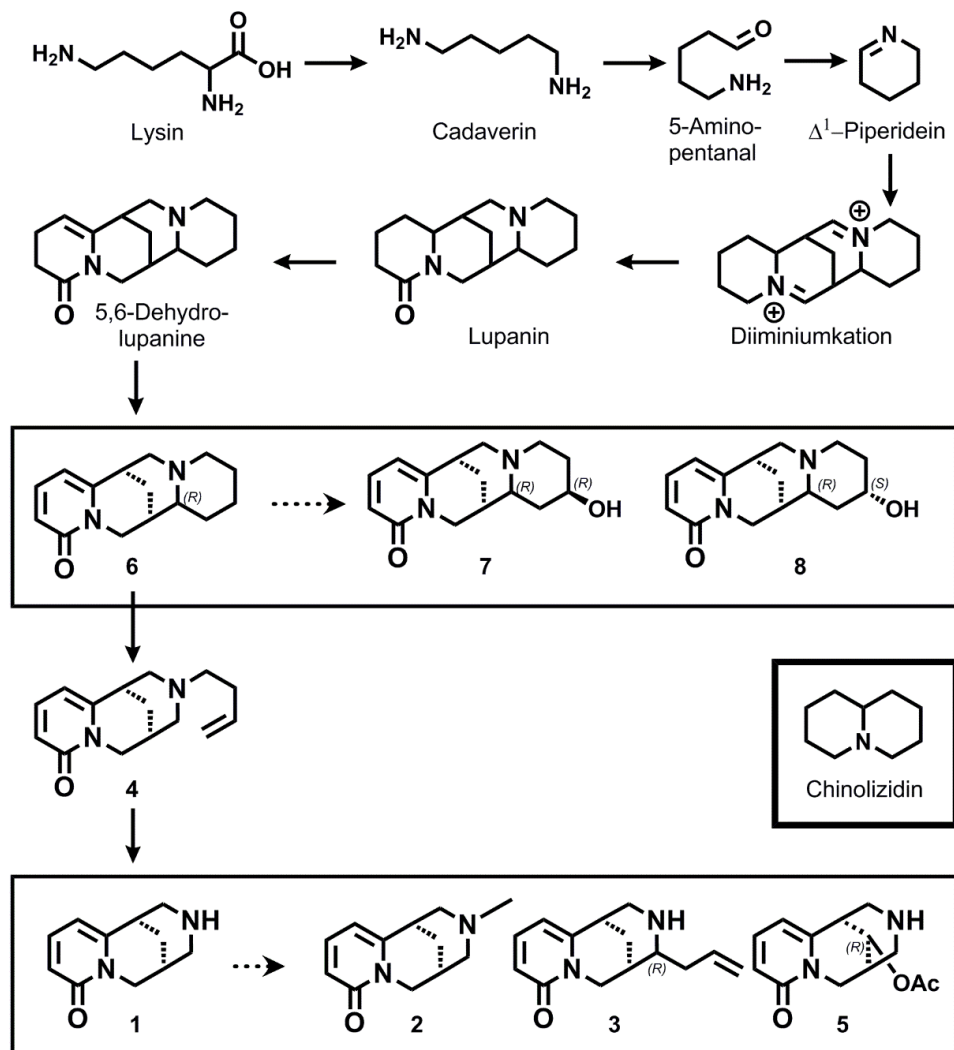


Abbildung 2: Chinolizidin-Grundgerüst und postulierter Biosyntheseweg der acht untersuchten QAs (Frick et al., 2017) (Wink, 1987). Dargestellt sind die trizyklischen QAs Cytisin (1), N-Methylcytisin (2), 11-Allylcytisin (3), Rhombifolin (4) und 12-O-Acetylcytisin (5) sowie die tetrazyklischen QAs Anagyrin (6), Baptifolin (7) und Epi-Baptifolin (8).

Für die meisten Organismen sind QAs im Allgemeinen toxisch oder abschreckend. Die biologische Aktivität der einzelnen QAs ist noch nicht genauestens erforscht, allerdings gibt es eine breite Variabilität. Während Cytisin und N-Methylcytisin halluzinogen wirken können, hat Anagyrin v. a. teratogene Eigenschaften (Wink, 1987). In einer Studie wurden die QAs Matrin, Sophoridin, Sophocarpin und Aloperin sowie auch das in dieser Arbeit verwendete Cytisin untersucht (Tri- und Tetracyclische QAs). Für alle konnte dabei eine Inhibition des nikotineren Acetylcholinrezeptors (nAChR) nachgewiesen werden, was die toxischen Effekte der QAs erklären könnte (Liu et al., 2008). Die Beeinflussung von Acetylcholin Rezeptoren ist ein bekannter Wirkmechanismen von Alkaloiden wie Nikotin oder Tubocurarin (Inhaltstoff von Curare; Pfeilgift), welcher daher auch als Vorbild für das Erstellen von chemisch designten Pestiziden wie Neonicotinoiden diente (Habermehl, 2002; Yamamoto, 1999).

Cytisin wies in den Untersuchungen zwar einen deutlich höheren Einfluss auf nAChR von Säugetieren auf, aber auch an der Schabe (*Periplaneta americana*) wurde eine Inhibition des nAChR nachgewiesen (Liu et al., 2008). Eine Übertragbarkeit wird auch auf die Blattläuse vermutet, wobei eine Veränderung am nAChR der Blattläuse dabei die Resistenz der angepassten Biotypen erklären würde.

Der Großteil der QA-Forschung fand bisher an Pflanzen der Gattung der Lupinen (*Lupinus*) statt, da diese landwirtschaftlich relevant sind. Des Weiteren sind QAs v. a. in *Cytisus* und *Genista* vorhanden, wobei alle drei Gattungen zu den Leguminosen gehören (Nuhn, 2006).

Der Färber-Ginster *Genista tinctoria* (*G. tinctoria*) enthält alle in Abbildung 2 dargestellten tri- und tetrazyklischen QAs (1-8). Über diese Pflanze ist im Allgemeinen noch wenig bekannt, aber jüngst wurde ein neuer Blattlausbiotyp entdeckt, welcher auf *G. tinctoria* überleben kann (Peccoud et al., 2015). Gemeinsam mit *G. tinctoria* wird der Biotyp in dieser Arbeit verwendet, um die Reaktion der Pflanze auf angepasste und nichtangepasste Blattläuse zu vergleichen.

Während der Einfluss von abiotischen Faktoren (z. B. Temperatur, pH-Wert und Nährstoffgehalt der Erde) auf die QA-Biosynthese schon untersucht wurde, ist nach wie vor unklar, ob der Befall der Pflanzen mit Herbivoren zu einer verstärkten Bildung von QAs führt (Frick et al., 2019). Studien, die zu biotischem Stress in Lupinen durchgeführt wurden, haben bisher noch kein klares Bild ergeben (Frick et al., 2019).

Daher soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob der Befall von Blattläusen zu einer Induktion von Chinolizidin Alkaloiden in *G. tinctoria* führen kann. Dafür soll der Unterschied in den QA-Konzentrationen von *G. tinctoria* auf den angepassten und den unangepassten Biotyp im Vergleich zu einer Kontrollpflanzengruppe 24 h nach dem Blattlausbefall quantitativ analysiert werden.

Zudem ist von Interesse, wie sich die Konzentrationen der QAs über die Zeit verhalten. Hierfür soll die Reaktion von *G. tinctoria* auf den angepassten Biotyp und im Vergleich zu einer Kontrollpflanzengruppe 72 h nach dem Blattlausbefall ermittelt werden. Anschließend sollen die Ergebnisse, die für den 24-stündigen Blattlausbefall für den angepassten Biotyp und die Kontrolle gesammelt wurden mit den Ergebnissen aus dem 72 h Blattlausbefall quantitativ verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Acetonitril ($\geq 99,9\%$ LC-MS CHROMASOLV™) wurde bei Honeywell (Seelze, Deutschland), Ammoniumacetat (LiChropur™, „eluent additive for LC-MS“) wurde bei Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) erworben. Der verwendete Koffeinstandard (99,7%) wurde bei AlfaAesar (Kandel, Deutschland), Methanol ($\geq 99,8\%$ HiPerSolv CHROMANORM®, MeOH) wurde bei VWR International (Darmstadt, Deutschland) eingekauft. Jegliches in dieser Arbeit verwendetes Wasser war MilliQ-Wasser und kam aus dem Milli-Q® Advantage A10 Wasseraufbereitungssystem (Merck, Darmstadt, Deutschland). Des Weiteren wurde verwendet: Desinfektionsmittel (Pursept®-A Xpress) von Merz (Frankfurt am Main, Deutschland) und flüssiger Stickstoff von Nippon Sanso Holdings Corporation (Shinagawa-ku Tokyo, Japan).

Alle genannten Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

2.2. Pflanzenmaterial

Die Kultivierung aller verwendeten Pflanzen erfolgte in YORK®-Klimakammern von Johnson Controls (Milwaukee, USA) mit automatisierter Licht-, Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsregelung. Darin wurden die Pflanzen 16 h (6 - 22 Uhr; Lichtphase) pro Tag mit Licht versorgt. Die Temperatur wurde während dieser Lichtphase konstant auf 18 °C (± 2 °C) mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 % (± 10 %) gehalten.

Die Anzucht der Blattläuse erfolgte auf 2 Wochen alten Pflanzen der Ackerbohne *Vicia faba* (*V. faba*), welche in 10 cm Rundtöpfen kultiviert wurden. Zusätzlich wurden die *V. faba* mit der Futterpflanzenmischung Klasmann Tonsubstrat and Klasmann Kultursubstrat TS1 (Verhältnis 7:20; Klasmann–Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland) versorgt.

Die Induktionsexperimente wurden mit sechs verschiedenen klonalen Linien des Färber-Ginsters *Genista tinctoria* (*G. tinctoria*) durchgeführt, welche durch Stecklinge von 6 Mutterpflanzen entstanden. Auch diese Pflanzen wurden in 10 cm Rundtöpfe kultiviert und wurden außerdem mit der Futterpflanzenmischung von Klasmann im Verhältnis 10:3,5 versorgt. Zum Zeitpunkt des Versuches hatten die Pflanzen ein Alter von einem Jahr. Um Vergleichbarkeit bezüglich Form und Wuchshöhe zu schaffen, wurden die Pflanzen 2,5 Wochen vor der Besiedlung mit Blattläusen auf drei bis fünf Äste mit einer maximalen Länge von 30 cm

beschnitten. Beim Zurückschneiden wurden alle Blüten sowie deren Ansätze entfernt. Fünf Tage vor dem Experiment wurden die Pflanzen mit luftdurchlässigen Zellophan Tüten (Griesinger Verpackungs GmbH, Neuenbürg - Arnbach, Deutschland) eingepackt.

2.3. Blattläuse

Die Induktionsexperimente wurden mit zwei verschiedenen Biotypen der Erbsenblattlaus (*Acyrtosiphon pisum* Harris) durchgeführt. Hierbei diente GT2_26 als ein nativer Klon für *G. tinctoria* und ID_210 (ein Klon des *Trifolium*-Biotyps) als ein nicht nativer Klon.

Um eine ausreichende Menge an Versuchstieren (≈ 2000 Tiere) für das Experiment sicherzustellen, fand die Anzucht in insgesamt 3 Phasen mit je 2 Wochen Länge (insgesamt 6 Wochen) statt. Damit für das Experiment ein vergleichbares Alter der Tiere gewährleistet werden konnte, wurden die für die Zucht verwendeten ungeflügelten weiblichen adulten Blattläuse jeweils nach 2 Tagen von den Anzuchtpflanzen (*V. faba*) entfernt, sodass nur die bereits reproduzierten Nachkommen auf den Pflanzen verblieben. Zum Schutz der Blattläuse erfolgte das Umsetzen dabei immer mit Federstahlpinzetten (bioform, Nürnberg, Deutschland)

2.4. Experiment (Blattlausbefall und Probenahme)

Insgesamt gab es 2 verschiedene Zeitpunkte der Probenahmen (A \triangleq 24 h und B \triangleq 72 h nach Blattlausbefall), sowie 3 unterschiedliche Treatments (ctrl – Kontrollpflanzen ohne Blattlausbefall; GT2-26 – Pflanzen mit Befall des nativen Blattlausklones; ID_210 – Pflanzen mit Befall des Blattlausklones der *Trifolium*-Wirtsrasse).

Am Zeitpunkt A erfolgte die Ernte von dem Pflanzenmaterial aller 3 Treatments (ctrl-A; GT2_26-A; ID_210-A), am Zeitpunkt B nur noch von ctrl-B und Gt2_26-B. Zeitpunkt A diente dabei dem Vergleich in der Alkaloidinduktion zwischen Kontrolle, nativem und nicht nativem Klon. Dahingegen beschäftigt sich Zeitpunkt B mit der Fragestellung, ob die Induktion zeitliche Unterschiede aufweist. Da nicht-native Blattlausklone nur wenige Stunden auf Ginster überleben können, wurde bei Zeitpunkt B auch nur der native Klon zur Kontrolle verglichen.

Die Untersuchungen zu den 2 Zeitpunkten mit den 3 Treatments erfolgten auf insgesamt 90 Pflanzen (18 Pflanzen je Treatment x Zeitpunkt; davon je 3 Pflanzen pro Pflanzen-Klonlinie).

Table 1: Übersicht über die 2 verschiedenen Zeitpunkte der Probenahme mit den 3 unterschiedlichen Treatments.

Treatment x Zeitpunkt	Blattlaus Klon	Zeitpunkt der Ernte	<i>G. tinctoria</i> Klon	Replikate pro <i>G. tinctoria</i> Klon	Pflanzen	Blattläuse pro Pflanze	Blattlaus Anzahl
ctrl-A	-	A (24 h)	1 - 6	3	18	-	-
ctrl-B	-	B (72 h)	1 - 6	3	18	-	-
GT2_26-A	Gt2_26	A (24 h)	1 - 6	3	18	35	630
GT2_26-B	Gt2_26	B (72 h)	1 - 6	3	18	35	630
ID_210-A	ID210	A (24 h)	1 - 6	3	18	35	630

Am Tag der Probenahme (Ernte des Pflanzenmaterials) wurden die Pflanzen so wenig wie möglich bewegt, um mechanischen Stress zu vermeiden. Dadurch sollte einer Verfälschung der Versuchsergebnisse vorgebeugt werden.

Für das Experiment wurden die Pflanzen mit je 35 Blattläusen besiedelt. Die 36 Kontrollpflanzen (18 x ctrl-A und 18 x ctrl B) wurden nicht mit Blattläusen besetzt. Um eine zeitgleiche Blattlausbesiedlung zu gewährleisten, wurden die Tiere zuerst in Petrischalen gesammelt, wobei es ausschließlich zur Verwendung adulter Tiere kam. Diese wurden über die Morphologie der Cauda identifiziert. Schließlich wurden die Tiere randomisiert und gleichzeitig auf die entsprechenden Pflanzen gegeben.

Zur Probenahme an den Zeitpunkten A und B wurde der oberirdische Teil der Pflanze abgeschnitten und umgehend in einem Bad aus N₂(l) gefroren. Anschließend erfolgte eine Entfernung der restlichen Blattläuse im Stickstoffbad. Das Pflanzenmaterial wurde in 50 ml Falcon Röhrchen (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) je Probe gesammelt. Das Pflanzenmaterial wurden anschließend 48h gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 LSCplus von Christ, Osterode am Harz, Deutschland).

2.5. Probenvorbereitung

Das lyophilisierte Pflanzenmaterial wurde mithilfe von 3 mm großen Stahlkugeln (ca. 10 - 15 Stück) in einem Farbmischer (Skandex S-7 von Fluid Management Inc., Wheeling, USA) zu einem Pulver zerkleinert. Anschließend wurde von jeder Probe ein Aliquot von je 10 mg (\pm 0,5 mg) in 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf Safe-Lock Tubes, Hamburg, Deutschland) eingewogen (Mikrowaage XP26 von METTLER TOLEDO, Columbus, USA).

Für die Extraktion wurden die Aliquote mit einer Lösung von 1 ml 80%-igem MeOH (+ 400 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ Koffein als interner Standard) extrahiert und geschüttelt, mit Ultraschall (BANDELIN SONOREX RK 100 von BANDELIN, Berlin, Deutschland) behandelt (5 min) und zentrifugiert (5 min, 15000 rpm, bei Raumtemperatur). Jeweils 100 μl des Überstandes wurden zusammen mit 900 μl 80 %-igem MeOH in eine 96-well-plate pipettiert.

2.6. Instrumente und Messung

Alle Messungen wurden auf einem Triple Quad Massenspektrometer (MS) gekoppelt mit einem Hochdruck-Flüssigchromatographiesystem (HPLC) mit einer in der Arbeitsgruppe etablierten Methode durchgeführt. Die verwendete Methode von Dr. Feistel ist noch nicht publiziert, daher dürfen genauer Details in dieser Bachelorarbeit noch nicht bekannt gegeben werden. Die chromatographische Auftrennung der QAs erfolgte dabei mit einer Agilent 1260 HPLC der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, USA), wobei Acetonitril und Ammoniumacetatpuffer (1,125 mM; pH 8,35) als Eluenten verwendet wurden. Mithilfe des Puffers wurde eine basische Umgebung angestrebt, um die Ionisierung der Alkaloide zu begünstigen. Die Trennung selbst fand mithilfe einer Zorbax Eclipse XDB-C18 Säule (50 x 4.6 mm, 1.8 μm , Agilent) statt.

Die Detektion erfolgte auf einem API 6500+ MS (AB SCIEX LLC, Framingham, USA). Die Ionisierung der Analyten wurde mit einer Turbospray Ionen Quelle im positiven Ionisierungsmodus gemessen. Die Massenseparation erfolgte mit einem „scheduled multiple reaction monitoring“-Messprogramm. Die Steuerung des gesamten Messsystems, sowie die Auswertung der gemessenen Analytpeakflächen erfolgte über einen Computer mit der SCIEX Analyst[®] 1.6.3 Software. Die Berechnung der Analytkonzentration in den gemessenen Proben erfolgte über den internen Standard Koffein, sowie gegebener Responsefaktoren für jeden Analyten.

Anschließend wurden die Konzentrationen der QAs mit der Formel (1) über den internen Standard berechnet. Die bekannte Konzentration des internen Standards Koffein (c_{IS}) sind 400 ng/ml und die Fläche des Peaks vom Analyten sowie dem internen Standard ($Area_A$ und $Area_{IS}$) wurden vom Messgerät gemessen. Die jeweiligen Responsefaktoren (f_R) wurden zuvor in der Arbeitsgruppe bestimmt und waren gegeben. Des Weiteren wurde mit 1 ml Extraktionsvolumen (v_{ext}) unter Einbezug der Trockenmasse der Proben (m_{sample}) gerechnet. Bei Anwendung der Formel ergaben sich Tabelle 4 (Zeitpunkt A) und 5 (Zeitpunkt B) mit den Werten für Konzentrationen der acht QAs im Anhang.

$$c_A = Area_A * \frac{c_{IS}}{Area_{IS}} * f_R * \frac{V_{ext}}{m_{sample}} \quad (1)$$

$$Einheiten: c_A = 1 * \frac{1 * ng}{1 * ml} * 1 * \frac{ml}{mg} = \frac{ng}{mg}$$

2.7. Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit der R Software, Version 4.2.1 durchgeführt (R Core Team, 2021). Die Graphiken wurden ebenfalls mit der R Software mithilfe der ggplot2 Bibliothek erstellt (Wickham, 2016). Anschließend wurden die Graphiken mit der Adobe Illustrator Software, Version CS5 (Adobe Software Ireland Limited, Dublin, Irland), bearbeitet.

2.7.1. Ändert sich der QA-Gehalt in Abhängigkeit vom Treatment?

Unterschiede in den Alkaloidgehalten in Abhängigkeit vom Treatment wurden mit Hilfe von „mixed effects models“ (lme-Modell; lme der nlme Bibliothek) mit Treatment als festem Faktor und Pflanzenklon als zufälligem Achsenschnittpunkt untersucht (Pinheiro et al., 2023; Pinheiro & Bates, 2000). Um Varianzhomogenität und Normalität der Residuen zu erreichen, wurden die Alkaloidgehalte logarithmiert. Falls bestimmte Analyten in einzelnen Proben nicht vorhanden waren, wurde der Datensatz für diesen Analyten log+1 transformiert. Wenn durch die bisherige Datenbearbeitung eine Varianzgleichheit nicht erreicht wurde, wurden die Modelle um die Varianzstruktur varIdent ergänzt. Dies ermöglicht eine eigene Varianz für jedes Treatment. Eine Zusammenfassung der Datenbearbeitung ist in Tabelle 2 zu sehen.

Der Einfluss (p-Werte) des festen Faktors wurde ermittelt, indem ein Modell ohne diesen festen Faktor erstellt wurde, und dieses mit dem Modell, welches den festen Faktor enthielt, mit einem „likelihood ratio test“ verglichen wurde (Zuur et al., 2009). Zugehörige likelihood ratios (l.R.) und p-Werte können ebenfalls Tabelle 2 entnommen werden.

Unterschiede zwischen den Treatments wurden, wenn vorhanden, mit einer Faktorlevelreduktion bestimmt (Crawley, 2013).

2.7.2. Ändert sich der QA-Gehalt bei Blattlausbefall über die Zeit?

Um Unterschiede der Alkaloidgehalte in Abhängigkeit von Zeitpunkt und Treatment zu ermitteln, wurden die Alkaloidgehalte mit dem lme-Modell untersucht. Dabei waren Treatment, Zeitpunkt und die Interaktion von Treatment und Zeitpunkt als feste Faktoren und Pflanzenklon als zufälliger Achsenschnittpunkt enthalten.

Um Varianzhomogenität und Normalität der Residuen zu erreichen, wurden die Alkaloidgehalte logarithmiert. Falls bestimmte Analyten in einzelnen Proben nicht vorhanden waren, wurde der Datensatz für diesen Analyten $\log+1$ transformiert. Wenn durch die vorherige Datenbearbeitung eine Varianzgleichheit nicht erreicht wurde, wurden die Modelle um die Varianzstruktur varIdent ergänzt. Die Entscheidung, ob die Varianzkorrektur für die Zeitpunkte, die Treatments oder für jede einzelne Zeitpunkt-Treatment-Kombination notwendig war, wurde durch den Vergleich der verschiedenen Varianzstruktur-Modelle getroffen. Falls die Modelle mit den verschiedenen Varianzkorrekturen signifikant verschieden waren, wurde das Modell mit dem niedrigsten Akaike Informationskriterium (AIC) gewählt. Eine Zusammenfassung der Datenbearbeitung ist in Tabelle 3 zu sehen.

Der Einfluss (p-Werte) der verschiedenen festen Effekte (Treatments, Zeitpunkte und die Interaktion von Beiden) wurde ermittelt, indem, ausgehend vom vollen Modell, schrittweise die festen Effekte entfernt wurden (backward selection, Zuor et al. (2009)). Dann wurde immer das kompliziertere Modell mit dem nächst einfacheren Modell durch einen „likelihood ratio tests“ verglichen. Zugehörige I.R. und p-Werte können ebenfalls Tabelle 3 entnommen werden.

3. Ergebnisse

3.1. Ändert sich der QA-Gehalt in Abhängigkeit vom Treatment?

Ein Blattlausbefall von 24 h führte für fast alle untersuchten QAs nicht zu einer Konzentrationsänderung in den Pflanzen (Abbildung 3; likelihood ratios und p-Werte siehe Tabelle 2). Nur bei Epi-Baptifolin hatte das Treatment einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration in den Pflanzen (Abbildung 3 und 4; I.R. = 7.667, $p = 0.022$). Blattlausbefall führte zu einer Erhöhung der Epi-Baptifolin-Konzentration. Dabei war es unerheblich, ob ein angepasster (GT2_26) oder ein nicht-angepasster Blattlausklon (ID210) die Pflanze besiedelt hatte. Um die Erhöhung der Epi-Baptifolin-Konzentration besser sichtbar zu machen, wurde für jeden Pflanzenklon die Epi-Baptifolin-Konzentration in der Kontrollpflanze von der Epi-Baptifolin-Konzentration der blattlausbefallenen Pflanze abgezogen. Werte größer als 0 stellen also eine Erhöhung der Konzentration, Werte unter 0 eine Verringerung der Konzentration dar. Die Werte sind in Abbildung 4 zu finden.

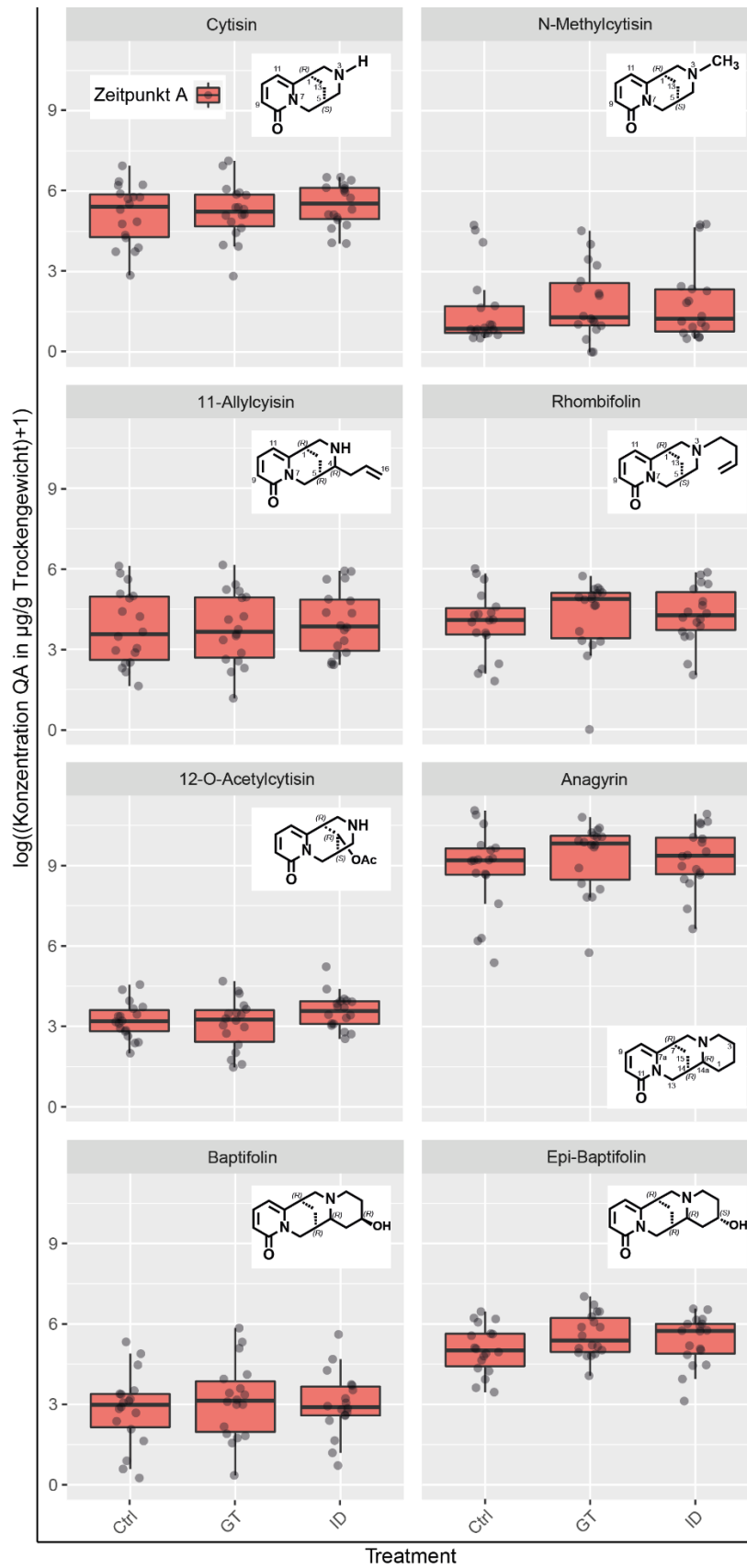


Abbildung 3: Boxplots für die acht untersuchten QAs zum Zeitpunkt A ($A \cong 24$ h nach Blattlausbefall) mit den drei Treatments (ctrl – Kontrolle; GT – GT2_26 – angepasste Blattläuse; ID – ID210 – nicht angepasste Blattläuse). Es sind jeweils die logarithmierten Konzentrationen+1 in μg pro g Trockenbiomasse angegeben.

Tabelle 2: Statistische Werte zur Analyse der QA-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Treatment.

	Stoff	Datenbearbeitung	Modell	I.R.	p-Wert
Trizyklische QAs					
1	Cytisin	log transformiert	lme-Modell	2,732	0,255
2	N-Methylcytisin	(log+1) transformiert	lme-Modell	2,596	0,273
3	11-Allylcytisin	log transformiert	lme-Modell	2,310	0,315
4	Rhombifolin	(log+1) transformiert	lme-Modell mit Varianzkorrektur	3,512	0,173
5	12-O-Acetylcytisin	log transformiert	lme-Modell mit Varianzkorrektur	5,381	0,068
Tetrazyklische QAs					
6	Anagrin	log transformiert	lme-Modell	5,475	0,065
7	Baptifolin	log transformiert	lme-Modell	3,601	0,165
8	Epi-Baptifolin	log transformiert	lme-Modell	7,667	0,022

Signifikante p-Werte sind fett geschrieben. I.R. = likelihood ratio. Varianzkorrektur = varident Varianzstruktur.

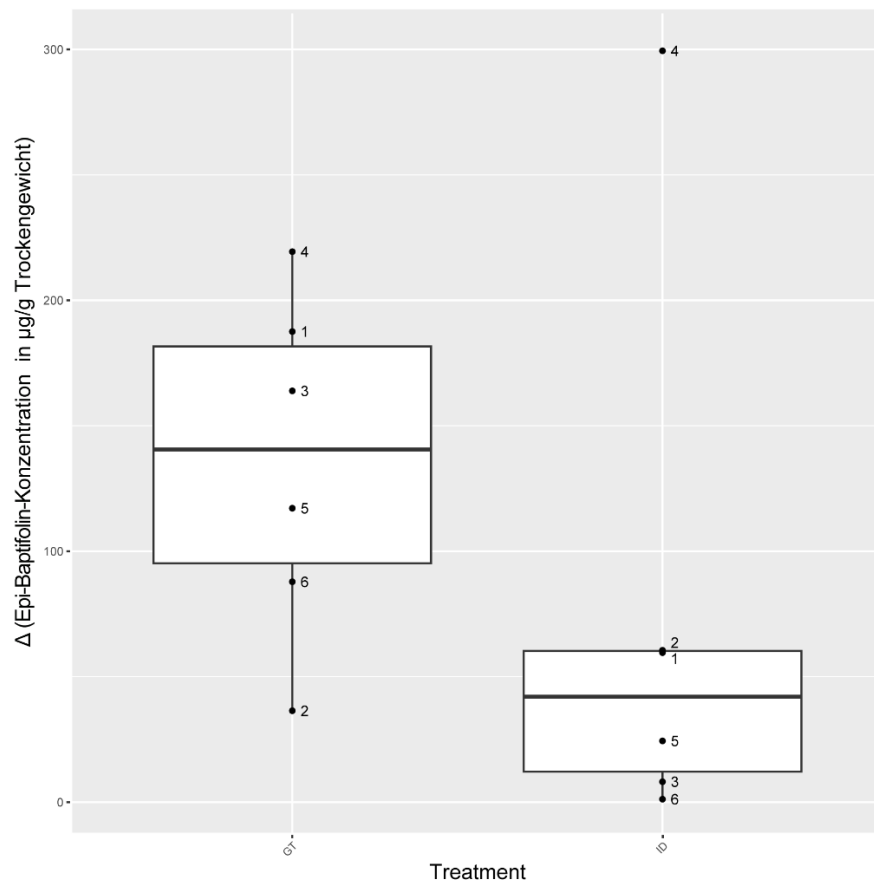


Abbildung 4: Konzentrationsänderung von Epi-Baptifolin nach Blattlausbefall im Vergleich zu blattlausfreien Kontrollpflanzen. Positive Werte bedeuten höhere Epi-Baptifolin-Konzentrationen in blattlausbefallenen Pflanzen. Nummern bezeichnen die Pflanzenklone 1 - 6.

3.2. Ändert sich der QA-Gehalt bei Blattlausbefall über die Zeit?

Die Konzentrationen der acht untersuchten QAs nach 24 h (Zeitpunkt A) und 72 h (Zeitpunkt B) Blattlausbefall, verhielten sich unterschiedlich.

Für die Alkaloide Cytisin, N-Methylcytisin, 11-Allylcytisin und 12-O-Acetylcytisin führten weder ein Blattlausbefall noch die Dauer des Blattlausbefalls zu einer Konzentrationsänderung (Abbildung 5; likelihood ratios und p-Werte siehe Tabelle 3).

Jedoch war ein signifikanter Einfluss der Versuchsdauer auf die Konzentration von Rhombifolin (I.R. = 9,947, $p = 0,002$), Anagyrin (I.R. = 9,398, $p = 0,002$) und Baptifolin (I.R. = 8,157, $p = 0,004$) zu beobachten (Abbildung 3, Tabelle 3). Die Konzentration der drei genannten QAs in den Pflanzen nahm mit der Zeit ab.

Auch bei Epi-Baptifolin konnte eine Verringerung der Konzentration in den Pflanzen über die Zeit festgestellt werden (I.R. = 11,131, $p = 0,001$). Zusätzlich wurde die Epi-Baptifolin-Konzentration in den Pflanzen durch den Blattlausbefall beeinflusst (Abbildung 5; I.R. = 7,388, $p = 0,007$). Blattlausbefall mit dem angepassten Blattlausklon (GT2_26) führte zu einer Erhöhung der Epi-Baptifolin-Konzentration im Vergleich zu den Konzentrationen in den Kontrollpflanzen. Die Erhöhung der Epi-Baptifolin-Konzentration bei Blattlausbefall fiel zu beiden Zeitpunkten gleich stark aus (I.R. = 1,374; $p = 0,241$).

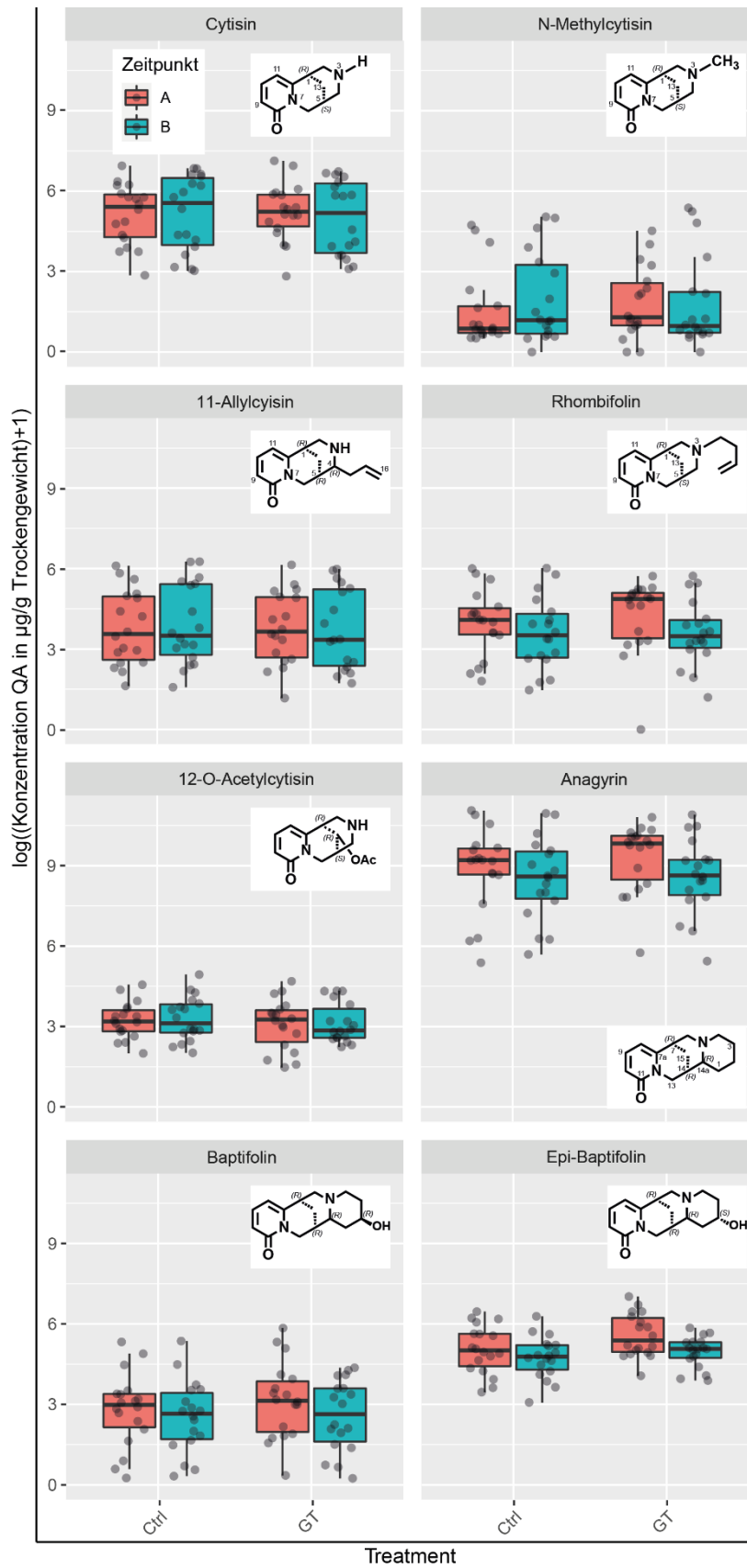


Abbildung 5: Boxplots für die acht untersuchten QAs zum Zeitpunkt A (rot; 24 h nach Blattlausbefall) und B (blau; 72 h nach Blattlausbefall) mit den zwei Treatments (ctrl – Kontrolle; GT – GT₂₆ – angepasste Blattläuse). Es sind jeweils die logarithmierten Konzentrationen+1 in $\mu\text{g pro g}$ Trockenbiomasse angegeben.

Tabelle 3: Statistische Werte zur Analyse der QA-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Treatment und Zeit, sowie Interaktion der Beiden.

	Stoff	Datenbearbeitung	Modell	fixed effect	I.R.	p
Trizyklische QAs						
1	Cytisin	log transformiert	lme-Modell	T	0,035	0,852
				Z	0,394	0,530
				I	0,679	0,410
2	N-Methylcytisin	(log +1) transformiert	lme-Modell	T	0,050	0,164
				Z	2,207	0,137
				I	2,285	0,131
3	11-Allylcytisin	log transformiert	lme-Modell mit Varianz-korrektur	T	1,241	0,265
				Z	0,430	0,512
				I	0,423	0,516
4	Rhombifolin	(log +1) transformiert	lme-Modell	T	0,928	0,336
				Z	9,947	0,002
				I	0,800	0,371
5	12-O-Acetylcytisin	log transformiert	lme-Modell	T	1,808	0,179
				Z	0,430	0,646
				I	0,000	0,996
Tetrazyklische QAs						
6	Anagyrin	log transformiert	lme-Modell	T	3,097	0,078
				Z	9,398	0,002
				I	1,564	0,211
7	Baptifolin	log transformiert	lme-Modell	T	1,934	0,164
				Z	8,157	0,004
				I	1,294	0,255
8	Epi-Baptifolin	log transformiert	lme-Modell	T	7,388	0,007
				Z	11,131	0,001
				I	1,374	0,241

Signifikante p-Werte sind fett geschrieben. I.R. = likelihood ratio. T = Treatment. Z = Zeit. I = Interaktion. Varianzkorrektur = varident Varianzstruktur mit unterschiedlichen Varianzen für jede einzelne Zeit-Treatment-Kombination.

4. Diskussion

Wie in Tabelle 4 und 5 zu sehen konnten in allen Pflanzen, unabhängig von Treatment oder Pflanzenklon, die untersuchten QAs gemessen werden. Da sie auch in den Kontrollpflanzen messbar waren, spricht dies für eine konstitutive Produktion der QAs. Dies bestätigt auch die bereits nachgewiesene konstitutive Produktion (Messung ohne Treatment) von QAs in Lupinen (Lee et al., 2007).

4.1. Ändert sich der QA-Gehalt in Abhängigkeit vom Treatment?

4.1.1. Die meisten QAs zeigen keine Induktion

Bei einem Blattlausbefall von 24 h konnte größtenteils keine Induktion der QA festgestellt werden. Dafür kann es mehrere Erklärungen geben.

Eine wäre, dass für Pflanzen eine weitere Erhöhung der stickstoffhaltigen QAs biosynthetisch zu „teuer“ ist. Allerdings spricht dagegen, dass *G. tinctoria* zu den Leguminosen gehört, die symbiotischen *Rhizobiaceen* vergesellschaftet sind. Diese binden molekularen Stickstoff und stellen diesen den Pflanzen zur Verfügung (Weiler 2008). Durch diese Symbiose ist Stickstoff weniger limitierend, wodurch die QA-Produktion weniger mit dem Primärmetabolismus konkurriert. Außerdem werden QAs zum Stickstofftransport verwendet und somit mindestens als Transportform benötigt (Wink and Witte 1984).

Eine andere Erklärung wäre, dass eine weitere Erhöhung der QA-Konzentration nicht notwendig ist, da die vorhandenen QA-Konzentrationen bereits ausreichend toxisch ist und eine zusätzliche QA-Produktion somit nur Ressourcen verschwendet werden würden. Dafür spricht, dass die Konzentration einiger QAs im Phloemsaft von Lupinen (1-5 mg/ml) bereits um ein zehnfaches höher ist, als der ED₅₀-Wert für *A. pisum* (Dreyer, Jones et al. 1985). Dort war also schon deutlich mehr an QAs enthalten, als für die Abschreckung/Tötung der Blattläuse nötig gewesen wäre. Ob dies auch für die von *G. tinctoria* gebildeten QAs gilt, welche in der Studie von Dreyer (1985) nicht enthalten waren, müsste weiterführend untersucht werden.

Es ist aber auch vorstellbar, dass die Pflanze einfach an ihrem Maximum der QA-Bildung angelangt ist. Dies ist zwar sowohl ressourcenlimitiert als auch von den Kapazitäten der Schlüsselenzyme abhängig, wird jedoch final von der Speicherungsmöglichkeit der QAs in der Pflanze gedeckelt (Berg, 2018). Die QAs werden intrazellulär mithilfe von spezifischen Carrier-Proteinen in die Vakuole transportiert und dort gespeichert (Wink 1987). Eine zu hohe Konzentration der QAs, die z. B. die Kapazitäten der Vakuole überschreitet, wäre auch für die Pflanze giftig und würde sie schwächen oder sogar töten.

Des Weiteren ist vorstellbar, dass die Blattläuse die Pflanzen nicht angestochen und gesaugt haben. Somit wäre für die Pflanze nicht der entsprechende Reiz da, um die Induktion einzuleiten. Zwar wurden bisher bei Fraßstudien festgestellt, dass Blattläuse auch bei Pflanzen stechen, welche nicht ihre Wirtspflanze sind, allerdings wurden die Experimente auf den Pflanzen *V. faba*, *Medicago sativa*, *Pisum sativum* und *Trifolium pratense* durchgeführt (Schwarzkopf et al., 2013). Auf *G. tinctoria* ist bisher keine Fraßstudie bekannt, allerdings ist bereits nachgewiesen worden, dass QAs eine abschreckende Wirkung (Phagodeterrentien) für Blattläuse haben können (Frick et al., 2017). Bei *G. tinctoria* wurde jüngst nachgewiesen, dass die QAs zum Teil auch in der Wachsschicht vorkommen, wobei Anagyrin besonders präsent ist (Feistel, unveröffentlicht). Die abschreckende Wirkung von QAs in der Wachsschicht wurde bisher jedoch noch nicht untersucht und somit kann über die Stärke dieses Arguments noch keine Aussage getroffen werden. Ob die anwesenden Alkaloide ein genügend starkes Phagodeterrent sind, müsste in weiterführenden Untersuchungen, z. B. mittels der Electrical Penetration Graph Technik, getestet werden.

Schließlich wäre auch vorstellbar, dass die Pflanze den Fraß der Blattläuse einfach nicht wahrnimmt und dementsprechend keine Induktion der QA-Produktion einleiten kann. Dies ist jedoch als unwahrscheinlich einzustufen, da das QA Epi-Baptifolin induziert wurde. Es wäre von Interesse Erklärungen zu finden, über welchen Mechanismus Epi-Baptifolin induziert wurde, um verstehen zu können, warum die anderen untersuchten QAs nicht von der Induktion betroffen waren.

4.1.2. Es gibt eine Induktion in der Produktion von Epi-Baptifolin

Bei Epi-Baptifolin wurde 24 h nach Blattlausbefall eine zusätzliche Produktion nach bereits konstitutiver Produktion nachgewiesen. Da die Produktion nur bei den blattlausbefallenen Pflanzen erhöht wurde, kann man rückschließen, dass die Pflanze die Herbivoren erkannt und auf sie reagiert hat. Dabei reagierten sowohl die Pflanzen mit den angepassten (GT2_26) als auch die Pflanzen mit den unangepassten Blattlausbiotypen (ID_210). Dies lässt vermuten, dass der angepasste Biotyp (GT2_26) als Antagonist erkannt worden ist. Außerdem spricht es dafür, dass die Pflanze nicht zwischen den beiden Biotypen unterscheiden kann. Nach der Theorie von Generalisten und Spezialisten erhöht die Pflanze durch die Epi-Baptifolin-Konzentrationssteigerung bis zu einem gewissen Grad die Überlebenswahrscheinlichkeit unseres angepassten Biotyps (GT2_26) (Ali & Agrawal, 2012). Dieser Biotyp GT2_26 ist ein sequestrierender Spezialist, welcher sich mithilfe der QAs nun möglicherweise besser gegen Feinde wehren könnte

(Feistel, unveröffentlicht). Um die Konzentrationsgrenze herauszufinden, an der die QAs auch für die angepassten Blattläuse toxisch/tödlich werden, müsste man weiterführende Bioassays durchführen, und die Werte mit den enthaltenden Konzentrationen im Phloem vergleichen.

Denkbar wäre auch, dass die Induktion von Epi-Baptifolin durch mechanischen Stress, welcher nicht von den Blattläusen, sondern von den Versuchsdurchführern stammt, ausgelöst wurde. Dies kann z. B. bei der Probenahme für die Analyse von Phytohormonen ein Problem sein, da einige Phytohormone sehr schnell gebildet werden (Ladeynova et al., 2023). Des Weiteren konnte in Studien mit Lupinen eine Induktion der QAs durch mechanische Verwundung von Blättern nachgewiesen werden (Frick et al., 2019). Gegen die Induktion durch mechanischen Stress spricht, dass die Proben in dieser Arbeit genau wie bei der etablierten Probennahme für Phytohormone direkt nach der Ernte in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurden, um Signalverfälschungen zu vermeiden (Cao et al., 2020). Da vermutet wird, dass Phytohormone, v. a. Jasmonsäure und Jasminsäure-Isoleucin eine Rolle bei der Induktion für QAs spielen, sollten QAs nicht schneller induziert werden können, als Phytohormone auf den Stress reagieren können (Frick et al., 2019), denn die QA-Produktion erfolgt nach der Phytohormon-Induktion. Außerdem wurden Kontrollpflanzen und blattlausbefallene Pflanzen völlig gleichbehandelt. Es wurde darauf geachtet, die Pflanzen so wenig wie möglich zu bewegen beziehungsweise mechanisch zu reizen, indem ein speziell gefederter Wagen benutzt und unnötige Berührungen vermieden wurden. Da jedoch nur in den blattlausbefallenen Pflanzen eine Induktion nachgewiesen werden konnte, ist eine Induktion durch den Versuchsdurchführer sehr unwahrscheinlich.

Es wird außerdem angenommen, dass die Pflanze selbst zwischen mechanischer Verwundung und Fraß von Herbivoren unterscheiden kann. Es wurde nachgewiesen, dass der gestutzte Schneckenklee *Medicago truncatula* anders auf mechanische Verwundung reagiert als auf Herbivoren (Leitner et al., 2005). Eine Möglichkeit mechanische Verwundung von Herbivorenfraß zu unterscheiden, besteht in der Wahrnehmung von im Speichel von Herbivoren enthaltenen aus Fettsäuren gewonnenen Chemikalien (engl. fatty acid-derived chemicals; FACs). Es wurde schon nachgewiesen, dass Speichel von dem Tabakswärmer *Manduca sexta*, welcher bei der Tabakpflanze *Nicotiana attenuata* auf mechanische Wunden gegeben wurde, für einen höheren Phytohormonspiegel (Jasmonsäure und Ethylen) sorgte, als die mechanische Verwundung allein es tat (Walters, 2010). Eine ähnliche Reaktion wäre auch von *G. tinctoria* auf die Blattläuse denkbar und könnte die Induktion von Epi-Baptifolin erklären.

Es wäre jedoch vorstellbar, dass für die Induktion der andern sieben QAs einfach ein längerer Blattlausbefall notwendig ist, damit die Pflanze die QA-Produktion steigert, oder dass die physiologischen Anpassungen der Pflanze länger als 24 h brauchen. Daher wurde in dieser Arbeit noch eine weitere Probenahme getätigt, um die QA-Konzentrationen nach 72 h betrachten zu können.

4.2. Ändert sich der QA-Gehalt bei Blattlausbefall über die Zeit?

4.2.1. Keine weitere Induktion der QAs bei einem längeren Zeitraum

Für die Messung nach 72 h wurden nur Kontrollpflanzen verwendet sowie die Pflanzen welche mit dem angepassten Blattlausbiotyp (GT2_26) befallen waren. Die Individuen des unangepassten Blattlausbiotyps (ID_210) können nicht so lange auf *G. tinctoria* überleben und waren daher für diesen Versuchsteil nicht von Nutzen.

Jedoch konnte auch zu diesem späteren Zeitpunkt bei keiner Pflanze eine weitere Erhöhung der QA-Konzentrationen gemessen werden. Entweder reichte dieses Zeitfenster für die Pflanze immer noch nicht aus, um auf den Befall zu reagieren, oder – deutlich wahrscheinlicher – es gibt keine weitere Induktion. Für Letzteres spricht, dass eine noch spätere Induktion der Fitness der Pflanze nicht zuträglich wäre, da die Pflanze mit der Zeit durch den Fraß immer mehr geschädigt würde. Außerdem vermehren sich die Blattläuse rasch und würden dadurch noch eine größere Bedrohung für die Pflanzen. Daher ist davon auszugehen, dass keine weitere Induktion mehr stattfindet und auch die Konzentration von Epi-Baptifolin nicht weiter zunimmt. Die Induktion, die gemessen wurde, passierte also rasch innerhalb von 24 h.

Ein möglicher Grund für die fehlende QA-Induktion könnte sein, dass die Pflanze den fortgesetzten Blattlausbefall wahrnimmt und die Ressourcen stattdessen für andere Verteidigungsmechanismen verwendet. Durch Metabolomuntersuchungen könnte dies gegebenenfalls bestätigt und weiter erforscht werden. Man könnte den Stoffwechsel der Pflanze beobachten und aus den Unterschieden Rückschlüsse ziehen.

4.2.2. Abfall der Konzentration einiger QAs über die Zeit

Statt der fehlenden Induktion ist in der Realität sogar ein Abfall mancher QAs im Vergleich beider Zeitpunkte zu sehen. Allerdings war dies treatmentunabhängig zu beobachten und fand gleichermaßen bei blattlausbefallenen und Kontrollpflanzen statt, wodurch ein Einfluss des Blattlausbefalls auszuschließen ist. Der Abfall der Konzentrationen wurde bei den QAs Rhombifolin, Anagyrin, Baptifolin und Epi-Baptifolin registriert. Die Konzentrationen von Cytisin, N-Methylcytisin, 11-Allylcytisin und 12-O-Acetylcytisin nahmen über die Zeit nicht ab und blieben stabil. Es ist interessant, dass Letztere nach dem derzeit bekannten Wissenstand über die Biosynthese der QAs alle über den gleichen Biosynthesezweig ausgehend von Cytisin hergestellt werden. Allerdings entsteht Cytisin nach aktuellem Stand der Wissenschaft aus dem Intermediat Rhombifolin und man geht davon aus, dass Cytisin dann in N-Methylcytisin, 11-Allylcytisin und 12-O-Acetylcytisin umgebaut wird (Wink, 1987). Dies lässt die Frage offen, wie die Level von Cytisin und dessen Derivaten gleichbleiben können, während Rhombifolin eines der QAs ist, dessen Konzentration abnimmt. Dafür könnte z. B. weiterführend untersucht werden, ob es sich bei der Konzentrationsabnahme tatsächlich um einen vermehrten Abbau der QAs handelt oder stattdessen um einen fehlenden Aufbau. Dafür könnten Metabolomuntersuchungen oder Biosyntheseuntersuchungen (mit Vorläufermolekülen) hilfreich sein.

Es gibt zwei denkbare Erklärungen für den Konzentrationsabfall von Rhombifolin, Anagyrin, Baptifolin und Epi-Baptifolin mit der Zeit:

Einerseits wäre es z. B. möglich, dass die QA-Produktion generell mit dem Alter der Pflanzenteile abnimmt. Vergleichbare Ergebnisse wurden in der Blauen Lupine (*Lupinus angustifolius*) gefunden. Dort konnte nachgewiesen werden, dass das Transkript der Lysin-Decarboxylase (LDC), das Enzym, welches bei der QA-Biosynthese die Umwandlung von Lysin in Cadaverin katalysiert, hauptsächlich in Proben von jungen Blättern, aber kaum in älteren Blättern zu finden ist (Frick et al., 2017). Dadurch ist eine QA-Produktion in diesen Blättern nahezu ausgeschlossen und die QA-Konzentration wäre dort nur von dem Transport von QAs in diese Bereiche abhängig. Inwiefern die 48 h Zeitunterschied einen Einfluss auf das Vorkommen der LDC haben, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Eventuell könnten die Zellulosetüten, die um die Pflanzen gespannt sind, z. B. durch weniger Licht die Entwicklung neuer Zweige verlangsamen, so dass sich das Verhältnis Richtung alter Blätter verschiebt.

Es wäre vorstellbar, dass die Produktion der QAs dadurch abnimmt, dass die Pflanzen durch die Zellulosetüten weniger Licht bekommen. Die QA-Biosynthese findet tagsüber in den Chloroplasten statt und ist lichtabhängig. Die Abhängigkeit von abiotischen Faktoren wie Licht wurde für die QA-Biosynthese auch schon zuvor beschrieben (Frick et al., 2017). Allerdings wurden die Pflanzen schon fünf Tage vor Beginn des Experiments mit den Tüten bedeckt, um eine Akklimatisierung der Pflanzen zu ermöglichen. Damit sollte der Einfluss der Tüte so gering wie möglich gehalten werden. Des Weiteren wurde der abiotische Faktor Licht während des Versuches konstant gehalten. Zwar könnten auch Verschmutzungen der Tüte durch Honigtau mit der Zeit zu einer geringeren Lichtdurchlässigkeit führen, wodurch die QA-Biosynthese sinken könnte, jedoch ist die QA-Konzentration in den Kontrollen auch abgesunken.

Weder das Argument des Alters der Pflanzenteile noch das Argument des verringerten Lichteinfalls erklären allerdings, warum vom Konzentrationsabfall nicht alle QA, sondern nur einige betroffen sind. Es wäre vorstellbar, dass die Pflanze durch genetische Steuerung die Produktion einiger QA bevorzugt. Hierzu ist allerdings noch nichts bekannt und eine Bestätigung würde umfassender Forschung durch Transkriptomanalyse erfordern.

4.3. Zusammenfassung und Ausblick

Dass Blattlausbefall die QA-Konzentration erhöht, konnte mit Ausnahme von Epi-Baptifolin in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dies stellt die Frage in den Raum, ob *G. tinctoria* überhaupt mit induzierter Verteidigung auf einen Blattlausbefall reagiert. Schließlich gibt es neben der Verteidigung mithilfe von QAs noch weitere Verteidigungsmechanismen. Außerdem verteidigen die QAs die Pflanze nicht ausschließlich gegen Blattläuse und andere Herbivoren, sondern auch gegen Pflanzenviren und andere mögliche Krankheitserreger (Wink & Witte, 1991). Dies deckt sich mit einer vergleichbaren Studie, die den QA-Gehalt in Samen der Schmalblättrigen Lupine (*Lupinus angustifolius*) im Zusammenhang mit Blattlausbefall untersuchte. Auch dort konnten keine Veränderungen (nur bezogen auf die Samen) in der QA-Konzentration gefunden werden. Jedoch wurde dort eine Veränderung im Phytohormonhaushalt festgestellt (Frick et al., 2019). Des Weiteren wurde aber auch schon nachgewiesen, dass Phytohormone (im speziellen Methyljasmonat) die Expression der QA-Biosynthesegene induzieren können (Frick et al., 2019). Um zu prüfen, ob *G. tinctoria* überhaupt auf den Blattlausbefall reagiert, wäre es also sinnvoll im nächsten Schritt die Phytohormonlevel blattlausbefallener Pflanzen mit Kontrollpflanzen zu

vergleichen. Auch eine Metabolomanalyse wäre hinsichtlich dieser Fragestellung sinnvoll, da die Pflanze auch mit anderen spezialisierten Metaboliten auf den Blattlausbefall reagieren könnte.

Außerdem ist noch zu beachten, dass in dieser Arbeit mit sechs verschiedenen Pflanzenklonen gearbeitet wurde. Die QA-Ausgangskonzentration beziehungsweise die Induzierbarkeit kann genetisch bedingt von Pflanzenklon zu Pflanzenklon variieren und man könnte vermuten, dass QA-Ausgangskonzentration und Induzierbarkeit miteinander korrelieren. Beispielsweise könnte es nur bei niedrigen Ausgangskonzentration vielleicht eine Induktion geben, während bei hohen Ausgangskonzentrationen möglicherweise keine zusätzliche Induktion erfolgt. Um den Einfluss des QA-Grundlevels auf die Induktion zu untersuchen, müssten auch hierfür weiterführende Experimente durchgeführt werden. Im Rahmen dessen sollte die Anzahl der Pflanzenklone erhöht werden, um zufällige Effekte besser ausschließen zu können.

Ein weiterer zu berücksichtigender Punkt ist, dass in dieser Arbeit nur die QA-Bilanz gemessen wurde. Bei der Probenahme wurde jeweils das gesamte oberirdische Pflanzenmaterial gesammelt. Falls die Pflanzen nicht durch eine Induktion, sondern durch eine Umverteilung der Stoffe im oberirdischen Pflanzenmaterial reagiert, würde dies durch die Versuchsdurchführung nicht nachgewiesen werden können. Besonders für die Abwehr von Blattläusen und andere Phloemsaugern, steht aber vor allem die QA-Konzentration im Phloem im Vordergrund. Denn Blattläuse beproben auf dem Weg zum Phloem zwar auch ab und zu Zellen, sonst wird ihr Stilet aber größtenteils interzellulär um die Zellen herum navigiert. Dadurch können viele für die Blattlaus potenziell toxische Substanzen wie QAs, die z. B. in Vakuolen gespeichert werden, umgangen werden (Dreyer et al., 1985). Um das Problem der verschiedenen Konzentrationen in verschiedenen Pflanzenteilen und -kompartimenten zu lösen, müssten die einzelnen Pflanzenteile (z. B. Reproduktionsorgane, Stängel, junge Blätter, alte Blätter, Phloemsaft) für zukünftige Experimente getrennt gesammelt werden.

Abschließend muss daher festgestellt werden, dass nur Epi-Baptifolin induziert wurde. Aber warum nur dieses eine Alkaloid induziert wurde und warum ein Abfall der Konzentrationen von einigen Chinolizidin-Alkaloiden über die Zeit erfolgte, konnte nicht abschließend geklärt werden. Um die zugrunde liegenden Ursachen zu ermitteln, bedarf es weiterer Forschung im Bereich der Pflanzen-Blattlaus-Interaktionen.

5. Literaturverzeichnis

- Agren, G. I., Wetterstedt, J. A. M., & Billberger, M. F. K. (2012). Nutrient limitation on terrestrial plant growth - modeling the interaction between nitrogen and phosphorus. *New Phytologist*, *194*(4), 953-960.
- Ali, J. G., & Agrawal, A. A. (2012). Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. *Trends in Plant Science*, *17*(5), 293-302.
- Begon, M., Townsend, C. R., & Harper, J. L. (2006). *Ecology : from individuals to ecosystems* (Fourth edition ed.). Blackwell Publishing.
- Berg, J. M. (2018). *Stryer Biochemie* (8. Aufl. 2018 ed.). Springer Spektrum.
- Bunsupa, S., Yamazaki, M., & Saito, K. (2012). Quinolizidine alkaloid biosynthesis: recent advances and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, *3*, 7, Article 239.
- Cao, D., Barbier, F., Yoneyama, K., & Beveridge, C. A. (2020). A Rapid Method for Quantifying RNA and Phytohormones From a Small Amount of Plant Tissue. *Frontiers in Plant Science*, *11*, Article 605069.
- Cipollini, D., Purrington, C. B., & Bergelson, J. (2003). Costs of induced responses in plants. *Basic and Applied Ecology*, *4*(1), 79-89.
- Clauss, W. (2021). *Taschenatlas Zoologie*. Springer Spektrum.
- Crawley, M. J. (2013). *The R book*. Second edition. Chichester, West Sussex, United Kingdom : Wiley, 2013.
- Douglas, A. E. (2003). The nutritional physiology of aphids. In S. J. Simpson (Ed.), *Advances in Insect Physiology, Vol 31* (Vol. 31, pp. 73-140).
- Dreyer, D. L., Jones, K. C., & Molyneux, R. J. (1985). Feeding Deterrence of Some Pyrrolizidine, Indolizidine, and Quinolizidine Alkaloids Towards Pea Aphid (*Acyrtosiphon-Pisum*) and Evidence for Phloem Transport of Indolizidine Alkaloid Swainsonine. *Journal of Chemical Ecology*, *11*(8), 1045-1051.
- Emden, H., & Harrington, R. (2007). *Aphids as Crop Pests*.
- Feistel, F. (unveröffentlicht).
- Frick, K. M., Foley, R. C., Siddique, K. H. M., Singh, K. B., & Kamphuis, L. G. (2019). The role of jasmonate signalling in quinolizidine alkaloid biosynthesis, wounding and aphid predation response in narrow-leaved lupin. *Functional Plant Biology*, *46*(5), 443-454.
- Frick, K. M., Kamphuis, L. G., Siddique, K. H. M., Singh, K. B., & Foley, R. C. (2017). Quinolizidine Alkaloid Biosynthesis in Lupins and Prospects for Grain Quality Improvement. *Frontiers in Plant Science*, *8*.
- Furch, A. C., van Bel, A. J., & Will, T. (2015). Aphid salivary proteases are capable of degrading sieve-tube proteins. *J Exp Bot*, *66*(2), 533-539.
- Guo, J. Q., Hatt, S., He, K. L., Chen, J. L., Francis, F., & Wang, Z. Y. (2017). Nine facultative endosymbionts in aphids. A review. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *20*(3), 794-801.
- Habermehl, G. G. K. (2002). *Naturstoffchemie : eine Einführung ; 48 Tabellen* (2., völlig neu bearb. Aufl. ed.). Springer.
- Heil, M., & Baldwin, I. T. (2002). Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science*, *7*(2), 61-67.
- Herms, D. A., & Mattson, W. J. (1992). The Dilemma of Plants - to Grow or Defend. *Quarterly Review of Biology*, *67*(3), 283-335.
- Kessler, A., & Baldwin, I. T. (2002). Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology*, *53*, 299-328.
- Ku, Y. S., Contador, C. A., Ng, M. S., Yu, J., Chung, G., & Lam, H. M. (2020). The Effects of Domestication on Secondary Metabolite Composition in Legumes. *Frontiers in Genetics*, *11*, Article 581357.

- Ladeynova, M., Kuznetsova, D., Mudrilov, M., & Vodeneev, V. (2023). Integration of Electrical Signals and Phytohormones in the Control of Systemic Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), Article 847.
- Lee, M. J., Pate, J. S., Harris, D. J., & Atkins, C. A. (2007). Synthesis, transport and accumulation of quinolizidine alkaloids in *Lupinus albus* L. and *L. angustifolius* L. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 935-946.
- Leitner, M., Boland, W., & Mithofer, A. (2005). Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 167(2), 597-606.
- Liu, L. J., Alam, M. S., Hirata, K., Matsuda, K., & Ozoe, Y. (2008). Actions of quinolizidine alkaloids on *Periplaneta americana* nicotinic acetylcholine receptors. *Pest Management Science*, 64(12), 1222-1228.
- Lüttge, U. (2017). *Faszination Pflanzen*. Springer Spektrum.
- McLean, A. H. C., van Asch, M., Ferrari, J., & Godfray, H. C. J. (2011). Effects of bacterial secondary symbionts on host plant use in pea aphids. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 278(1706), 760-766.
- Nentwig, W. (2017). *Ökologie kompakt* (4. Aufl. 2017 ed.). Springer Spektrum.
- Nuhn, P. (2006). *Naturstoffchemie : mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe* (4., neu bearb. Aufl. ed.). Hirzel.
- Peccoud, J., Mahéo, F., de la Huerta, M., Laurence, C., & Simon, J. C. (2015). Genetic characterisation of new host-specialised biotypes and novel associations with bacterial symbionts in the pea aphid complex. *Insect Conservation and Diversity*, 8(5), 484-492.
- Pinheiro, J., Bates, D., & R Core Team (2023). *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*.
- Pinheiro, J. C., & Bates, D. M. (2000). *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing.
- Richards, L. A., Dyer, L. A., Forister, M. L., Smilanich, A. M., Dodson, C. D., Leonard, M. D., & Jeffrey, C. S. (2015). Phytochemical diversity drives plant-insect community diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(35), 10973-10978.
- Richards, S., Gibbs, R. A., Gerardo, N. M., Moran, N., Nakabachi, A., Stern, D., Tagu, D., Wilson, A. C. C., Muzny, D., Kovar, C., Cree, A., Chacko, J., Chandrabose, M. N., Dao, M. D., Dinh, H. H., Gabisi, R. A., Hines, S., Hume, J., Jhangian, S. N., . . . Consortium, I. A. G. (2010). Genome Sequence of the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Plos Biology*, 8(2).
- Schaefer, M. (2012). *Wörterbuch der Ökologie* (5. neu bearbeitete und erweiterte Auflage ed.). Spektrum Akademischer Verlag.
- Schwarzkopf, A., Rosenberger, D., Niebergall, M., Gershenzon, J., & Kunert, G. (2013). To Feed or Not to Feed: Plant Factors Located in the Epidermis, Mesophyll, and Sieve Elements Influence Pea Aphid's Ability to Feed on Legume Species. *Plos One*, 8(9).
- Walters, D. R. (2010). *Plant defense warding off attack by pathogens, herbivores, and parasitic plants*. Wiley-Blackwell.
- Weiler, E. W. (2008). *Allgemeine und molekulare Botanik : 30 Tabellen*. Thieme.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*.
- Will, T., Furch, A. C., & Zimmermann, M. R. (2013). How phloem-feeding insects face the challenge of phloem-located defenses. *Front Plant Sci*, 4, 336.
- Wink, M. (1987). QUINOLIZIDINE ALKALOIDS - BIOCHEMISTRY, METABOLISM, AND FUNCTION IN PLANTS AND CELL-SUSPENSION CULTURES. *PLANTA MEDICA*, 53(6), 509-514.

- Wink, M., & Witte, L. (1991). STORAGE OF QUINOLIZIDINE ALKALOIDS IN MACROSIPHUM ALBIFRONS AND APHIS GENISTAE (HOMOPTERA, APHIDIDAE). *Entomologia Generalis*, 15(4), 237-254.
- Yamamoto, I. (1999). *Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor*. Springer.
- Ziegler, J., & Facchini, P. J. (2008). Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 735-769.
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N., Saveliev, A. A., & Smith, G. M. (2009). *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R*. Springer.

6. Anhang

Tabelle 4: Übersicht über die Konzentrationen der acht untersuchten QAs zum Zeitpunkt A (24 h) in ng/mg (beziehungsweise µg/g) Trockenbiomasse.

Proben-ID	Cytisin	N-Methyl-cytisin	11-Allyl-cytisin	Rhombifolin	12-O-Acetyl-cytisin	Anagyrin	Baptifolin	Epi-Baptifolin
220603_QA-Ctrl-A_1.1	48,0	1,3	4,1	5,1	10,1	216,4	0,3	30,7
220601_QA-Ctrl-A_1.2	117,9	9,1	9,0	7,0	23,7	488,4	0,8	76,5
220601_QA-Ctrl-A_1.3	69,9	4,2	7,6	8,6	16,3	541,0	1,4	102,8
220601_QA-Ctrl-A_2.1	366,4	93,2	339,2	334,9	17,6	54052,7	28,2	158,4
220601_QA-Ctrl-A_2.2	303,0	58,8	270,7	270,3	13,0	38535,0	21,7	120,4
220601_QA-Ctrl-A_2.3	577,1	112,8	446,2	403,6	21,4	63451,7	28,7	165,2
220601_QA-Ctrl-A_3.1	128,2	1,7	19,8	59,0	30,5	10652,8	86,3	275,7
220601_QA-Ctrl-A_3.2	77,3	0,7	10,9	145,8	15,6	17325,4	205,2	637,9
220601_QA-Ctrl-A_3.3	320,2	4,6	66,9	96,3	94,5	15716,1	131,8	483,5
220601_QA-Ctrl-A_4.1	41,3	1,8	16,7	77,0	9,8	14498,5	13,6	279,2
220601_QA-Ctrl-A_4.2	41,2	1,3	18,1	54,0	22,8	9645,0	9,7	259,3
220601_QA-Ctrl-A_4.3	16,5	1,0	11,2	32,9	6,4	5750,4	7,0	132,8
220601_QA-Ctrl-A_5.1	501,1	0,7	31,2	70,7	28,3	9834,9	16,1	501,5
220601_QA-Ctrl-A_5.2	510,0	0,9	37,3	10,6	40,4	1957,0	4,1	140,4
220601_QA-Ctrl-A_5.3	1038,2	1,3	81,0	73,3	78,1	10117,4	20,3	428,8
220601_QA-Ctrl-A_6.1	202,1	1,1	156,7	36,0	28,3	6124,4	17,2	36,3
220601_QA-Ctrl-A_6.2	322,8	1,0	144,8	57,7	37,9	9997,9	32,5	68,6
220601_QA-Ctrl-A_6.3	249,0	1,5	133,9	35,7	51,1	5974,1	23,5	50,1
220601_QA-GT-A_1.7	169,0	7,2	8,9	25,7	18,6	3370,1	5,2	357,5
220601_QA-GT-A_1.8	162,2	13,0	12,8	26,5	25,9	4154,8	5,7	357,8
220601_QA-GT-A_1.9	15,9	30,7	2,2	0,0	3,4	314,0	0,4	57,4
220601_QA-GT-A_2.7	164,8	24,3	134,9	196,5	3,9	30635,1	18,9	172,9
220601_QA-GT-A_2.8	433,1	90,9	184,6	304,2	14,4	49210,7	21,2	258,3
220601_QA-GT-A_2.9	218,8	54,7	222,0	131,0	6,5	17676,8	19,0	122,0
220601_QA-GT-A_3.7	101,2	1,3	16,4	158,4	30,2	23480,5	204,2	636,2
220601_QA-GT-A_3.8	50,4	0,0	11,9	100,7	9,1	16089,7	161,7	428,8
220601_QA-GT-A_3.9	220,5	2,2	41,1	186,4	74,1	24973,3	344,8	823,7
220601_QA-GT-A_4.7	84,5	2,5	32,0	148,7	24,1	27796,9	22,9	529,3
220601_QA-GT-A_4.8	205,4	7,9	67,1	182,5	42,7	33006,4	27,7	638,7
220601_QA-GT-A_4.9	53,1	1,8	27,3	37,9	20,0	7422,8	7,7	161,5
220601_QA-GT-A_5.7	356,5	0,0	34,2	22,5	32,3	2501,0	4,7	181,4
220601_QA-GT-A_5.8	1250,2	2,8	59,6	126,0	31,4	19424,5	29,7	1119,2

220601_QA-GT-A_5.9	127,6	0,6	7,6	14,6	4,7	2492,6	3,8	121,4
220601_QA-GT-A_6.7	1041,1	9,8	463,0	138,0	107,5	20464,4	50,7	137,6
220601_QA-GT-A_6.8	347,8	1,7	139,2	163,0	37,2	23782,6	60,1	150,3
220601_QA-GT-A_6.9	380,1	2,0	173,4	101,4	67,5	17414,8	35,3	130,6
220601_QA-ID-A_1.13	151,3	9,5	15,2	6,6	45,8	764,8	1,1	84,2
220601_QA-ID-A_1.14	167,6	5,7	10,2	31,7	21,0	4183,3	4,2	177,9
220601_QA-ID-A_1.15	99,3	5,3	10,4	10,4	19,8	1617,2	2,3	126,7
220601_QA-ID-A_2.13	385,1	114,6	282,9	242,1	11,6	38208,3	20,2	150,3
220601_QA-ID-A_2.14	605,4	116,9	363,6	350,3	14,1	55549,0	39,6	316,3
220601_QA-ID-A_2.15	444,7	103,0	371,4	319,7	15,3	40100,8	24,0	159,0
220601_QA-ID-A_3.13	458,7	10,6	77,8	37,7	185,1	7945,4	70,4	312,3
220601_QA-ID-A_3.14	57,7	0,7	11,4	79,5	21,3	11973,7	107,2	402,3
220601_QA-ID-A_3.15	138,1	1,5	21,9	187,5	41,2	23312,6	271,9	706,8
220601_QA-ID-A_4.13	113,5	2,8	44,4	117,7	51,3	22167,6	16,3	479,9
220601_QA-ID-A_4.14	203,7	8,8	75,9	226,2	49,4	41945,2	33,4	686,1
220601_QA-ID-A_4.15	56,3	2,0	16,7	101,3	26,6	19277,7	14,0	403,6
220601_QA-ID-A_5.13	500,2	0,7	40,1	46,3	39,7	5757,7	12,2	307,0
220601_QA-ID-A_5.14	677,6	1,0	47,4	53,6	50,6	7072,5	15,6	465,7
220601_QA-ID-A_5.15	414,1	0,7	26,6	60,5	55,1	6246,3	12,5	371,2
220601_QA-ID-A_6.13	313,0	1,6	120,7	75,2	29,6	13690,1	41,1	86,3
220601_QA-ID-A_6.14	167,8	1,0	128,9	31,0	30,1	4894,3	10,0	21,7
220601_QA-ID-A_6.15	675,1	2,1	271,2	64,2	79,7	11500,7	17,8	50,6

Die Proben-ID setzt sich zusammen aus: „YYMMDD (Jahr, Monat, und Tag der Messung)_QA-(Treatment)_ (Pflanzenklon).(Pflanzenreplikat)“. Treatments zum Zeitpunkt A: ctrl-A = Kontrolle geerntet zum Zeitpunkt A. GT-A = GT2_26 geerntet zum Zeitpunkt A. ID-A = ID210 geerntet zum Zeitpunkt A.

Tabelle 5: Übersicht über die Konzentrationen der acht untersuchten QAs zum Zeitpunkt B (72 h) in µg/g Trockenbiomasse.

Proben-ID	Cytisin	N-Methyl-cytisin	11-Allyl-cytisin	Rhombifolin	12-O-Acetyl-cytisin	Anagyrin	Baptifolin	Epi-Baptifolin
220601_QA-Ctrl-B_1.4	36,5	27,6	7,8	4,8	14,8	531,4	1,0	60,3
220601_QA-Ctrl-B_1.5	64,3	6,2	10,4	5,3	17,0	516,8	0,7	68,2
220601_QA-Ctrl-B_1.6	22,7	48,6	3,8	3,3	8,4	295,1	0,4	20,6
220601_QA-Ctrl-B_2.4	703,8	147,1	521,4	322,8	16,4	54362,5	34,0	182,8
220601_QA-Ctrl-B_2.5	388,4	101,2	247,7	194,8	9,3	26897,8	14,6	124,6
220601_QA-Ctrl-B_2.6	752,8	153,8	517,9	409,5	17,4	56981,6	33,2	187,6
220601_QA-Ctrl-B_3.4	79,1	2,3	23,1	14,8	37,8	2922,6	21,3	86,6
220601_QA-Ctrl-B_3.5	208,6	3,4	29,0	125,5	40,9	17499,8	212,2	535,0
220601_QA-Ctrl-B_3.6	77,8	0,0	19,9	50,3	26,9	8425,0	87,8	302,3

220601_QA-Ctrl-B_4.4	49,9	2,1	22,4	58,1	16,0	12542,0	10,3	273,7
220601_QA-Ctrl-B_4.5	20,9	0,8	10,0	12,8	10,6	2997,7	4,3	109,6
220601_QA-Ctrl-B_4.6	19,8	1,2	13,8	28,1	6,5	5235,0	6,4	121,9
220601_QA-Ctrl-B_5.4	759,4	0,8	43,3	16,5	46,5	2204,7	5,2	136,7
220601_QA-Ctrl-B_5.5	320,8	0,7	35,5	13,2	36,7	1383,5	3,4	112,9
220601_QA-Ctrl-B_5.6	941,4	0,9	80,4	50,3	52,4	5570,5	11,9	177,2
220601_QA-Ctrl-B_6.4	496,5	18,0	288,3	36,7	138,4	6696,9	14,8	37,1
220601_QA-Ctrl-B_6.5	933,9	2,2	227,8	79,6	70,2	14195,4	40,7	101,4
220601_QA-Ctrl-B_6.6	534,2	1,7	216,7	28,5	77,8	4112,4	16,7	46,5
220601_QA-GT-B_1.10	23,1	33,5	4,6	2,3	9,1	229,1	0,3	47,8
220601_QA-GT-B_1.11	35,4	8,5	6,2	5,9	12,2	705,3	0,9	119,1
220601_QA-GT-B_1.12	94,9	7,9	7,1	16,6	16,8	2533,8	3,0	157,9
220601_QA-GT-B_2.10	473,1	215,1	375,2	224,5	11,7	33885,5	25,2	164,5
220601_QA-GT-B_2.11	334,0	122,6	240,4	234,6	8,4	35389,5	19,5	157,6
220601_QA-GT-B_2.12	563,0	188,1	395,1	306,3	12,4	54258,4	35,2	204,6
220601_QA-GT-B_3.10	60,2	1,0	11,3	37,8	20,0	9856,8	77,8	287,8
220601_QA-GT-B_3.11	52,3	1,1	12,3	35,9	23,5	5337,3	70,6	272,6
220601_QA-GT-B_3.12	30,7	0,0	8,1	27,3	13,1	4531,8	59,6	204,2
220601_QA-GT-B_4.10	21,1	0,9	9,3	24,6	10,2	4652,3	7,2	164,6
220601_QA-GT-B_4.11	50,7	1,7	25,6	48,2	23,6	9809,4	7,0	199,6
220601_QA-GT-B_4.12	36,0	1,5	27,8	26,2	15,9	5917,6	5,9	129,8
220601_QA-GT-B_5.10	747,7	0,7	85,3	18,8	60,7	2256,3	3,5	110,5
220601_QA-GT-B_5.11	343,9	0,9	27,1	24,0	15,4	3273,7	8,4	347,3
220601_QA-GT-B_5.12	789,1	1,3	51,2	7,4	74,2	840,4	1,1	51,2
220601_QA-GT-B_6.10	348,7	2,4	192,1	60,8	44,6	10201,3	28,2	57,7
220601_QA-GT-B_6.11	837,7	2,3	281,1	113,5	75,0	20470,1	57,9	151,1
220601_QA-GT-B_6.12	689,2	1,2	168,2	51,3	74,5	8060,4	35,6	80,3

Die Proben-ID setzt sich zusammen aus: „YYMMDD (Jahr, Monat, und Tag der Messung)_QA-(Treatment)_(Pflanzenklonlinie).(Pflanzenreplikat)“. Treatments zum Zeitpunkt B: ctrl-B = Kontrolle geerntet zum Zeitpunkt B. GT-B = GT2_26 geerntet zum Zeitpunkt B.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, kenntlich gemacht sind und die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung war.

.....
(Ort, Datum)

.....
(Unterschrift)

Danksagung

Ein herzlicher Dank gilt der Plant-Aphid Interactions Projektgruppe für die langjährige Unterstützung und die Erfahrungen, die ich im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft dort sammeln durfte.

Ich danke Dr. Felix Feistel, Dr. Grit Kunert, Dr. Alexandra Furch, Prof. Jonathan Gershenzon, dem Max-Planck-Institut für chemische Ökologie und den Gärtnern für die Ermöglichung meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei allen weiteren helfenden Händen sowie bei den pinken und den grünen Erbsenblattläusen für ihre Mithilfe.