

***Untersuchung der Biosynthese von Phenolen
und Terpenen in borkenkäferresistenten Fichten
aus dem Böhmerwald***

Bachelorarbeit

vorgelegt an der Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena
Fachbereich Medizintechnik/ Biotechnologie
Studiengang Biotechnologie

Hochschulbetreuer:	Professor Dr. Schumann
Institutsbetreuer:	Dr. Schmidt
Institut:	Max Planck Institut für Chemische Ökologie Abteilung Biochemie
Bearbeitet von:	Marcel Alsleben
Matrikelnummer:	633443
Studiengang:	Biotechnologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung und Zielstellung	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Zielstellung.....	5
2 Material und Methoden	6
2.1 Proben Vorbereitung	6
2.1.1 Probenentnahme.....	6
2.1.2 Proben Aufbereitung.....	6
2.1.3 Terpenextraktion.....	7
2.1.4 Phenolextraktion	7
2.2 Proben Analyse	8
2.2.1 Terpenanalyse	8
2.2.2 Phenolanalyse	9
2.3 Proben Auswertung.....	9
2.3.1 Auswertung der Proben für die Phenole.....	9
2.3.2 Auswertung der Proben für die Terpene.....	9
3 Ergebnisse.....	11
3.1 Terpene.....	11
3.1.1 Monoterpene	11
3.1.2 Sesquiterpene	14
3.1.3 Diterpene.....	15
3.2 Phenole.....	16
3.2.1 Hauptphenole	16
3.2.2 Nebenphenole	18
4 Diskussion	19
5 Zusammenfassung	23
Anhang.....	IV
A) Puffer- / Standardzusammensetzung	IV
B) Natriumcyanoborhydrit-zusammensetzung	IV
C) Chemikalienliste	IV
D) Geräteliste	V
E) Programmliste.....	V
Literaturverzeichnis	VI
Ehrenwörtliche Erklärung.....	VII

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie
GC-FID	Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie
DMADP / DMAPP	Dimethylallyldiphosphat / Dimethylallylpyrophosphat
FDP / FPP	Farnesyldiphosphat / Farnesylpyrophosphat
GGDP / GGPP	Geranylgeranyldiphosphat / Geranylgeranylpyrophosphat
GDP / GPP	Geranyldiphosphat / Geranylpyrophosphat
IDP / IPP	Isopentenylidiphosphat / Isopentenylpyrophosphat
(NH ₄) ₂ CO ₃	Ammonium-Carbonat
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxide
TBME	tert.-Butylmethylether
DCDHAA	Dichlorodehydroabieticacid
DAHP	3-Desoxyarabinoheptulosansäure-7-phosphat

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Terpene der <i>Picea abies</i> . a) und d) Monoterpene, b) Sesquiterpene und c) Diterpene. [7]	2
Abbildung 2: Terpenbiosynthese in Plasiden und Cytoplasma von Höheren Pflanzen [1].....	3
Abbildung 3: Shikimatweg [9].....	4
Abbildung 4: Nationalpark Böhmerwald im Mai 2012, nach einer Invasion der Borkenkäfer im Jahr 2007 befinden sich noch einzelne resistente Fichten in dem Waldgebiet.	5
Abbildung 5: Monoterpene der <i>Picea abies</i>	12
Abbildung 6: Nebenmonoterpene der <i>Picea abies</i>	13
Abbildung 7: Sesquiterpene der <i>Picea abies</i>	14
Abbildung 8: Diterpene der <i>Picea abies</i>	15
Abbildung 9: Hauptphenole der <i>Picea abies</i>	17
Abbildung 10: Nebenphenole der <i>Picea abies</i>	18
Abbildung 11: Strukturformel von Limonen und β -Phellandren	22

1 Einleitung und Zielstellung

1.1 Einleitung

Die Gemeine Fichte (*Picea abies*) gehört zu der Ordnung der Koniferen und ist im Nordosten Europas (boreale Wälder) häufig anzutreffen, in Mitteleuropa ist sie im mittleren und oberen Bergwaldes ansässig. Die Fichte ist auf diese Region spezialisiert und in der Lage auch auf nährstoffarmen und sauren Böden zu gedeihen[1]. Sie kann mit einigen Ausnahmen bis zu 600 Jahre alt werden und erreicht eine Wuchshöhe von 40 bis 60 Meter. In Deutschland wird sie schon seit 1423 angebaut und forstwirtschaftlich genutzt. Sie hat sich im Laufe der Jahrhunderte zu einer der wichtigsten Wirtschaftsbaumarten in vielen Ländern entwickelt [2]. Deswegen ist es von wesentlicher Bedeutung diese Baumart vor schädigenden Umwelteinflüssen zu schützen. Sie ist in ihrem natürlichen Lebensraum verschiedenen biotischen und abiotischen Umweltfaktoren ausgesetzt. Eine der größten biotischen Gefährdungen geht dabei von den Buchdrucker (*Ips typographus*) und seinen Begleitern dem Kupferstecher (*Pityogenes chalcographus*) aus. Diese Käfer der Unterfamilie Borkenkäfer (*Scolytinae*) befallen meist infolge von Trockenperioden die Fichte. Bei der Auswahl ihrer Nahrungsquelle sind sie sehr spezifisch und befallen ausschließlich *Picea abies* (mono-, oder stenophag). Dabei fressen sie sich durch die Borke und bilden ein System aus Gängen im darunter liegenden Kambium an. In diesen Gängen findet die Vermehrung der Käfer statt. Die daraus resultierenden Larven fressen sich durch das Kambium und hinterlassen ein artentypisches Fraßbild. Durch das Öffnen des Holzkörpers werden zusätzliche Herbivoren eingeschleppt. Mit dem Borkenkäfer wird gleichzeitig der Blaufäulepilz *Ceratocystis polonica* assoziiert, dieser breitet sich in den angelegten Gängen des Borkenkäfers aus[3].

Die Fichte wendet verschiedenste Verteidigungsmechanismen gegen diese Schädlinge und andere Herbivoren an [4]. Der erste Verteidigungsmechanismus der Fichte gegenüber dem Borkenkäfer ist die Borke. Sie bietet einen physischen Schutz und erschwert das Eindringen. Im Inneren weist die Fichte ein weit verzweigtes System an Kanälen auf, in denen sich Harz befindet. Bei einer physischen Verletzung der Kanäle tritt sofort das unter Druck stehende Harz aus und drängt den eventuellen Eindringling zurück. Diese zähflüssige Substanz polymerisiert und oxidiert an der Luft zu einer

hochviskosen Masse, bis sie schließlich erstarrt. Bei diesem Vorgang kann es den Eindringling einschließen und festhalten. Das erstarrte Harz bildet des Weiteren einen hochwirksamen mikrobiziden Wundverschluss [1, 5]. Einige Bestandteile des Harzes sind darüber hinaus toxisch für die unterschiedlichen Stadien der Borkenkäfer [6]. Zwei wichtige Bestandteile des Harzes bilden die Stoffklassen Terpene und Phenole.

Die Terpene oder Terpenoide werden nach der Anzahl ihrer C₅-Einheiten in verschiedene Gruppen eingeteilt. Diese Gruppen erstrecken sich von Hemiterpenen (eine C₅-Einheit) bis hin zu Polyterpenen (≥500 C₅-Einheiten). In diesem Versuch wurde sich auf drei Gruppen

festgelegt, Mono-, Sequi- und Diterpene. In Abbildung 3 sind die Strukturen der drei verschiedenen Terpengruppen zu erkennen, welche die strukturelle Vielfalt aufweist.

Des Weiteren sind die zunehmenden C₅-Einheiten ersichtlich. Mit der Anzahl der C₅-Einheiten ändern sich auch die Eigenschaften der Terpenklassen. Diese drei Terpengruppen können zum Beispiel als Phytohormone,

Zellteilungshemmstoff und Fungizid wirken. Grundsätzlich sind es volatile Bestandteile des Harzes von Pflanzen der Ordnung der Koniferen [1, 8].

Die Terpenoide werden aus Isoprenbausteinen aufgebaut. Diese Isoprenbausteine werden in höheren Pflanzen auf zwei verschiedenen Stoffwechselwegen synthetisiert. Entweder cytoplasmatisch über den Acetat-Mevolat-Weg oder plastidär über den 1-Desoxy-D-xylulose-Weg. Beide Wege nutzen verschiedene Ausgangsstoffe. Entweder wird Acetyl-CoA oder Pyruvat verwendet. Darüber hinaus werden auch verschiedene Intermediate genutzt.

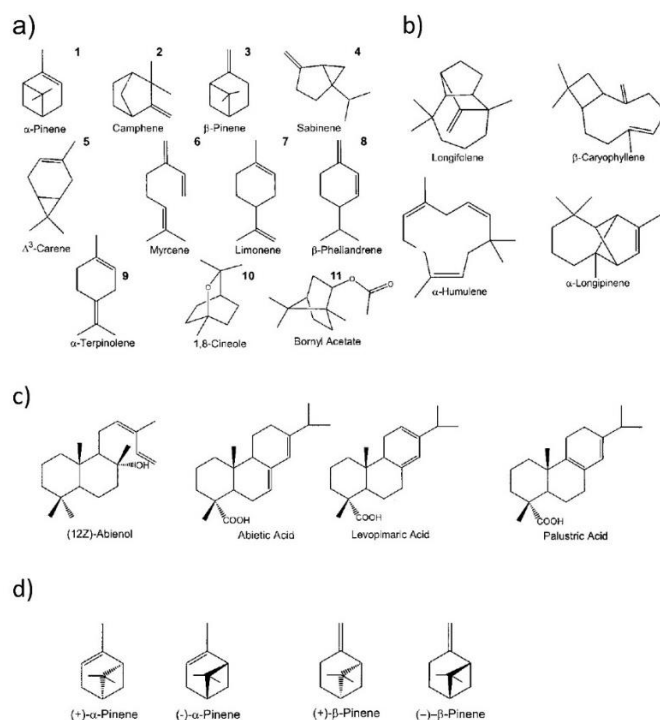


Abbildung 1: Terpene der *Picea abies*. a) und d) Monoterpene, b) Sesquiterpene und c) Diterpene. [7]

Die Grundbausteine der Terpene setzen sich aus Dimethylallyldiphosphat und seinen Isomeren Isopentenylidiphosphat zusammen. Aus diesen beiden Bausteinen entsteht durch Addition Geranylidiphosphat, welches die Vorstufe der Monoterpene bildet. Durch die Kopf-Schwanz-Addition

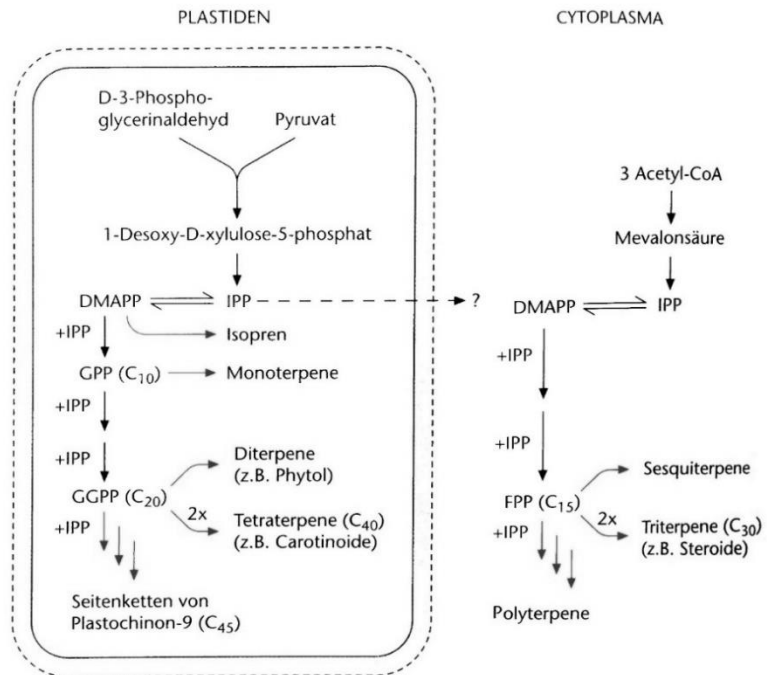


Abbildung 2: Terpenbiosynthese in Plasiden und Cytoplasma von Höheren Pflanzen [1]

entstehen weitere Vorläufer der Mono- Sequi- und Diterpene, wobei die Mono- und Diterpene in den Plastiden und die Sequiterpene in dem Cytoplasma synthetisiert werden. Diese Kopf-Schwanz-Additionen werden durch Isoprenyldiphosphat-Synthasen katalysiert [8]. Die Vorstufen für Sequiterpene bildet Farnesyldiephosphat und für die Diterpene Geranylgeranyldiphosphat. Höhere Gruppen wie Tri- oder Tetraterpene entstehen durch Schwanz-Schwanz-Addition von zwei Molekülen Farnesyldiephosphat oder Geranylgeranyldiphosphat GPP. Die Vorläufer der Tetraterpene und Phytoen entstehen ebenfalls durch Schwanz-Schwanz-Addition von Geranylgeranyldiphosphat [1]. Diese Additionsreaktion wird durch Terpensynthasen katalysiert [8].

Phenole bestehen aus mindestens einen aromatischen Ring der eine Hydroxylgruppe als Substituent aufweist. Sie können über verschiedene Stoffwechselwege synthetisiert werden. Einer der bekanntesten ist der Shikimatweg, welcher sehr vereinfacht in Abbildung 3 dargestellt wird. Bei diesem werden die Kohlehydratvorstufen Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat als Ausgangsstoffe genutzt. Diese werden über die Enzyme 3-Desoxyarabinoheptulosäure-7-phosphat-Synthase, Dehydrochinat-Synthase, Dehydrochinat-Dehydrase und der Shikimat-Dehydrogenase zu dem namensgebenden Shikimat umgewandelt. Am Ende dieses Stoffwechselweges stehen die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin. Ein weiterer bekannter Stoffwechselweg ist der Acetat-Malonat-Weg [1, 5].

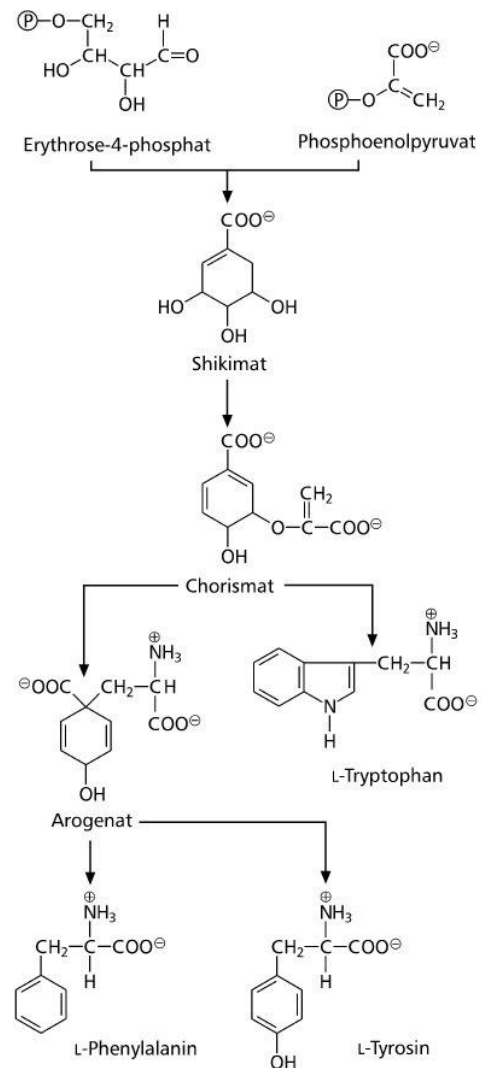


Abbildung 3: Shikimatweg [9]

1.2 Zielstellung

In diesem Versuch sollen die Verteidigungsmechanismen der gemeinen Fichte (*Picea abies*) untersucht werden. Es wurde sich dabei auf die chemischen Verbindungen von Terpene und Phenolen fokussiert welche zur Abwehr von Schädlingen beitragen. Diese Stoffe haben allgemein einen Einfluss auf Herbivoren, da sie als Fungizid und Zellteilungshemmstoff fungieren. Dabei soll nach neuen chemischen Verbindungen bzw. Muster von Verbindungen gesucht werden, welche das Verteidigungsverhalten von Fichten gegenüber Borkenkäfern und den mit eingetragenen Blaufäulepilz widerspiegeln. Dies wird anhand von Proben von Fichten mit unterschiedlicher Befallsgeschichte aus verschiedenen Standorten erfolgen. Es wird nach qualitativen und quantitativen Unterschieden gesucht. Es soll festgestellt werden ob Abweichungen in der Abwehrreaktion der Fichten mit unterschiedlicher Befallsgeschichte auftritt.

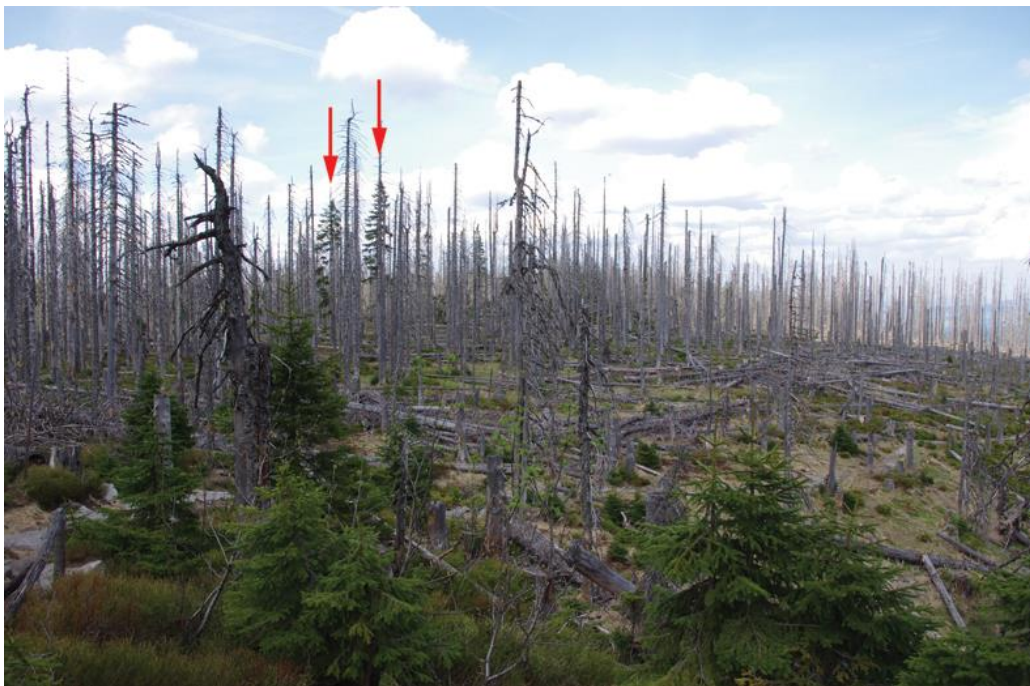


Abbildung 4: Nationalpark Böhmerwald im Mai 2012, nach einer Invasion der Borkenkäfer im Jahr 2007 befinden sich noch einzelne resistente Fichten in dem Waldgebiet.

2 Material und Methoden

2.1 Proben Vorbereitung

2.1.1 Probenentnahme

Die Proben stammen von Fichten aus dem Böhmerwald und den Kalkalpen. Bei allen Fichten wurden Proben von Rinde einschließlich des Kambiums genommen. Diese waren circa 2 x 10 cm groß und befanden sich in einer Meter Höhe. Auf der gegenüberliegenden Seite des Baumes wurde mittels Korkbohrer ein Loch von circa 0,5 Zentimeter Durchmesser durch Rinde und Kambium gestochen. In dieses Loch wurde zur Inokulation ein Agarpfropfen mit dem Blaufäulepilz *Ceratocystis polonica* gegeben und anschließend durch wieder einsetzen des Borkenstückes versiegelt. Nach 14-tägiger Inokulation wurde auch hier eine Probe von Rinde einschließlich des Kambiums nach den gleichen Vorgaben genommen.

2.1.2 Proben Aufbereitung

Bei den Proben handelte es sich um Stücke von Borke und Kambium, die in einer Meter Höhe am Baum entnommen wurden. Die Proben waren circa 10 cm lang und 2,5 cm breit. Da die zu extrahierenden Verbindungen leicht flüchtig sind, mussten die Proben permanent gekühlt bleiben. Die Kühlung der Proben wurde durch Trockeneis und flüssigen Stickstoff gewährleistet. Die Proben wurden als Erstes auf ihre Schichtdicken, Höhe und Breite vermessen sowie vorhandene Harzrückstände geprüft. Die gemessenen Daten sind tabellarisch festgehalten wurden. Anschließend wurden alle Proben auf eine einheitliche Größe von sieben Zentimeter reduziert. Die Proben wurden dann mittels Mörser und Stößel in flüssigem Stickstoff zermahlen. Nachdem die Proben zermahlen waren, wurden sie in ein stickstoffgekühltes Probenröhrchen überführt und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.1.3 Terpenextraktion

Als Erstes musste das Leergewicht der zu verwendeten Glasgefäße mittels Feinwaage bestimmt werden. Dabei wurden die Gefäße mittels Trockeneis gekühlt. Anschließend wurden 100 mg der gemörserten Proben in jedes Glasgefäß mit einem gekühlten Spatel überführt. Alle abgewogenen Proben plus 6 leere Glasgefäße wurden mit 1 ml Puffer mittels Dispenser befüllt und anschließend erneut mit einer Feinwaage gewogen. Der Puffer setzt sich aus Tertiärer Butylmethylether und den beiden Standards für Mono-, Sesquiterpene (1,9 Decadien) und den Diterpenen (Dichloro Dehydroabietinsäure) zusammen. Danach wurden die Proben für 20 h auf einem Horizontalschüttler geschüttelt. Durch das Schütteln wurden die Terpene vollständig aus dem Probenmaterial extrahiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 5200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer Pasteurpipette abgenommen und in kleine Glasgefäße für die Analyse der Mono- und Sesquiterpene überführt. Aus diesem abgenommenen Überstand wurden 200 bis 400 µl abgenommen und in ein weiteres kleines Glasgefäß gegeben, welches für die Diterpenanalyse verwendet wird. In die Proben für die Diterpene wurden je nach Menge 25 oder 50 µl N-trimethylsulfoniumhydroxid gegeben und für zwei Stunden methyliert. Anschließend konnten alle Proben für Mono- und Sesquiterpenanalyse sowie für die Diterpenanalyse mittels gaschromatographischer Methoden genutzt werden.

2.1.4 Phenolextraktion

Zur Phenolextraktion wurde ein Teil der gemörserten Proben in 2 ml Reaktionsgefäße gefüllt und anschließend über Nacht lyophilisiert. Aus dem Lyophilisat wurden 80 mg in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend gewogen. Danach wurde mittels einer Pipette 1,2 ml interner Standard hinzugegeben. Dieser Standard setzte sich aus Chlorogensäure (1 µl/ml) und Methanol zusammen. Anschließend wurde das Gemisch kurz kräftig geschüttelt und danach für vier Stunden auf einem Horizontalschüttler bei 160 rpm und 4 °C geschüttelt. Nach dem Vermischen wurden die Proben für 10 min bei 16.000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und in eine Glasgefäß überführt. Auf dem Rückstand

wurden 800 ml Methanol gegeben und über Nacht auf den Horizontalschüttler bei 160 rpm und 4 °C geschüttelt. Der entnommene Überstand wurde über Nacht mittels Stickstoffrockner bei 40 °C und 5 bar getrocknet. Der Überstand (800 µl) der Reaktionsgefäße vom Horizontalschüttler wurde in die Glasgefäße mit dem getrockneten Überstand pipettiert und anschließend durch schütteln homogenisiert. Danach wurden die gewonnen extrahierten Verbindungen mittels LCMS mit UV-Detektor analysiert.

2.2 Proben Analyse

2.2.1 Terpenanalyse

Die Analyse wurde für die Mono- und Sesquiterpene sowie für Diterpene zuerst auf der GC-MS und anschließen auf der GC-FID durchgeführt. Die GC-MS wurde zur Identifikation der einzelnen Stoffe verwendet, welche durch ihre verschiedenen Massen erkannt werden konnten. Die GC-FID ist zur quantitativen Ermittlung der Stoffmenge verwendet wurden. Nach verschiedenen Optimierungs- und Testläufen hob sich eine Methode heraus. Diese Methode konnte an beiden Geräten verwendet werden, des Weiteren wurde auch eine neue Säule eingebaut und ebenfalls in beiden Geräten verwendet.

Die Proben wurden bei dieser Methode mit 1 µl in den Verdampfer, welcher 270 °C hatte, eingespritzt. Sie wurde nicht aufgespalten (Splitfrei). Danach wurde die Temperatur auf 40 °C für 3 min gehalten und anschließend um 5 °C/min auf 80 °C kontinuierlich erhöht. In der nächsten Phase wurde der Anstieg auf 3 °C pro Minute reduziert, bis 200 °C erreicht waren. Nach diesem Abschnitt konnte die Temperatur auf 280 °C mit einem Anstieg von 60 °C/min erhöht werden. Diese letzte Phase hielt 4 min bei 280 °C an, um sämtliche Rückstände aus der Säule zu entfernen und sie für die nächsten Läufe möglichst rückstandsfrei zu halten.

Bei den Diterpenen wurde eine sehr ähnliche Methode verwendet. Unterschieden hat sich nur die Anfangstemperatur. Diese lag bei 80 °C, da diese Terpene durch einen höheren Siedepunkt erst bei höheren Temperaturen in die Gasphase übergehen.

2.2.2 Phenolanalyse

Für die Analyse der phenolischen Komponenten mussten zuerst alle gewonnenen Extrakte 1/100 mit Methanol verdünnt werden. Des Weiteren wurde eine Standardkurve für Astringin und Catechin mittels einer linearen Verdünnungsreihe erstellt, um anschließend eine Aussage über die Menge der Phenole in den Proben zu erhalten. Die Proben wurden mit der LC-MS analysiert, wo sie bei einem konstanten Gradienten und zwei Phasen Gemisch (Wasser-Methanol) getrennt wurden. Durch einen Quadropole wurde die Ionentrennung erreicht. Die daraus gewonnen Peaks wurden manuell integriert, um weiter bearbeitet werden zu können.

2.3 Proben Auswertung

2.3.1 Auswertung der Proben für die Phenole

Bei den Proben für die phenolischen Verbindungen wurden die Peaks der einzelnen Läufe alle manuell integriert. Diese Integration wurde mit dem Programm Analyst 1.5 durchgeführt und in eine Excel-Tabelle überführt. Die Bestimmung ist dabei über eine eigens erstellte Datenbank anhand der Retentionszeiten erstellt wurden.

2.3.2 Auswertung der Proben für die Terpene

Zur Auswertung der der gesammelten Datenmengen wurde ein speziell für diesen Zweck programmierte Anwendung verwendet. Dieses Anwendung (Datatrans) ist dafür bestimmt, die angefallenen Daten aus den einzelnen Läufen auf der GCMS oder GCFID miteinander zu vergleichen. Darüber hinaus hat die Anwendung eine Excel-Datei erzeugt, in welcher die Ergebnisse in einer geordneten Reihenfolge wiedergab. Um das zu erreichen wurde eine Excel-Datei erzeugt. Hierbei mussten die Integrationsparameter für das Programm richtig eingestellt werden. Dabei handelt es sich um Parameter welche Einfluss auf die kleinstmögliche Peakhöhe sowie Start- und Endpunkte der Peakflächen haben. Die so erzeugten Excel-Tabellen wurden nochmals händig überarbeitet, um Verschiebungen der Retentionszeiten zu korrigieren. Als nächsten

Schritt wurden die Stoffe mittels MSD Chemstation Data Analysis Applikation identifiziert. Hierfür wurden die Datenbanken Wiley (90 %), NIST (70 %) und Adams (< 70 %) verwendet. Die Identifikation der Stoffe wurde erst bei einer Genauigkeit von über 95 % akzeptiert.

Zur übersichtlicheren Darstellung wurden Peaks mit zu geringer Intensität aus der weiteren Betrachtung ausgeschlossen.

3 Ergebnisse

Die Proben stammen aus verschiedenen Standorten die in einer Umgebung liegen. Sie werden in Böhmerwald, Kalkalpen Standort 1 und 2 sowie Kalkalpen Kontrollen eingeteilt. Die Kontrollen stammen aus einem Gebiet, das noch nicht von Borkenkäfern befallen ist und dienen als Vergleichsproben.

3.1 Terpene

Die Terpene steigen innerhalb der drei Gruppen analog zueinander an. Eine quantitative Erhöhung um das Drei- bis Vierfache des Grundgehaltes an Terpenen zum Zeitpunkt Tag 0 im Vergleich zum Tag 14 ist überall ersichtlich. Die Proben aus dem Kalkalpen Standort 2 unterscheiden sich von den anderen Proben durch einen geringeren Gesamtgehalt am Tag 14. Des Weiteren sind im Gesamtbild betrachtet Unterschiede im Gehalt vor der Inokulation (Tag 0) bei den verschiedenen Standorten zueinander ersichtlich.

3.1.1 Monoterpene

In der Auswertung ist deutlich zu erkennen, dass nach der Inokulation der Fichte die Terpenkonzentration stark ansteigt, das ist bei den Monoterpenen Beispielhaft für die gesamten Terpene. Die Stoffe α -Pinen und β -Pinen nehmen dabei den größten Bereich ein. Ihr Gehalt steigt bis auf das Vierfache der Ausgangskonzentration. Die Stoffe β -Phellandren, Mycren und Camphen steigen ebenfalls um das Drei- bis Vierfache nach der Inokulation. Jedoch sind sie in ihrem Gehalt schwächer ausgeprägt als α -Pinen und β -Pinen.

Innerhalb der Zusammensetzung ergibt sich kein qualitativer Unterschied zwischen den verschiedenen Standorten. Einige der Verbindungen sind erst nach der Inokulation sichtbar, da sie im Gehalt wahrscheinlich unter der Detektionsgrenze dieser Methoden lagen. Ersichtlich ist, dass die Ausgangskonzentration der Monoterpene bei dem Standort des Böhmerwaldes ungefähr 70 % höher ist als bei den anderen Standorten. Dies liegt hauptsächlich an den erhöhten Werten für α -Pinen und β -Pinen, welche

Doppelt so hoch wie in den anderen Standorten sind. Die Proben aus dem Standort Kalkalpen 2 weisen eine deutlich verringerte Endkonzentration im Vergleich mit den restlichen Standorten auf. Alle Verbindungen steigen hier um Ein bis Zwei Größenordnungen weniger an. Das bedeutet konkret α -Pinen, β -Pinen, Camphen und β -Phellandren steigen um das Dreifache und Myrcen um das Doppelte.

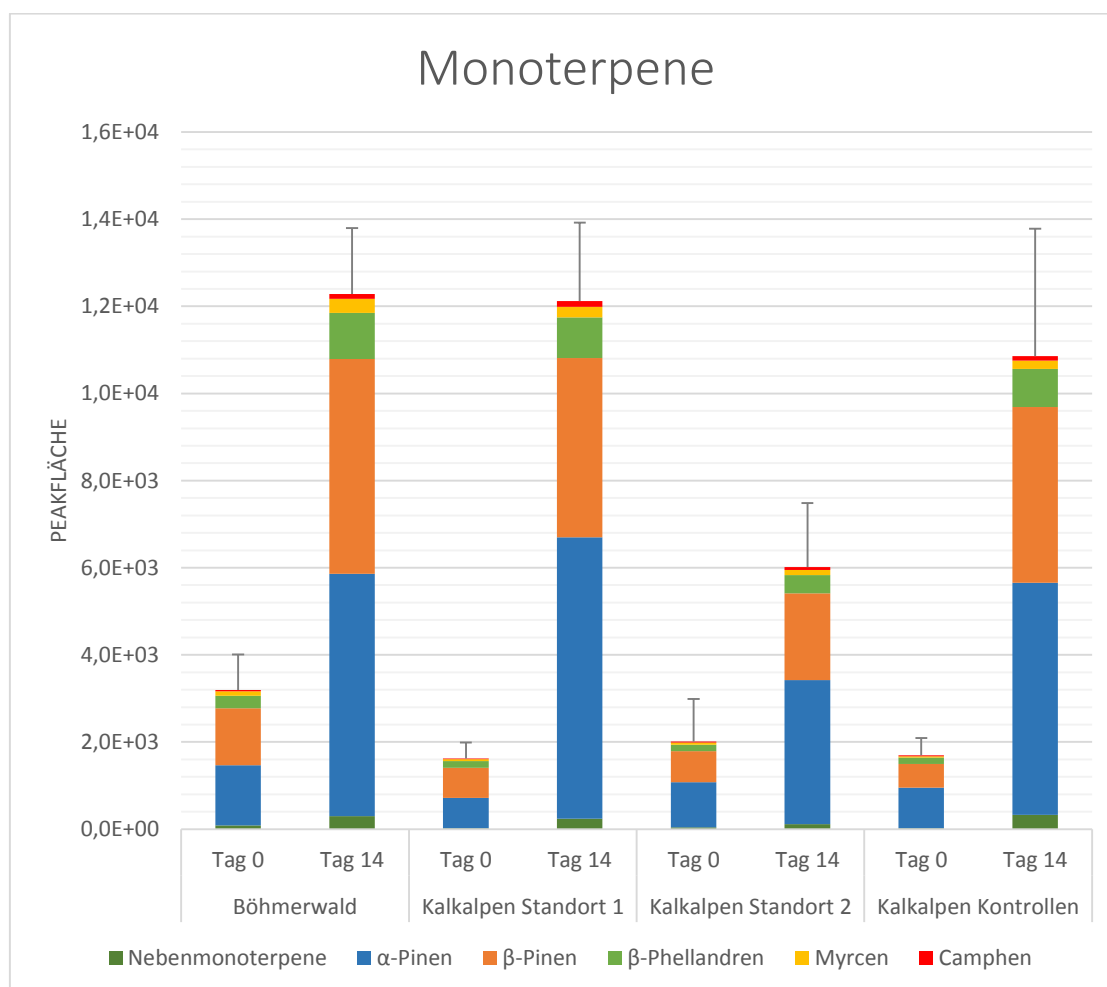


Abbildung 5: Monoterpene der *Picea abies*

Das Bild der Hauptmonoterpene spiegelt sich ähnlich bei den Nebenmonoterpenen wieder. Bei den Nebenmonoterpenen ist der qualitative Unterschied vor und nach der Inokulation deutlich sichtbar. So zum Beispiel bei Bicyclohexan welches erst nach der Inokulation detektierbar ist. Des Weiteren sind die Stoffe δ -3-Caren und Ocimen hervorzuheben welche bei den Kontrollen um das Doppelte im Vergleich zu den restlichen Standorten gestiegen sind. Darüber hinaus sind alle anderen Verbindungen bis auf das Fünffache gestiegen. Es ist jedoch zu beachten das der Gehalt hier wesentlich geringer ist als bei den Hauptmonoterpenen. Eine erhöhte Ausgangskonzentration der Verbindungen bei dem Standort Böhmerwald ist auch bei

den Nebenmonoterpenen ersichtlich. Bemerkenswert ist die geringe Erhöhung der Konzentration an Nebenmonoterpenen innerhalb der Inokulationszeit bei dem Standort Kalkalpen 2. Das spiegelt das gleiche Verhalten wie bei den Hauptmonoterpenen wieder.

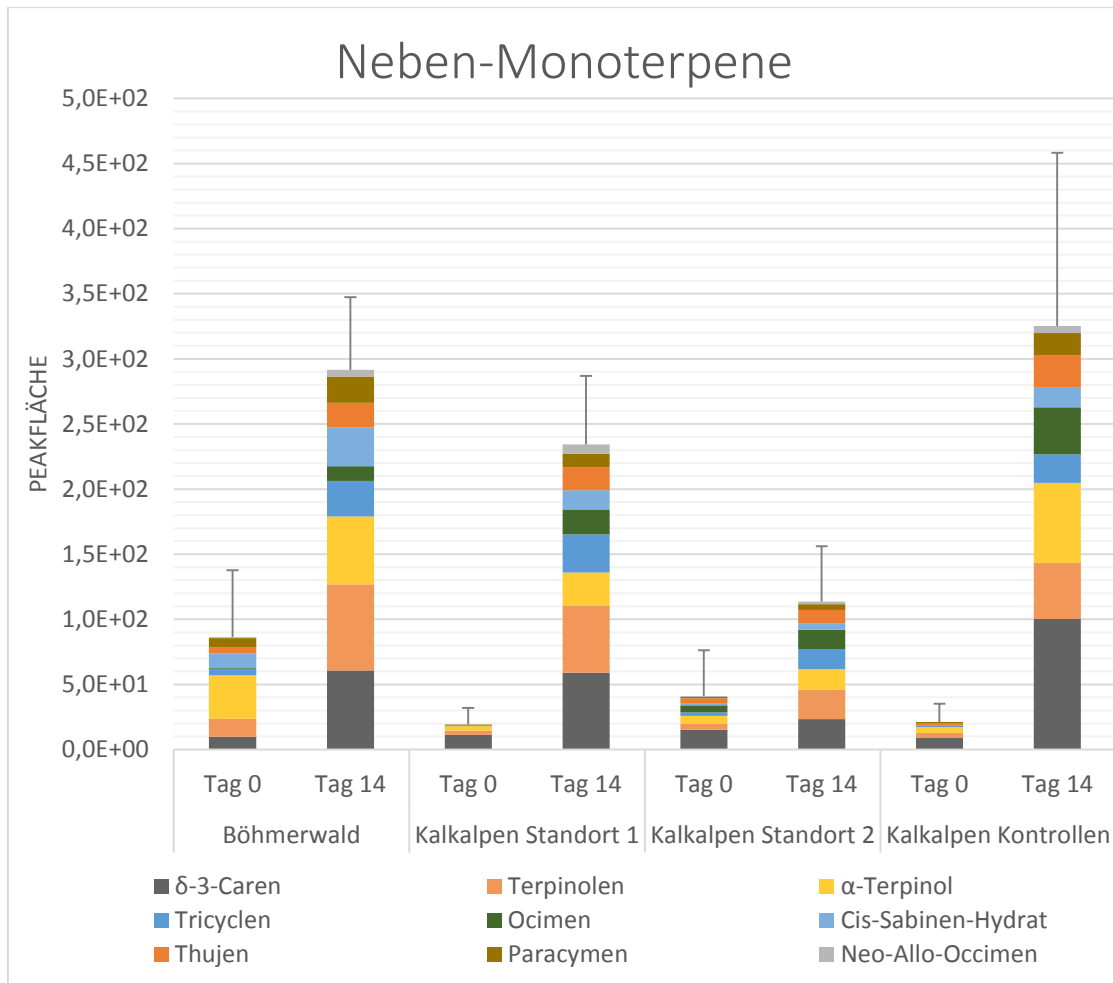


Abbildung 6: Nebenmonoterpene der *Picea abies*

3.1.2 Sesquiterpene

Die Sesquiterpene erreichen die Hälfte des Gesamtgehaltes der Monoterpene. Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, steigen die Sesquiterpene quantitativ an. Der Gehalt von Germacren-D und β -Sequiphellandren steigt in den Proben vom Böhmerwald und Kalkalpen 1 um das Fünffache im Vergleich zum Tag 0 an. Bei den Kalkalpen Standort

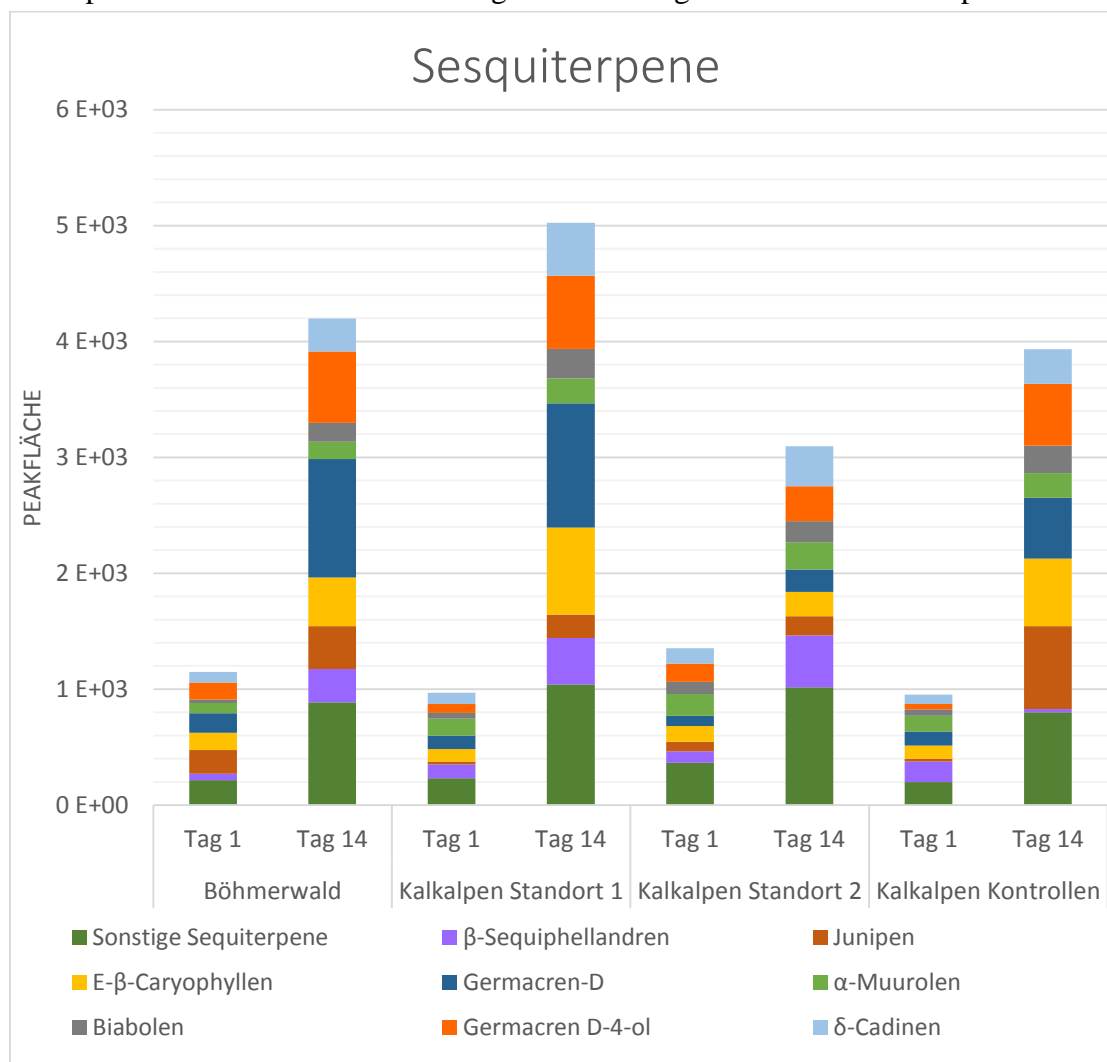


Abbildung 7: Sesquiterpene der *Picea abies*

2 steigt β -Sequiphellandren ebenfalls um das Fünffache, jedoch erhöht sich Germacren-D nur unwesentlich um das Doppelte. Bei den Kontrollen ist sogar ein Rückgang des Stoffes β -Sequiphellandren zu verzeichnen. Im Gegenzug erhöht sich hier Junipen um fast das Dreißigfache. Darüber hinaus steigen die restlichen Bestandteile um das Zwei- bis Dreifache. Ersichtlich ist auch das bei den Kalkalpen Standort 2 und den Kontrollen ein geringerer Gesamtgehalt als bei den beiden anderen Standorten gebildet wurden.

3.1.3 Diterpene

Bei den Diterpenen ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei den beiden anderen Terpenklassen, es ist eine quantitative Erhöhung zu erkennen. Die Levopimarsäure bildet den größten Anteil bemessen an dem Gesamtgehalt und in der Erhöhung zu den beiden Zeiten. Die restlichen Diterpene erhöhen sich um das Doppelte beziehungsweise Dreifache. Der Kalkalpen Standort 2 weist erneut eine niedrigere Erhöhung der Stoffe auf wie bei den beiden anderen Terpengruppen. Die qualitative Zusammensetzung der Stoffe bleibt bei den verschiedenen Standorten identisch. Die Erhöhung der sonstigen Diterpene ist mit 30 % verschwindend gering.

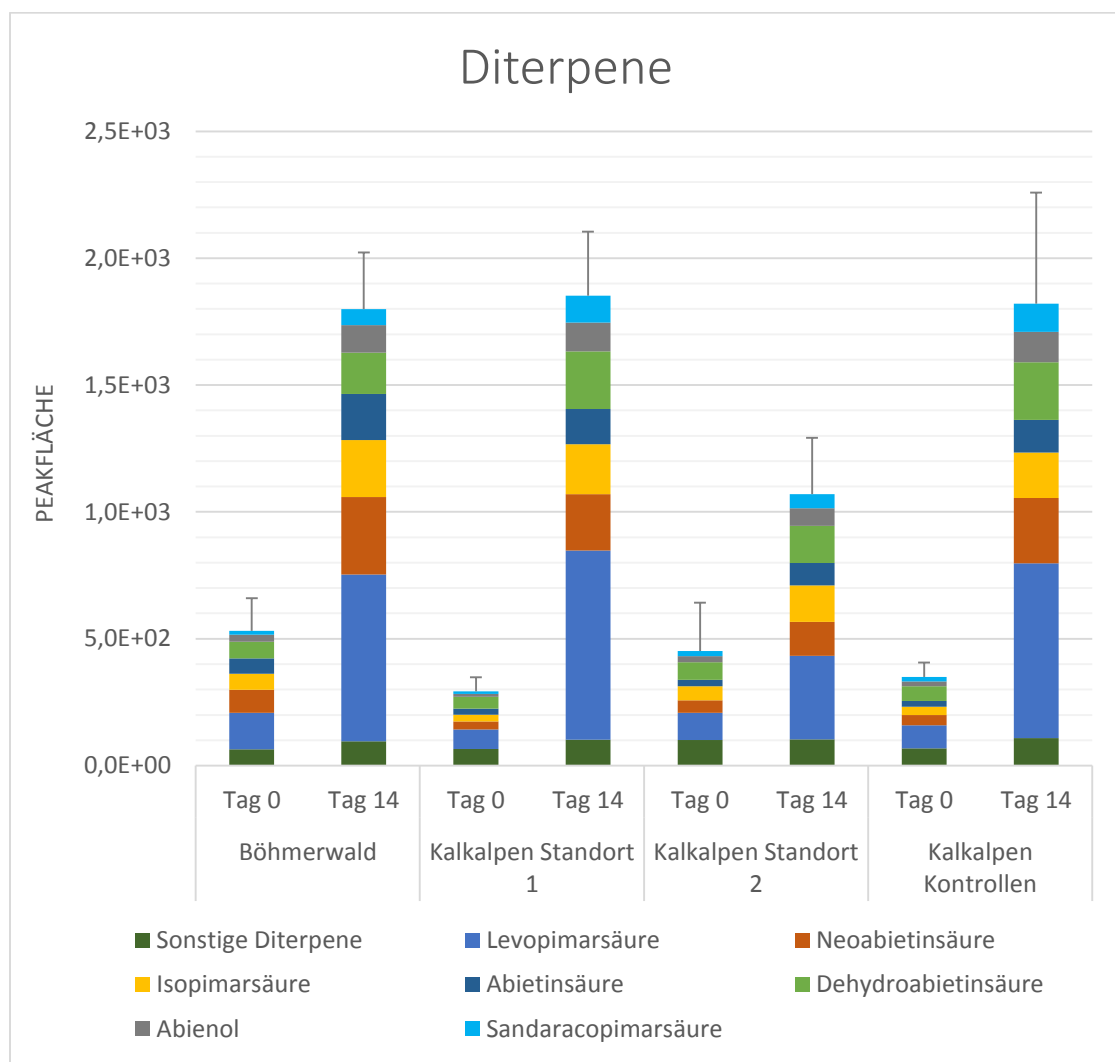


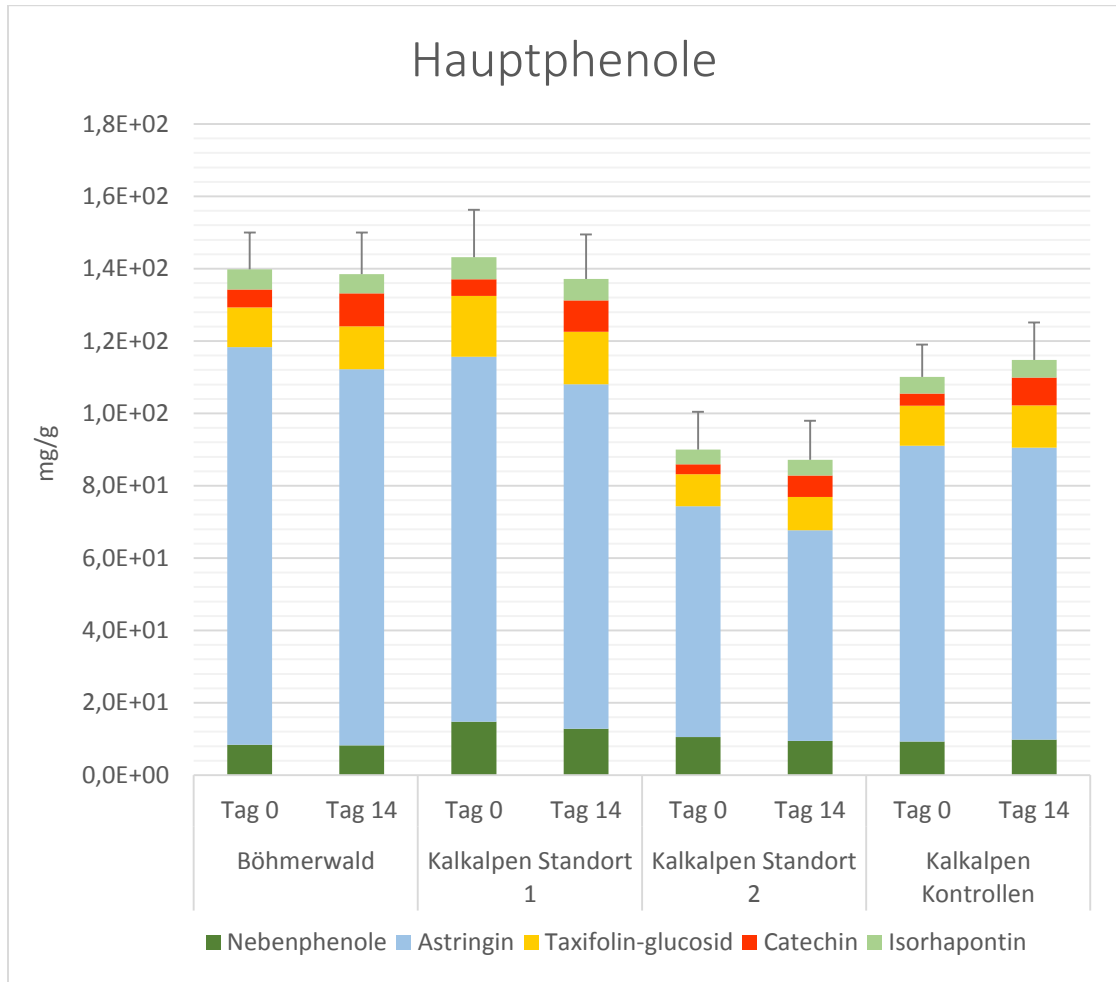
Abbildung 8: Diterpene der *Picea abies*

3.2 Phenole

Die phenolischen Verbindungen ergeben ein sehr abweichendes Bild im Vergleich zu den Terpenen. Sie weisen weder qualitative noch quantitative Unterschiede vor und nach der Inokulation auf. Es sind geringe Unterschiede im Gesamtgehalt zwischen den einzelnen Standorten offensichtlich. Hierbei sind bei den Hauptphenolen wieder der Kalkalpen Standort 2 und bei den Nebenphenolen der Standort Böhmerwald zu bemerken.

3.2.1 Hauptphenole

Bei den Hauptphenolen ist deutlich zu erkennen, dass der Hauptanteil von Astringin getragen wird, wie in Abbildung 9 ersichtlich ist. Danach folgen Taxifolin-glucosid, Catechin und Isorhapontin. Einen charakteristischen Anstieg bzw. Abfall bestimmter Phenole oder gar der gesamten Hauptphenole ist nicht ersichtlich. Ein minimaler Abfall der Gesamtmenge an Phenolen ist bei allen Proben außer der Kontrollen zu erkennen. Es ist jedoch ein eindeutiger Unterschied zwischen den einzelnen Standorten zu erkennen. Bei den Standorten Böhmerwald und Kalkalpen 1 ist die Menge der gesamten Hauptphenole identisch. Die Menge an Phenolen in den Proben vom Kalkalpen Standort 2 und den Kontrollen sind jedoch deutlich niedriger in ihrer Gesamtkonzentration als die Proben vom Böhmerwald und den Kalkalpen Standort 1.

Abbildung 9: Hauptphenole der *Picea abies*

Es ist eine leichte Veränderung der Zusammensetzung zu beobachten. Die Menge an Catechin steigt teilweise um das Doppelte wobei Astringin dabei um den Teil abnimmt.

3.2.2 Nebenphenole

In Abbildung 10 sind die phenolischen Verbindungen abgebildet, welche in geringerer Konzentration in der Fichte enthalten sind. Bei den Proben aus dem Böhmerwald sind keine Veränderungen ersichtlich, weder in der Zusammensetzung noch in der Menge an Phenolen. Bei den Proben vom Kalkalpen Standort 1 und 2 ist deutlich zu erkennen, dass die Gesamtmenge an Nebenphenolen abnimmt. Die Nebenphenole bestehen aus Quercetinen, Piceid, Proanthocyanidin B1 und Taxifolin. Dies ist hauptsächlich in der Abnahme von den beiden Glykosiden begründet. Bei den Kontrollproben ist ein minimaler Anstieg der Gesamtmenge zu erkennen.

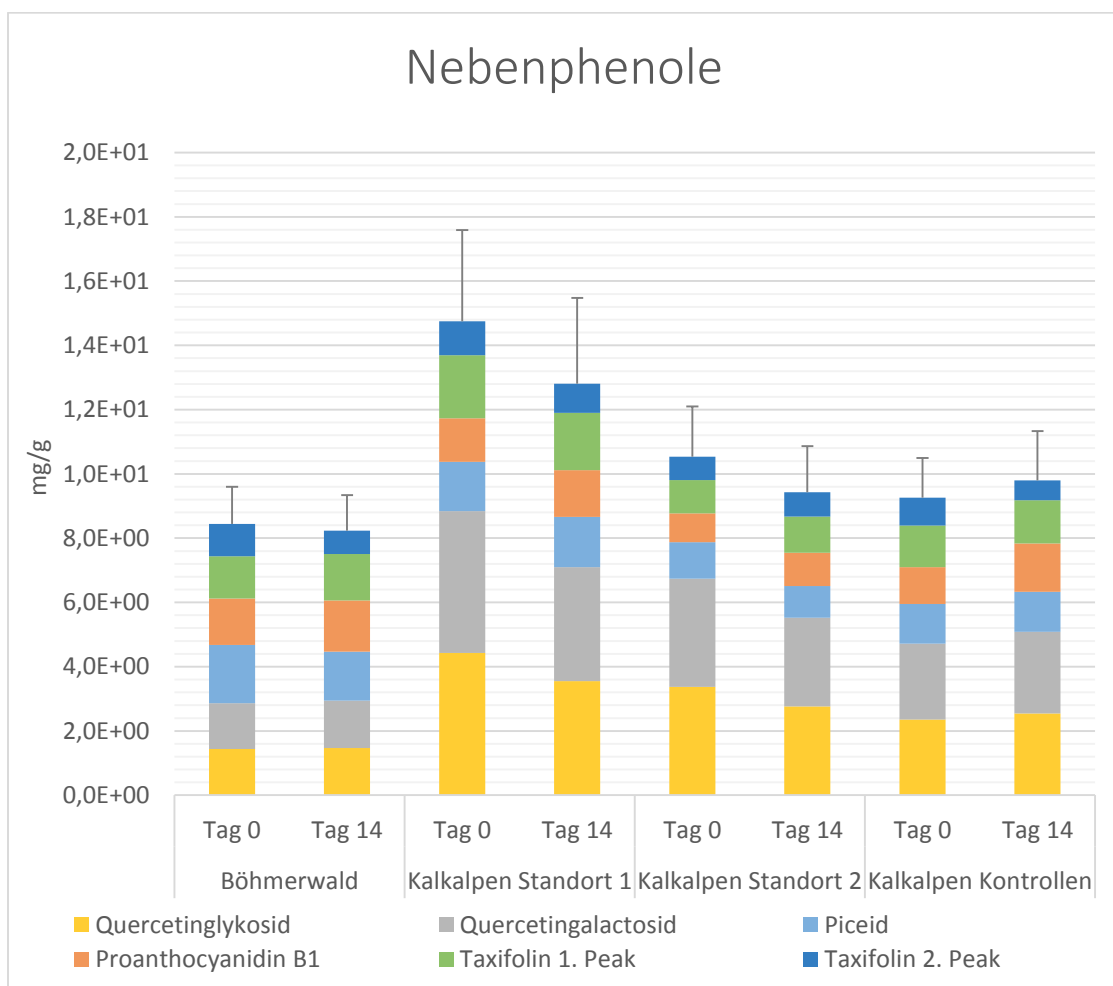


Abbildung 10: Nebenphenole der *Picea abies*

4 Diskussion

Die Fichte (*Picea abies*) wurde gewählt da sie einer der verbreitetsten Bäume in unseren Breitengraden ist. Es ist auch schon aus verschiedenen Versuchen bekannt das sie auf den Blaufäulepilz (*Ceratocystis polonica*) mit Erhöhung des Terpengehaltes reagiert [4]. Bei diesen Studien ist eine sehr identische Vorgehensweise erfolgt. Bei vergleichbaren Untersuchungen ist die Zeitspanne länger (bis zu zwei Monaten) als bei den hier durchgeführten Versuch. Die unterschiedliche Dauer der Inokulation kann Auswirkung auf den Terpengehalt haben und so nicht direkt verglichen werden. Des Weiteren sind die Angaben in den Versuchen in einer Konzentration auf das Trockengewicht bezogen und bei dem vorliegenden Bericht werden die gemessenen Peakflächen bei den Terpenen betrachtet.

Wenn man sich die Monoterpene betrachtet, ist auffällig das die Proben von dem Standort Böhmerwald, welche als resistent angesehen werden, einen erhöhten Anfangsgehalt an Terpenen gegenüber den Kalkalpen sowie den Kontrollen aufweisen. Das ist an Verbindungen wie Pinen, Phellandren und Mycren gut erkennbar. Das könnte darauf hinweisen das in diesen Bäumen noch eingelagerte Sekundärmetaboliten aus dem früheren Befall vorhanden sind.

Bei den Versuchen von Martin [7] und Zhao [10] steigt der Gehalt von α -Pinen, β -Pinen, β -Phellandren, und Camphen ebenfalls deutlich an (auf das 2,5- bis 4-fache bei Martin und auf das bis zu 10-fache bei Zhao). Mycren bildet bei ähnlichen Versuchen nur bei Zhao [10] einen deutlichen Anstieg. Es ist zu erkennen, dass bei den vergleichbaren Versuchen ein deutlich höherer Anstieg der Monoterpene stattfindet. Das ist in der längeren Inokulationszeit zu begründen.

Bei den Neben-Monoterpenen sind im Vergleich zur vorhandenen Literatur einige Unterschiede auffällig. Es sind nicht alle gefundenen Stoffe aus diesen Versuch in den ähnlichen Experimenten zu finden. Dabei handelt es sich um Ocimene und Paracymen. Dieser Unterschied kann in der falschen Detektion der Peaks begründet sein. Da es schwieriger ist kleine und dicht aufeinander folgende Peaks ordentlich zu identifizieren.

Zum Vergleich der Sequiterpene wurden wieder die selben Versuche verwendet. Bei den Sequiterpenen sind jedoch nur wenigste Stoffe identisch. Hierbei handelt es sich um Germacren-D und Germacren-D-4-ol. Wie bei Zhao [10] auch zu erkennen ist steigt

Germacren-D mehr als Germacren-D-4-ol. Darüber hinaus ist ebenfalls Germacren-D Stoff mit dem höchsten Gehalt beziehungsweise der höchsten Konzentration.

Die Diterpene werden nach dem gleichen Prinzip mit den beiden Versuchen verglichen. Jedoch kann hier nur Abienol verglichen werden, da alle anderen Stoffe bei der Vergleichsliteratur nicht enthalten sind. Teilweise sind Stoffe nicht identifiziert wurden. Bei Abienol zeichnet sich auch wieder ab das im Vergleich ein wesentlich höherer Anstieg stattfindet als in dem durchgeführten Versuch. Dies ist jedoch auf schon genannte Gründe wie längere Inokulationszeit zurückzuführen.

Die Reaktion der Fichte mit den phenolischen Verbindungen konnten mit dem Versuch von Lieutier [11] verglichen werden. Hier beträgt die Inokulationszeit zehn Tage. Die Angaben sind in Konzentration je Gramm Trockengewicht und können mit den Daten aus dem Versuch direkt verglichen werden. Jedoch wurden bei dem Versuch nicht viele phenolische Verbindungen untersucht. So das der Vergleich nur von Piceid, Astringin und Catechin erfolgte.

Bei Piceid ergibt sich ein sehr ähnliches Verhalten der beiden Versuche (Abfall um etwa 15 %). Astringin hingegen steigt bei dem Vergleichsversuch um etwa 15 % an, in dem vorliegenden Versuch fällt es jedoch um durchschnittlich 5 % ab. Catechin steigt im Versuch von Lieutier [11] um 35 % an. Im Vergleich dazu steigt es in diesem Versuch um das mehr als das Doppelte (85 %) an. Der erhöhte Anstieg bei dem vorliegenden Versuch von Catechin könnte darauf hinweisen das die Synthetisierung dieses Stoffes mehr Zeit benötigt. Da bei der Vergleichsliteratur die Proben der Fichten vier Tage früher genommen wurden.

Es ist davon auszugehen das die phenolischen und terpenoiden Verbindungen, die von der Fichte aufgrund der Inokulation mit dem Blaufäulepilz synthetisiert, der Verteidigung gegen diesen dienen. Weiter ist davon auszugehen das diese Stoffe ebenfalls ein Abwehrverhalten der Fichte gegenüber dem Borkenkäfer aufweisen, da dieser immer mit dem Blaufäulepilz assoziiert wird. Deswegen kann nicht genau bestimmt werden welche Verbindung auf welchen Herbivor Einfluss nimmt.

Monoterpene haben eine toxische Wirkung auf die Eier, Larven und Adulten der Borkenkäfer [6]. Sie müssen einen hohen Einfluss bei der Verteidigung aufweisen, da sie mit Abstand den höchsten Gehalt innerhalb der untersuchten Terpene besitzen.

Bekannt ist das die Diterpene als Phytohormon, Fungizid und Zellteilungshemmstoff wirken [1]. Die Letzteren würden beide Herbivoren direkt stark beeinträchtigen. Die Phytohormone nehmen indirekten Einfluss auf die Herbivoren. Sie können die Bildung von sekundären Harzkanälen und eine verstärkte Ligninablagerung induzieren [12, 13]. Das würde auch ihren Anstieg nach der Inokulation um das Zwei- bis Dreifache begründen.

Sequiterpene wirken ebenfalls als Phytohormon und als Phytoalexin (antimikrobiell wirkende Verbindungen).

Bei einen Vergleich der Standorte mit den Kontrollen lassen sich nur wenige Unterschiede feststellen. Die Fichten aus dem Böhmerwald haben offensichtlich nur bei den Monoterpenen einen höheren Gehalt am Tag 0. Welche sich mit der Einlagerung der Sekundärmetabolite von dem Borkenkäferbefall 2007 erklären. Die Nebenphenole sind im Gegensatz dazu weniger und lassen darauf deuten, dass ihre Synthese verringert wurde. Dies könnte eine Reaktion sein um benötigte Ressourcen für die Synthese der Terpene zur Verfügung zu stellen. Bei einen Vergleich der Terpenlevel am Tag 14 ist ersichtlich das die eingelagerten Monoterpene (Tag 0) wesentlich niedriger sind als die am Tag 14 akkumulierten. Das begründet, warum der resistent zu scheinende Baum Terpene synthetisieren muss. Er kann das erhöhte Level zur Verteidigung anscheinend nicht permanent aufrecht erhalten, da dies höchst wahrscheinlich zu viele Ressourcen benötigen würde. Ein Vergleich mit der gegenwärtigen Literatur hierzu ist nicht möglich, da es keine vergleichbaren Versuche an scheinbar resistenten Fichten gibt.

Die verringerte Akkumulierung der Terpene bei den Kalkalpen Standort 2 im Vergleich zu den Kontrollen schein untypisch zu sein. Diese Fichten sind zur Probenahme einen Borkenkäferbefall ausgesetzt. Die niedrigen Werte am Tag 14 könnten auf einen Einbruch der Verteidigungsstrategien hindeuten. Was in den nicht mehr vorhanden Ressourcen, welche für die Synthetisierung notwendig sind, begründet sein kann.

Die beiden Proben vom Kalkalpen Standort 1 und 2 haben keine erhöhten Gehälter am Tag 0. Die Verteidigung mit terpenoiden Verbindungen scheint demzufolge eine lokale Verteidigung zu sein. Da die Bäume trotzdem eine Erhöhung der terpenoiden Substanzen bewirken.

Bei einen Blick auf die Nebenphenole ist die lineare Abnahme der Konzentration von Kalkalpen Standort 1 über 2 bis zu den Kontrollen ersichtlich. Wenn davon

ausgegangen wird das die Kontrollen den Normalwert darstellen, könnte die Abnahme die stetige Umlagerung von der Fichte zur Verfügung stehenden Ressourcen bedeuten. Da die Biosynthesewege der beiden Stoffklassen keine direkte Vernetzung besitzen ist die Umlagerung nur in einen breiter gefassten Zeitrahmen möglich.

Es ist zu beachten das einige Stoffe auf der GC-Säule zur gleichen Zeit eluieren und damit sehr schlecht zu selektieren sind. Dies ist in ihrer strukturellen Ähnlichkeit begründet. So ist beispielsweise bei den Monoterpenen der Stoff β -Phellandren eigentlich eine Zusammensetzung aus zwei Stoffen. Es handelt sich dabei um β -Phellandren und Limonen. Daraufhin ist die Auswertung für diese Stoffe nicht ordentlich zu bestimmen. Wie in Abbildung 11 zu erkennen sind die Strukturformeln der beiden Stoffe sehr identisch. Sie weisen beide zu ihren aromatischen Ring zwei Methylreste und eine Methylengruppe auf. Somit sind ihre funktionellen Gruppen identisch, was das Gleichzeitige eluieren bei der GC-Säule erklärt.

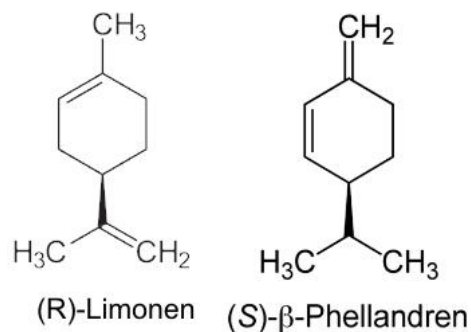


Abbildung 11: Strukturformel von Limonen und β -Phellandren

5 Zusammenfassung

Die Fichte (*Picea abies*) erfährt durch den Borkenkäfer (*Ips typographus*) und dem mit ihm assoziierten Blaufäulepilz (*Ceratocystis polonica*) beträchtliche ökologische und ökonomische Schäden. Sie reagiert auf die beiden Herbivoren mit verschiedenen Abwehrreaktionen. Jedoch sind nur wenige Fichten in der Lage, sich gegen einen starken Befall zu verteidigen. Diese als resistent erscheinenden Fichten wurden in dem Experiment mit verschiedenen Fichten bei ihrer Abwehrreaktion auf den Blaufäulepilz verglichen. Die untersuchten Fichten stammen aus unterschiedlichen Orten welche in etwa 200 Kilometer voneinander entfernt liegen. Sie bieten jedoch vergleichbare Bedingungen und stellen so verwandte Ausgangspunkte für die Untersuchung bereit. Unterschiedlich war die Befallsgeschichte der Fichten, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Befall und Synthese zu erreichen. Sie erstreckte sich von einem Befall vor mehreren Jahren über gerade befallen bis hin zu den Kontrollen welche ohne Befall sind hin. Aus der Untersuchung ist hervorgegangen, dass die Fichte auf die Inokulation mit dem Blaufäulepilz mit der erhöhten Ausschüttung von terpenoiden Verbindungen reagiert. Die phenolischen Verbindungen scheinen bei der Verteidigung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Synthese dieser wird teilweise verringert, was sehr gut an den Nebenphenolen erkennbar ist.

Zusammenfassen ist zu sagen, dass die Fichte auf den Blaufäulepilz und dem mit ihm assoziierten Borkenkäfer reagiert. Es ist aber kein konkreter Zusammenhang zwischen den resistent scheinenden Fichten und Anderen ersichtlich. Die Befallsgeschichte hat somit keinen Einfluss auf die Verteidigungsreaktion der Fichte. Es sind lediglich Spuren in Form von eingelagerten Sekundärmetaboliten zu erkennen.

Anhang

A) Puffer- / Standardzusammensetzung

- 300 ml Tertiärer Butylmethylether in einen 500 ml Glaskolben gegeben
- 14,2 mg Dichlorodehydroabieticacid in Glasgefäße abgewogen und mit Butylen gelöst
- 20 µl 1,9 Decadien hinzugegeben
- homogenisiert
- mit Pipette 1 Mischung zu Butyl hinzugegeben
- mit Pipette 2 Butyl zu Mischung hinzugegeben
- Mehrmals das Gefäß und die Pipette mit Butyl gespült
- Standardlösung noch mal geschüttelt

B) Natriumcyanoborhydrit-zusammensetzung

- 700 mg Natriumcyanoborhydrit mittels Feinwaage abgewogen
- 140 µl Methanol hinzugefügt
- durch schütteln homogenisiert

C) Chemikalienliste

Name	Reinheit	Hersteller
Ammonium-Carbonat	≥30%	Sigma-Aldrich
Trimethylsulfoniumhydroxide		Marchery-Nagel GmbH & Co KG
tert.-Butylmethylether	≥99.5%	Carl Roth GmbH & Co KG
Dichlorodehydroabieticacid	≥90%	Can Sym Chem Corp.
Sabinehydrate	97%	Sigma-Aldrich
1,9 Decadien	98%	Sigma-Aldrich
Methanol	99,8%	VWR Prolab
Natriumcyanoborhydrid		Merck Millipore
Catechin hydrate	≥96%	Sigma-Aldrich

D) Geräteliste

Gerätebezeichnung	Serie	Hersteller	Gerät
HS 250 basic		IKALABORTECHNIK	Horizontalschüttler
Laborfuge 200		Heraeus SEPATECH	Zentrifuge
GC-System	6890 Series	Agilent	Gaschromatograph
Mass Selective Detector	5973 Network	Agilent	Massenspektrometer
Auto Sampler	7683 Series	Agilent	Greifer
Injector	7683 Series	Agilent	Injektor
HP80		Hewlett Packard	Säule
BP211D		Sartorius	Feinwaage
vapo therm 1		Barkey	Trockentemperatursystem
esquire 6000		Bruker Daltoniks	Massenspektrometer
G1322A Degaser	Series 1100	Hewlett Packard	Entgaser
G1312A BinPump	1200 Series	Agilent Technologies	Pumpe
G1313A ACS	Series 1100	Hewlett Packard	Autosampler
G1316A Colcom	Series 1100	Agilent	Säulenofen
Nucleodur Sphinx RP 18		Machery Nagel	Säule
G1315A DAD	Series 1100	Agilent	UV-Spektrometer
Centrifuge 5415D		Eppendorf	Zentrifuge

E) Programmliste

Programm	Firma	Verwendung
Enhanced Data Analyser	Agilent	GC-Analyse
Instrument Raute MS Top		GC-Analyse
Data Analyser	Bruker Daltonics	LC-Analyse
Quant Analyser		LC-Analyse
Hystar		LC-Analyse
Chem Station - Instrument 1 Data Analysis	Agilent Technologies	GCFID-Analyse
HP GC ChemStation	Hewlett Packard	GCFID-Analyse
Enhanced Chemstation	Agilent Technologies	GCMS-Analyse
Analyst 1.5	Applied Biosystems / MDS Analytical Technologies Instruments	LCMS-Analyse
Datatrans	MPI	Datenauswertung GCMS & GCFID

Literaturverzeichnis

1. Bresinsky, A., et al., *Strasburger - Lehrbuch der Botanik*. 2008: Spektrum Akademischer Verlag.
2. Liesebach, M., H.M. Rau, and A.O. König, *Fichtenherkunftsversuch von 1962 und IUFRO-Fichtenherkunftsversuch von 1972: Ergebnisse von mehr als 30-jähriger Beobachtung in Deutschland*. 2010: Univ.-Verlag Göttingen.
3. Benz, G. and M. Zuber, *Die wichtigsten Forstinsekten der Schweiz und des angrenzenden Auslands*. 1997: vdf, Hochschulverlag AG an der ETH.
4. Zhao, T., et al., *Induced terpene accumulation in Norway spruce inhibits bark beetle colonization in a dose-dependent manner*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26649.
5. Weiler, E.W. and L. Nover, *Allgemeine und molekulare Botanik*. 2008: Thieme.
6. Raffa, K.F., et al., *Effects of Grand Fir Monoterpenes on the Fir Engraver, Scolytus-Ventralis (Coleoptera, Scolytidae), and Its Symbiotic Fungus*. Environmental Entomology, 1985. **14**(5): p. 552-556.
7. Martin, D., et al., *Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems*. Plant Physiol, 2002. **129**(3): p. 1003-18.
8. Bohlmann, J. and C.I. Keeling, *Terpenoid biomaterials*. Plant J, 2008. **54**(4): p. 656-69.
9. http://www.spektrum.de/lexika/showpopup.php?lexikon_id=11&art_id=10787&nummer=866, 18.06.2014
10. Zhao, T., et al., *The influence of Ceratocystis polonica inoculation and methyl jasmonate application on terpene chemistry of Norway spruce, Picea abies*. Phytochemistry, 2010. **71**(11-12): p. 1332-41.
11. Lieutier, F., et al., *Intra- and inter-provenance variability in phloem phenols of Picea abies and relationship to a bark beetle-associated fungus*. Tree Physiol, 2003. **23**(4): p. 247-56.
12. Martin, D., et al., *Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems*. Plant Physiology, 2002. **129**(3): p. 1003-1018.
13. Franceschi, V.R., et al., *Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests*. New Phytol, 2005. **167**(2): p. 353-75.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig verfasst und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt, nur die angegebenen Quellen benutzt und die in den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Ort, Datum

Marcel Alsleben